Određivanje aktivnosti upalnih i apoptoznih kaspaza u THP-1 stanicama i monocitima

Franin, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:102213

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

Lucija Franin

Određivanje aktivnosti upalnih i apoptoznih kaspaza u THP-1 stanicama i monocitima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

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

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći, a posebno dr.sc. Andrei Hulina i profesorici mentorici Ladi Rumori na svim stručnim savjetima i pomoći u izradi diplomskog rada.

SADRŽAJ

1.Uvod…….1

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest……..……1

1.2. Patogeneza kronične opstrukcijske plućne bolesti……...1

1.3. Protein Hsp70 i njegova uloga u imunosnom odgovoru……..2

1.4. Receptori slični Tollu……...……3

1.5. Agonisti receptora TLR: LPS i LTA……5

1.6. Apoptoza……..5

1.6.1. Regulacija apoptoze……...7

1.6.2. Važnost apoptoze u KOPB-u…….7

1.7. Inflamasom……...8

1.7.1. Piroptoza……9

1.7.2. Važnost inflamasoma u KOPB-u……10

1.8. Kaspaze……..11

1.8.1. Kaspaza-9……11

1.8.2. Kaspaza-8……12

1.8.3. Kaspaze-3 i -7……..12

1.8.4. Kaspaza-1……13

1.9. Luminiscencija……...13

1.9.1. Luminiscencija kao metoda određivanja aktivnosti kaspaza……...14

2. Obrazloženje teme……16

3. Materijali i metode……17

3.1. Materijali……17

3.1.1. Kemikalije……...17

3.1.2. Reagensi u test paketima……18

3.1.3. Stanične linije……..18

3.1.4. Aparat za detekciju……..18

3.2. Metode……19

3.2.1. Uzgoj stanica……...…19

3.2.2. Nasađivanje stanica za pokus……..19

3.2.3. Tretiranje stanica……19

3.2.4. Mjerenje……...20

3.2.4.1. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9……..20

3.2.4.2. Određivanje aktivnosti kaspaze-1……21
3.2.5. Statistička obrada podataka……21
4. Rezultati i rasprava……22
4.1. Rezultati……22
4.1.1. THP-1 stanice……22
4.1.1.1. Kaspaza-1……22
4.1.1.2. Kaspaze-3/7……24
4.1.1.3. Kaspaza-8……26
4.1.1.4. Kaspaza-9……28
4.1.2. Monociti……29
4.1.2.1. Kaspaza-1……29
4.1.2.2. Kaspaze-3/7……30
4.1.2.3. Kaspaza-8……30
4.1.2.4. Kaspaza-9……31
4.2. Rasprava……33
5. Zaključci……37
6. Literatura……39
7. Sažetak/Summary……46
8. Prilozi……48
8.1. Popis kratica……48
9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. UVOD

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je učestala bolest koju karakteriziraju trajni respiracijski simptomi i ograničen protok zraka uzrokovan poremećajima dišnih putova ili alveola. Do poremećaja u dišnim putovima i alveolama dolazi zbog izlaganja stranim česticama ili plinovima. Ograničen protok zraka nastaje kao kombinacija bolesti malih dišnih putova, poput opstrukcijskog bronhiolitisa, i uništenja parenhima koji se javlja kod emfizema (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2018).

Najznačajniji čimbenik rizika za razvoj bolesti je aktivno, ali i pasivno, pušenje duhana. Jedan od čimbenika rizika je i onečišćenje zraka u zatvorenim prostorima koje može potjecati od dima koji nastaje izgaranjem biomase, npr. tijekom kuhanja ili grijanja u slabo ventiliranim prostorima. Često zanemaren je čimbenik izloženosti na radnom mjestu, npr. organskoj i anorganskoj prašini, kemijskim agensima i dimu (Eisner i sur., 2010; Salvi i Barnes, 2009). Od genskih čimbenika najpoznatiji je nasljedni nedostatak α-1 antitripsina (Stoller i Aboussouan, 2005). Uočeno je i da osobe sa slabijim razvojem pluća tijekom trudnoće i djetinjstva imaju povećan rizik razvoja bolesti, kao i osobe koje su preboljele teške respiracijske infekcije, osobe s astmom i hiperreaktivnosti dišnih putova te starije osobe općenito (Lange i sur., 2015; Salvi i Barnes, 2009; Stern i sur., 2007; Tashkin i sur., 1992). Rizik za razvoj bolesti je veći kod muškaraca nego kod žena, međutim te se razlike smanjuju (de Marco i sur., 2010). Također, veći je rizik kod osoba koje žive u ruralnim krajevima te kod osoba nižeg socioekonomskog statusa (Gershon i sur., 2011).

1.2. Patogeneza kronične opstrukcijske plućne bolesti

Strane čestice i dim koji ulaze u pluća udisanjem uzrokuju upalni odgovor u dišnim putovima. Zbiva se infiltracija upalnih stanica kao što su limfociti, aktivirani neutrofili i makrofagi. Te stanice izlučuju brojne različite enzime koji uništavaju tkivo, na primjer elastaze i metaloproteinaze matriksa. Oksidansi i drugi molekularni obrasci povezani s patogenima i oštećenjem tkiva prisutni u dimu aktiviraju jezgrin čimbenik kappa B (NF-κB, *engl*. nuclear factor kappa B) i njegov signalni put, odnosno upalni odgovor.

Tijekom upale dolazi do ozljede plućnog parenhima, stoga se jednim od ključnih događaja u patogenezi KOPB-a smatra nedovoljna sposobnost organizma da obnovi oštećeno tkivo, odnosno neravnoteža u oštećenju i obnavljanju parenhima. Apoptoza alveolarnih i epitelnih

stanica dovodi do emfizema, gubitka površine za izmjenu plinova. Apoptoza može biti uzrokovana nedostatkom čimbenika rasta, oksidacijskim stresom ili odgovorom stanice na stres.

U uznapredovaloj bolesti, upala može promijeniti svoja svojstva tako da dođe do prejake aktivacije upalnih citokina i kemokina te pretvorbe makrofaga iz tipa M1 u tip M2 koji potiče fibrozu. Fibroza je posebno izražena u malim dišnim putovima promjera manjeg od 2 milimetra. Bakterijske i virusne infekcije mogu uzrokovati egzacerbacije bolesti i pojačati upalu te oštećenje parenhima. Oštećene epitelne i alveolarne stanice otpuštaju vlastite antigene koje imunosni sustav prepoznaje kao strane. Dolazi do značajnih promjena u strukturi plućnog parenhima, pri čemu se kolagen zamjenjuje elastinom.

Svi ovi procesi zbivaju se i u drugim tkivima, na primjer inhibirana je hematopoetska aktivnost koštane srži, dolazi do oštećenja mišićnog tkiva, smanjena je mogućnost fizičke aktivnosti i oslabljena regeneracija krvožilnog sustava. Stoga se KOPB smatra ne samo respiracijskom, već i sistemskom upalnom bolešću (Tuder i Petrache, 2012; MacNee, 2005).

1.3. Protein Hsp70 i uloga u imunosnom odgovoru

Proteini toplinskog šoka (Hsp, *engl*. heat shock protein) su skupina vrlo konzerviranih proteina prisutnih u svim stanicama svih organizama. Dobili su ime po tome što njihovu sintezu induciraju različiti stresni čimbenici, na primjer toplina, ishemija, etanol, nikotin, virusi. Danas znamo da su neki od Hsp-ova inducibilni, a neki konstitutivno eksprimirani. Nazivaju se još i šaperoni jer nadziru smatanje proteina, stvaranje multiproteinskih kompleksa te razvrstavanje i prijenos proteina u određene organele. Hsp-ovi dijele se u skupine ovisno o molekulskoj masi u kDa pa tako poznajemo Hsp-ove male molekulske mase, Hsp60, Hsp70 i Hsp90. Također, kontroliraju stanični ciklus i signalizaciju te štite stanicu od stresa, odnosno apoptoze (Sevin i sur., 2015; Whitley i sur., 1999).

Hsp70 je obitelj proteina koja uključuje konstitutivno eksprimirane i inducibilne proteine. Kao i ostali Hsp-ovi, i oni imaju ulogu šaperona te pomažu pravilno smatanje proteina pri čemu koriste energiju hidrolize adenozin-trifosfata (ATP). Osim toga, sprječavaju apoptozu potaknutu unutarnjim i vanjskim putom aktivacije te staničnu smrt neovisnu o kaspazama. Također, Hsp70 sudjeluje u regulaciji imunosnog odgovora tako da inhibira NF-κB signalni put te sprječava odgovor stanice na upalne citokine (Sevin i sur., 2015; Giffard i sur., 2008).

Hsp70 može izaći iz stanice aktivnim transportom, iako točan mehanizam izlaska nije potvrđen. Takav izvanstanični Hsp70 (eHsp70, *engl*. extracellular Hsp70) može potjecati iz

umirućih stanica te djelovati kao signal opasnosti, a ako potječe iz živih stanica, može imati regulacijsku ulogu. eHsp70 veže se na površinske receptore slične Tollu (TLR, *engl*. Toll-like receptor) TLR 2 i TLR 4 na imunosnim stanicama te na taj način aktivira NF-κB signalni put i potiče sintezu i izlučivanje upalnih citokina (Sevin i sur., 2015; Giffard i sur., 2008). Također, može biti prezentiran na antigen-prezentirajućim stanicama (makrofagi i dendritičke stanice). Ako je vezan na površini neke stanice, može aktivirati T-limfocite i NK-stanice koje će uništiti stanicu koja nosi Hsp70 (Giffard i sur., 2008; Hirsch i Junger, 2008).

Povišena koncentracija Hsp70 u plazmi prisutna je u različitim upalnim bolestima, među kojima je i kronična opstrukcijska plućna bolest (Qu i sur., 2015).

1.4. Receptori slični Tollu

TLR su skupina receptora koji pripadaju receptorima za obrasce (PRR, *engl*. pattern recognition receptors). TLR-ovi prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP, *engl*. pathogen-associated molecular patterns) koji potječu od mikroorganizama i molekularne obrasce oštećenja (DAMP, *engl*. damage-associated molecular patterns) koji potječu iz oštećenog tkiva. PAMP-ovi i DAMP-ovi potiču signalne putove koji dovode do aktivacije transkripcijskih faktora NF-κB, aktivacijskog proteina 1 (AP-1, *engl*. activator protein-1) i čimbenika regulacije interferona 3 (IRF3, *engl*. interferon regulatory factor 3) te do transkripcije gena ovisnih o njima, kao što su geni za upalne citokine interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), čimbenik nekroze tumora α (TNF-α, *engl*. tumor necrosis factor-α) i interferon. TLR-ovi su transmembranski proteini koji u svojoj strukturi imaju izvanstaničnu domenu koja sadrži 16-28 područja bogatih leucinom (LRR, *engl*. leucine-rich repeat) i citoplazmatsku domenu homolognu Tollu i receptoru za interleukin-1 (TIR, *engl*. Toll/interleukin 1 receptor homology domain). Ovi receptori stvaraju heterodimere s drugim receptorima i koreceptorima da bi povećali svoju raznolikost i mogli vezati različite molekularne obrasce. Postoji barem 10 gena za različite TLR-ove kod čovjeka, a prema smještaju u stanici možemo ih podijeliti na TLR-ove koji se nalaze na staničnoj membrani (TLR 1, 2, 4, 5 i 6) te one koji se nalaze na membrani endosoma i lizosoma (TLR 3, 7, 8 i 9) (Molteni i sur., 2016; Sandor i Buc, 2005).

TLR-ovi su prisutni na stanicama plućnog tkiva te na imunosnim stanicama koje se infiltriraju u pluća tijekom upale. Dim cigarete, jedan od čimbenika rizika za KOPB, potiče upalu i sintezu citokina aktivacijom TLR-ova te djeluje na ekspresiju receptora. Pluća pacijenata koji boluju od KOPB-a kolonizirana su bakterijama zbog povećane proizvodnje

mukusa i njegovog smanjenog uklanjanja. Komponente stanične stijenke bakterija ligandi su receptora TLR2 i TLR4, dok virusni PAMP-ovi djeluju preko receptora TLR3, -7 i -8. TLR-ovi mogu neprikladno odgovarati na prisutne bakterije i viruse te uzrokovati egzacerbacije preslabom aktivacijom imunosnog sustava ili prejakom aktivacijom koja dovodi do oštećenja vlastitog tkiva. TLR2 i TLR4 uključeni su i u imunosni odgovor na čestice prisutne u onečišćenom zraku. Jedno od obilježja KOPB-a je i povećana razgradnja i izgradnja izvanstaničnog matriksa te usporena eliminacija apoptoznih stanica iz pluća. Razgrađena hijaluronska kiselina te sadržaj umrlih stanica prisutni su u izvanstaničnom prostoru i predstavljaju DAMP molekule koje djeluju kao kemoatraktanti za imunosne stanice te su ligandi TLR-ova koji će potaknuti imunosni odgovor (Bezemer i sur., 2012).

Prvi otkriveni TLR bio je TLR4. Prisutan je na površini stanica hematopoeze, endotelnih stanica, kardiomiocita te stanica živčanog sustava. Njegov najbolje proučeni ligand je lipopolisaharid (LPS) iz vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Vezanjem LPS-a na receptor dolazi do prijenosa signala unutar stanice i aktivacije transkripcijskih faktora. Ostali ligandi receptora TLR4 su neki virusi te neke endogene molekule kao što su fibrin, hem, oligosaharidni fragmenti hijaluronana, polisaharidni fragmenti heparan sulfata te Hsp60 i Hsp70. Fragmente hijaluronana veže pomoću molekule 2 koja veže lipopolisaharid (MD 2, *engl*. molecule that confers lipopolysaccharide), a Hsp-ove pomoću biljega diferencijacije 14 (CD14, *engl*. cluster of differentiation) (Molteni i sur., 2016; Lorne i sur., 2010; Sandor i Buc, 2005).

Receptor TLR2 prisutan je na imunosnim stanicama, npr. neutrofilima, monocitima, makrofagima te dendritičkim stanicama. Prepoznaje brojne različite komponente mikroorganizama, npr. peptidoglikan i lipoteikoičnu kiselinu (LTA) iz stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija, lipoproteine i lipopeptide iz stanične stijenke Gram-negativnih bakterija, lipoarabinomanan iz stanične stijenke mikobakterija, zimosan iz stanične stijenke kvasaca, glikolipide iz stanične membrane parazita te različite vrste virusa. Neke vrste LPS-a ne prepoznaje TLR4, već TLR2. TLR2 stvara heterodimere s receptorima TLR1 i TLR6. U kompleksu s TLR1, TLR2 prepoznaje triacilirane lipopeptide, a u kompleksu s TLR6 diacilirane lipopeptide. TLR2 također prepoznaje neke endogene molekule, npr. hijaluronsku kiselinu i Hsp70. Hijaluronsku kiselinu veže uz pomoć MD 2, a Hsp70 uz pomoć CD14. Vezanjem liganda na receptor potiče se signalna kaskada unutar stanice pri čemu se aktivira NF-κB transkripcijski faktor (Mukherjee i sur., 2016; Lorne i sur., 2010; Sandor i Buc, 2005).

1.5. Agonisti receptora TLR: LPS i LTA

LPS je glikolipid koji izgrađuje vanjsku staničnu membranu Gram-negativnih bakterija. Građen je od O-specifičnog bočnog lanca, sržne domene (*engl*. core domain) i lipida A. Lipid A je PAMP kojeg prepoznaje receptor TLR4 povezan s koreceptorom MD 2 na imunosnim i endotelnim stanicama. Da bi se LPS vezao na receptor, najprije ga u izvanstaničnom prostoru mora vezati protein koji veže LPS (LBP, *engl*. LPS binding protein) te ga dovesti do membranskog proteina CD14 koji djeluje kao koreceptor pomoću kojeg se kompleks približava membrani. Zatim se LPS prenosi na kompleks MD 2-TLR4, taj kompleks dimerizira te se signal prenosi u unutrašnjost stanice (Bohannon i sur., 2013).

LTA je naziv za skupinu različitih amfifilnih molekula koje su usidrene s vanjske strane stanične membrane Gram-pozitivnih bakterija. Sve LTA su glikolipidi koji sadrže diacilglicerol pomoću kojeg je molekula usidrena u membrani i polimernu ugljikohidratnu strukturu (Schröder i sur., 2003). LTA u cirkulaciji stvara kompleks s LBP-om ili s proteinom visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, *engl*. high mobility group box 1 protein) i pomoću njega dolazi do CD14 koreceptora koji je prenosi na TLR2 receptor. Vezanjem LTA na receptor aktiviraju se signalni putovi i transkripcijski faktori te se izaziva upalni odgovor stanice (Kwak i sur., 2015).

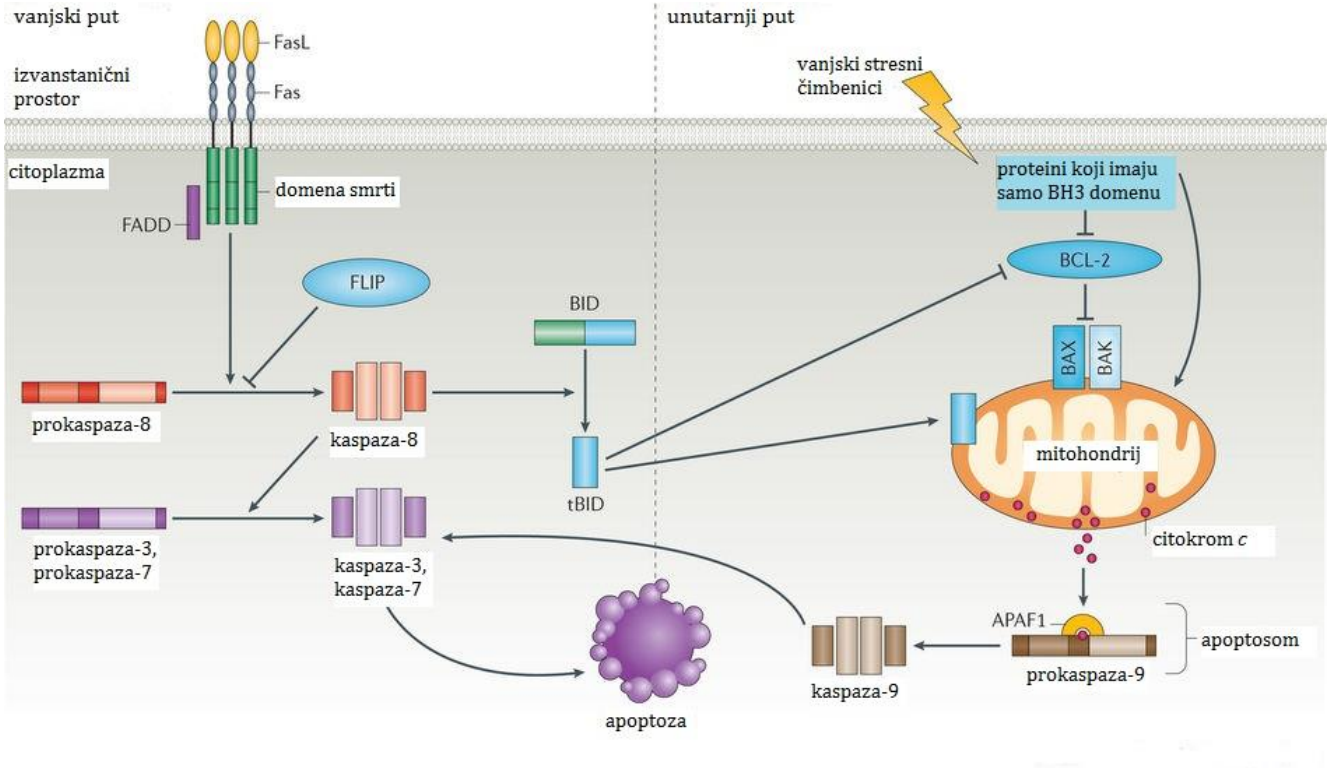
1.6. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt je proces potreban za uklanjanje oštećenih, starih ili suvišnih stanica pri čemu ne dolazi do aktivacije imunosnog sustava. Karakteriziran je fragmentacijom stanične jezgre, kondenzacijom stanice i stvaranjem apoptoznih tjelešaca. Prisutna je kod svih višestaničnih organizama, a može započeti aktivacijom unutarnjeg (mitohondrijskog) ili vanjskog signalnog puta (puta receptora smrti). Izvršitelji apoptoze su proteaze zvane kaspaze (Kennedy i sur., 2014).

Vanjski put aktivira se vezanjem različitih liganda na membranske receptore smrti. Receptori smrti pripadaju TNF superporodici receptora. Najbolje opisani receptori smrti su Fas i TNFR1. Vezanjem liganda na Fas stvara se signalni kompleks koji potiče smrt (DISC, *engl*. death inducing signaling complex) i aktiviraju se kaspaze-8 i -10. One proteolitički kidaju i aktiviraju izvršne kaspaze, kaspaze-3 i -7. Izvršne kaspaze uzrokuju kondenzaciju stanice, fragmentaciju jezgre i DNA te smrt stanice (Tummers i Green, 2017; Kennedy i sur., 2014).

Receptor TNFR1 i još neki receptori smrti povezuju se s adaptacijskim i signalnim molekulama preko zajedničkih domena te stvaraju kompleks I smješten uz membranu stanice. Kompleks I aktivira signalne putove koji potiču preživljenje stanice, proliferaciju stanice ili apoptozu. Ovisno o posttranslacijskim modifikacijama signalnih proteina uključenih u kompleks I, oni se premještaju u citosol i s prokaspazom-8 stvaraju kompleks II u kojem se ona aktivira (Tummers i Green, 2017).

Unutarnji put ili put apoptoze posredovan mitohondrijima započinje unutarstaničnim signalima kao što su oksidacijski stres, hipoksija ili nedostatak nutrijenata. Ovi signali dovode do permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija i otpuštanja citokroma *c* u citoplazmu. Citokrom *c* se veže na čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, *engl*. apoptotic protease activating factor-1), a nakon toga dolazi do zamjene adenozin-difosfata (ADP) s ATP-om što uzrokuje stvaranje apoptosoma, kompleksa koji dovodi do aktivacije kaspaze-9. Apoptosom sadrži citokrom *c*, Apaf-1, ATP i pet do sedam prokaspaza-9 koje se u ovom kompleksu aktiviraju te postaju sposobne za aktivaciju izvršnih kaspaza-3 i -7 (You i sur., 2017; Kennedy i sur., 2014). Unutarnji i vanjski put aktivacije apoptoze prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Vanjski i unutarnji put apoptoze dovode do aktivacije izvršnih kaspaza (preuzeto iz Cuda i sur., 2016).

1.6.1. Regulacija apoptoze

Glavni regulatori apoptoze su proteini iz Bcl-2 porodice. Dijele se u tri skupine prema Bcl-2 homolognim (BH) domenama koje sadrže, a to su BH1, BH2, BH3 i BH4.

Proteini koji imaju samo BH3 domenu djeluju apoptozno. Glavni predstavnik među njima je Bid. U zdravim stanicama koje ne ulaze u apoptozu oni su neaktivni. Mogu biti fosforilirani ili vezani na proteine u citoplazmi. Međutim, u prisutnosti signala smrti ovi proteini mogu se aktivirati te potaknuti oligomerizaciju proteina koji imaju tri BH domene. Proteini koji imaju tri BH domene također djeluju apoptozno. Predstavnici ove skupine su proteini Bax i Bak. U zdravim stanicama nalaze se u citosolu ili vezani na membranu mitohondrija u inaktivnom obliku, no ako je prisutan signal smrti, ovi proteini mijenjaju svoju konformaciju, umeću se u vanjsku membranu mitohondrija i oligomeriziraju te stvaraju pore (Chan i Yu, 2004).

Proteini koji imaju četiri BH domene djeluju antiapoptozno. U ovu skupinu ubrajaju se Bcl-2, $BclX_L$, Mcl-1 i Bcl-w. Oni su vezani na proteine koji imaju tri BH domene i čuvaju ih u neaktivnom obliku, no aktivirani proteini koji imaju samo BH3 domenu mogu se vezati na proteine koji imaju četiri BH domene i na taj način osloboditi proteine koji imaju tri BH domene, nakon čega oni mogu stvarati pore u mitohondrijskoj membrani (Chan i Yu, 2004).

Hsp-ovi također imaju ulogu u regulaciji apoptoze. Općenito djeluju tako da inhibiraju apoptozu. Primjerice, Hsp70 i mali Hsp-ovi vežu Bax, inhibiraju lučenje citokroma *c* iz mitohondrija i aktivaciju prokaspaza-3 i -7. Za razliku od njih, Hsp90, Hsp60 i Hsp10 mogu inhibirati i poticati apoptozu, ovisno o stanicama u kojima se nalaze i o signalima koji djeluju na stanicu (Kennedy i sur., 2014; Giffard i sur., 2008).

1.6.2. Važnost apoptoze u KOPB-u

Smatra se da poremećaj ravnoteže apoptoze i proliferacije stanica u plućima pridonosi razvoju KOPB-a. U plućima pacijenata koji imaju KOPB i puše, pronađene su alveolarne epitelne stanice i endotelne stanice u apoptozi, aktivirana kaspaza-3 i povećana ekspresija proteina iz Bcl-2 obitelji Bax i Bad. Također, smanjena je ekspresija čimbenika rasta koji potiču proliferaciju novih endotelnih stanica, što dovodi do razvoja emfizema (Demedts i sur., 2006).

Alveolarni makrofagi trebali bi fagocitirati apoptozna tjelešca, no oni nisu dovoljno efikasni u tome. Smatra se da je uzrok tome poremećaj u receptorima makrofaga koji trebaju prepoznati signale za uklanjanje apoptoznih tjelešaca i oksidacijski stres kojem su makrofagi izloženi. Posljedično, stanice u apoptozi ulaze u sekundarnu nekrozu te potiču kroničnu upalu.

Osim toga, u KOPB-u postoji povećan broj aktiviranih neutrofila koji ne mogu fagocitirati patogene te umiru nekrozom, što dovodi do izlijevanja sadržaja neutrofilnih granula i egzacerbacije bolesti. Osim neutrofila i makrofaga, u plućima pacijenata gomilaju se i $CD8^+$ T limfociti koji djeluju citotoksično i mogu uzrokovati apoptozu alveolarnih epitelnih stanica (Grabiec i Hussell, 2016; Hoenderdos i Condliffe, 2013; Demedts i sur., 2006).

1.7. Inflamasom

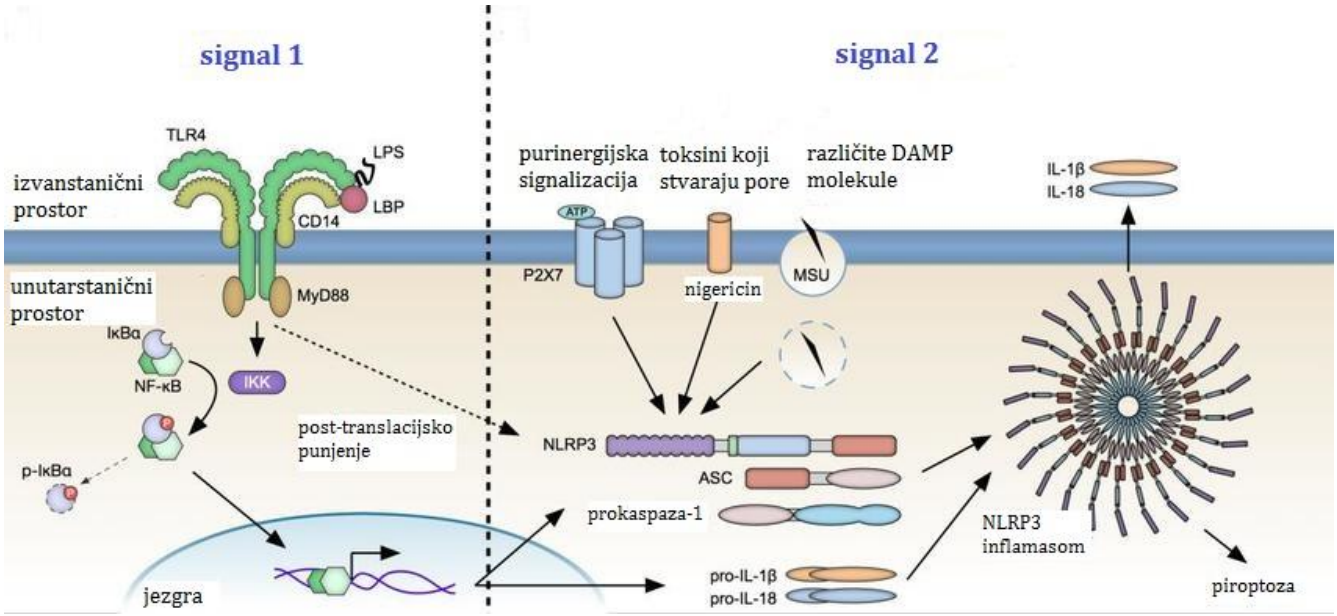
Inflamasomi su multimerni kompleksi koji nastaju u stanicama kao reakcija na različite fiziološke i patološke uvjete. Jedan su od osnovnih mehanizama urođene imunosti i potrebni su za uklanjanje patogena ili oštećenih vlastitih stanica. Građeni su od receptora i kaspaze-1. Većini inflamasoma potrebna je i adaptacijska molekula između receptora i kaspaze-1, a to je protein nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (ASC, *engl*. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain). Inflamasomi se prema strukturi receptora kojeg sadrže mogu podijeliti na inflamasome s receptorom sličnim oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl.* nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors) i inflamasome s receptorom sličnim proteinu 2 odsutnom u melanomu (ALR, *engl*. absent in melanoma 2-like receptors) (Sharma i Kanneganti, 2016).

Najbolje istražen je NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (NLRP3, *engl*. NOD-like receptor pyrin 3). To je receptor koji je konstitutivno eksprimiran u niskim količinama u stanicama mijeloidne loze, a njegovu ekspresiju potiču LPS i TNF-α. Taj prvi signal također inducira i sintezu pro-IL-1β i pro-IL-18. Pritom NLRP3 postaje osjetljiv na drugi signal, a to može biti neki od širokog spektra egzogenih i endogenih liganda, npr. različite PAMP molekule i toksini bakterija, virusa, gljivica i parazita, DAMP molekule podrijetlom iz vlastitih stanica te kristali silicijevog dioksida, aluminijev hidroksid, azbest i slično. Još uvijek nije poznat molekularni mehanizam kojim toliko različitih molekula može aktivirati specifično ovaj receptor (Sharma i Kanneganti, 2016; Man i Kanneganti, 2015; de Zoete i sur., 2014). Aktivacija NLRP3 prikazana je na Slici 2.

Aktivacija inflamasoma je strogo reguliran proces. Receptori inflamasoma sadrže domene kojima mogu izravno vezati kaspazu-1 ili se povezuju s kaspazom preko adaptacijske molekule ASC. Nakon detekcije određenog signala opasnosti, receptori oligomeriziraju u strukturu poput kotača. ASC molekule se preko svojih pirinskih domena (PYD, *engl*. pyrin domain) vežu na pirinske domene receptora i stvaraju dugačke filamente. Na taj način nastaju

žarišta u kojima će se aktivirati mnogobrojne molekule kaspaze-1. Na ASC se zatim vežu molekule kaspaze-1 preko N-terminalne domene za aktivaciju i privlačenje kaspaza (CARD, *engl.* caspase activation and recruitment domain). Vezanjem velikog broja kaspaza one dimeriziraju, autoproteolitički se kidaju te na taj način aktiviraju. Aktivirane kaspaze proteolitički kidaju prekursore citokina IL-1β i IL-18 te induciraju posebnu vrstu stanične smrti piroptozu. U stanici se može aktivirati veći broj inflamasoma. Ovaj način aktivacije inflamasoma naziva se kanonski put (Sharma i Kanneganti, 2016; Man i Kanneganti, 2015).

Nekanonski put aktivacije inflamasoma javlja se kad su u citoplazmi prisutni bakterijski LPS ili unutarstanične bakterije. To uzrokuje aktivaciju kaspaze-11 kod miševa, odnosno kaspaza-4 i -5 kod ljudi, jer ove kaspaze djeluju kao izravni senzori LPS-a u citoplazmi. Kaspaze pokreću piroptozu i lučenje upalnog citokina IL-1α. Za razliku od kaspaze-1, ove kaspaze ne kidaju izravno IL-1β i IL-18 (Xu i sur., 2018; Man i Kanneganti, 2015).



Slika 2. Aktivacija NLRP3 inflamasoma zahtijeva dva signala i dovodi do izlučivanja citokina IL-1β i IL-18 te do piroptoze (preuzeto iz Yaron, 2015).

1.7.1. Piroptoza

Aktivacija inflamasoma dovodi do programirane stanične smrti zvane piroptoza. Piroptozu karakteriziraju liza stanice, ispuštanje unutarstaničnog sadržaja i upalni odgovor. Na ovaj način mogu umrijeti makrofagi, monociti, dendritičke stanice, enterociti i hematopoezne stanice. Piroptoza dijeli neke značajke apoptoze i nekroze. Primjerice, u

staničnoj membrani nastaju pore kroz koje se sadržaj stanice ispušta u izvanstanični prostor, a pritom se otpuštaju citokini IL-1β i IL-18 te protein HMGB1. Izlučeni citokini uzrokuju kemotaksiju upalnih stanica i daljnje izlučivanje upalnih citokina iz imunosnih stanica. Slično nekrozi, stanica bubri i lizira se. S druge strane, slično apoptozi, događa se fragmentacija DNA i nastajanje mjehurića sličnih apoptoznim tjelešcima (Liu i Lieberman, 2017; Sharma i Kanneganti, 2016).

Za piroptozu je odgovorna aktivacija kaspaze-1 u kanonskom, odnosno kaspaze-4 u nekanonskom putu. Glavni supstrat aktiviranih kaspaza je protein gasdermin D (GSDMD) kojeg kaspaze kidaju na N-terminalni i C-terminalni fragment. N-terminalni fragment GSDMD-a (GSDMD-NT) je ključni medijator piroptoze i izlučivanja upalnih citokina stvorenih aktivacijom inflamasoma. GSDMD-NT oligomerizira i veže se na lipide unutarnje ovojnice stanične membrane te stvara pore u membrani. Veličina pora iznosi 10 do 16 nm i dovoljno su velike da kroz njih prođu male molekule i mali proteini kao što su citokini. Pretpostavlja se da je uloga C-terminalnog fragmenta da veže i inaktivira N-terminalni fragment u citoplazmi, sve dok se on ne veže na lipide stanične membrane (Liu i Lieberman, 2017).

Iz stanica u piroptozi, osim staničnih proteina i citokina izlaze i kaspaza-1 i GSDMD-NT, no on ne veže lipide vanjske ovojnice stanične membrane pa se piroptoza ne širi na okolne stanice. Osim toga, GSDMD-NT unutar stanica ima dodatnu ulogu, a to je ubijanje bakterija. Zasad nije jasno kako GSDMD-NT ulazi u bakteriju, a ni to napada li samo bakterije u citosolu ili i bakterije u fagosomu (Liu i Lieberman, 2017).

1.7.2. Važnost inflamasoma u KOPB-u

Pretpostavlja se da se NLRP3 inflamasom aktivira kod pacijenata s KOPB-om, osobito tijekom akutnih egzacerbacija. U dišnim putovima bolesnika u egzacerbaciji prisutne su povišene koncentracije nekoliko aktivatora inflamasoma: izvanstaničnog ATP-a, kristala urata, reaktivnih kisikovih spojeva i bakterijskih PAMP molekula. Akutne egzacerbacije može uzrokovati i virus influence, a i on aktivira inflamasome. Kod pacijenata s težim oblicima KOPB-a i kod pušača uočena je povećana aktivnost kaspaze-1 u odnosu na nepušače. Također, koncentracija IL-1β i IL-18 povećana je kod bolesnika s KOPB-om (Barnes, 2016; Brusselle i sur., 2014).

Osim toga, kompleksi inflamasoma mogu se naći u izvanstaničnom prostoru pluća pacijenata s KOPB-om. Smatra se da kompleksi izlaze iz makrofaga nakon piroptoze te

aktiviraju prokaspazu-1 u kaspazu-1 koja zatim kida pro-IL-1β u izvanstaničnom prostoru. Također, makrofagi fagocitiraju komplekse te im oni služe kao DAMP signali koji potiču stvaranje novih inflamasoma (Man i Kanneganti, 2015).

1.8. Kaspaze

Kaspaze su cisteinske proteaze koji sudjeluju u izvršavanju i regulaciji stanične smrti. Kod ljudi je poznato 12 vrsta kaspaza, a od toga je njih 7 uključeno u apoptozu. To su kaspaze-2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10. Ostale kaspaze sudjeluju u upali. Kaspaze su proteaze prisutne u stanici kao inaktivni zimogeni. Imaju dvije karakteristične domene, N-terminalnu domenu kojom se uzvodne kaspaze vežu na molekulske komplekse koji ih aktiviraju te katalitičku domenu koja sadrži veliku i malu podjedinicu. Prokaspaze stvaraju dimere koji se autoproteolitički aktiviraju. Pritom nastaje heterotetramer koji sadrži dva aktivna mjesta, a svako aktivno mjesto potječe od jedne molekule kaspaze. Iznimka je kaspaza-9 koja sadrži samo jedno aktivno mjesto.

Kaspaze hidroliziraju peptidnu vezu nakon aspartatnog ostatka koji se najčešće nalazi pored ostatka male ili nenabijene aminokiseline poput glicina, serina ili alanina. Supstrat kaspaze ulazi u vezno mjesto koje sadrži aminokiseline male i velike podjedinice katalitičke domene. U katalitičkom mjestu nalazi se cistein (Würstle i sur., 2012).

1.8.1. Kaspaza-9

Kaspaza-9 je inicijacijska kaspaza u unutarnjem putu apoptoze. Važna je u poticanju apoptoze u stanicama tijekom ranog embrionalnog razvoja, za uklanjanje starih i oštećenih stanica te stanica koje abnormalno proliferiraju.

Prokaspaza-9 aktivira se u sklopu apoptosoma, kompleksa molekula Apaf-1 i citokroma *c*, na koji se veže pomoću CARD motiva u N-terminalnoj domeni. Pritom molekule prokaspaze-9 dimeriziraju i aktiviraju se. Kaspaza je aktivna samo dok je vezana na apoptosom i pritom može proteolitički kidati svoje supstrate, izvršne prokaspaze-3 i -7. Nakon stvaranja dimera, zbiva se njihovo autoproteolitičko kidanje. Ono nije potrebno za aktivaciju prokaspaze-9, dapače, pokidani dimer ima manji afinitet prema apoptosomu, miče se s njega i potom prestaje biti aktivan. Na apoptosom se može vezati 5 do 6 prokaspaza-9, no samo jedan dimer je aktivan u svakom trenutku (Würstle i sur., 2012).

1.8.2. Kaspaza-8

Kaspaza-8 je inicijacijska kaspaza u vanjskom putu apoptoze. Ona sadrži izvršnu domenu smrti (DED, *engl*. death effector domain) u N-terminalnoj domeni pomoću koje se povezuje s adaptacijskim molekulama i stvara DISC. DISC može vezati 6 prokaspaza koje onda dimeriziraju i autoproteolitički se aktiviraju. Aktivna kaspaza-8 kida svoje supstrate, izvršne kaspaze-3 i -7. Kaspaza-8 također se može aktivirati u kompleksu II nakon aktivacije TNFR1 receptora (Tummers i Green, 2017).

U slučaju aktivacije inflamasoma, ukoliko u stanici nema kaspaze-1, inflamasom može aktivirati kaspazu-8 koja će onda proteolitički pokidati pro-IL-1β i pro-IL-18 te potaknuti apoptozu. Na ovaj način kaspaza-8 može regulirati aktivnost inflamasoma i samu upalu. Kaspazu-8 mogu aktivirati NLRP3 inflamasomi u makrofagima i u dendritičkim stanicama (Shalini i sur., 2015).

Kaspaza-8 važna je i za proliferaciju matičnih stanica hematopoeze i u kasnijim fazama hematopoeze, u limfopoezi i u diferencijaciji monocita u makrofage (Solier i sur., 2017).

1.8.3. Kaspaze-3 i -7

Kaspaze-3 i -7 su izvršne kaspaze čije se funkcije djelomično preklapaju. Aktiviraju ih inicijacijske kaspaze, a one onda proteolitički kidaju svoje supstrate i potiču apoptozu.

Kaspaza-3 je glavna izvršna kaspaza koja proteolitički kida većinu supstrata u stanici. Aktivira kaspazu-6 i sudjeluje u procesima kondenzacije jezgre i fragmentacije DNA tako što aktivira DNazu aktiviranu kaspazama (CAD, *engl*. caspase activated DNase). Odgovorna je i za održavanje kaskade aktivacije kaspaza u stanici (Slee i sur., 2001). Nakon aktivacije kaspaze-9, zbog izlaska citokroma *c* iz mitohondrija, povećava se stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, no kaspaza-3 ograničava njihovo stvaranje (Brentnall i sur., 2013).

Osim djelovanja na samu stanicu u apoptozi, kaspaza-3 dovodi do nastanka produkata koji šalju signale okolnim stanicama. Primjerice, to su „jedi me“ signal upućen makrofagima koji fagocitiraju apoptozna tjelešca, te signal matičnim stanicama da se dijele i diferenciraju te na taj način zamijene stanicu koja umire (Boland i sur., 2013).

Osim uloge u apoptozi, kaspaza-3 potrebna je i u proliferaciji T-limfocita, diferencijaciji osteoblasta, neurona i stanica skeletnih mišića (Boland i sur., 2013). Također, kontrolira i inhibira autofagiju, diferencijaciju keratinocita i epitelnih stanica leće te pravilno povezivanje neurona (Shalini i sur., 2015), eritropoezu i trombopoezu, a nalazi se i u granulama mastocita (Solier i sur., 2017).

Kaspaza-7 sudjeluje u odvajanju apoptoznih stanica od izvanstaničnog matriksa i na taj način olakšava njihovo uklanjanje. Još nije poznato koji su točno njezini supstrati (Brentnall i sur., 2013).

1.8.4. Kaspaza-1

Kaspaza-1 je upalna kaspaza koja se aktivira u inflamasomu. Prva otkrivena i glavna uloga kaspaze-1 je kidanje i aktivacija upalnih citokina pro-IL-1β i pro-IL-18. Ovi citokini izlučuju se nakon smrti i lize stanica uzrokovane piroptozom. Kaspaza-1 uzrokuje i piroptozu kidanjem supstrata GSDMD (Liu i Liebermann, 2017). Također, omogućuje izlučivanje IL-1α (Sollberger i sur., 2014).

Nedavno otkriveni supstrati kaspaze-1 su i enzimi glikolize, čija razgradnja kod makrofaga dovodi do smrti stanice. Osim što može uzrokovati smrt imunosnih stanica, kaspaza-1 se također može aktivirati u drugim vrstama stanica i u njima potaknuti preživljavanje stanice i otpor patogenima. Neki patogeni mogu stvarati pore u membrani stanica i uzrokovati lizu stanice, no aktivna kaspaza-1 u ovim stanicama inducira sintezu masnih kiselina i kolesterola i tako omogućuje popravak oštećenih membrana (Sollberger i sur., 2014).

Također, kaspaza-1 može biti izlučena iz makrofaga u izvanstanični prostor. Prepostavlja se da ondje može uzrokovati jačanje upalne kaskade tijekom infekcije (Sun i Scott, 2016).

1.9. Luminiscencija

Luminiscencija je pojava emitiranja svjetlosti tijekom vraćanja molekule u osnovno stanje pri čemu se ekscitacija molekule dogodila tijekom kemijske, biokemijske ili elektrokemijske reakcije. S obzirom na to u kakvoj se reakciji dogodila ekscitacija, razlikujemo kemiluminiscenciju, bioluminiscenciju i elektrokemiluminiscenciju.

Kemiluminiscencija je emisija svjetlosti uzrokovana kemijskom reakcijom, a uključuje oksidaciju organske tvari poput luminola ili luciferina uz oksidans, na primjer kisik ili vodikov peroksid. Ove reakcije događaju se uz prisutnost enzima poput peroksidaze. Tijekom kemijske reakcije oslobađa se energija koja pobuđuje nastali produkt, a tijekom vraćanja u osnovno stanje emitira se svjetlost.

Bioluminiscencija je poseban oblik kemiluminiscencije prisutan u organizmima koji imaju enzim ili fotoprotein koji povećava intenzitet luminiscentne reakcije. Takvi enzimi su luciferaza iz krijesnica i akvorin iz meduze.

Elektrokemiluminiscencija se događa u reakciji u kojoj pod utjecajem električnog polja stabilna molekula, na primjer tripropilamin, prelazi u nestabilno, pobuđeno stanje i zatim pobuđuje rutenijev kompleks koji tijekom vraćanja u osnovno stanje emitira svjetlost.

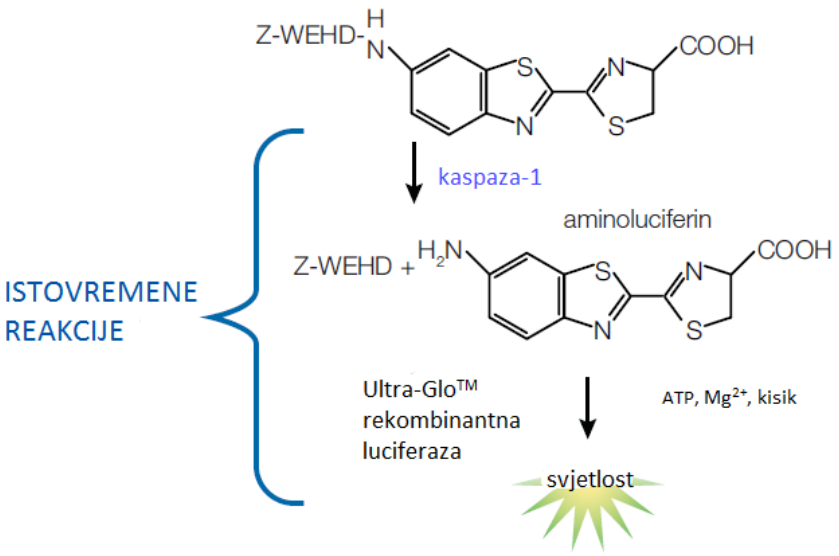
Luminiscencija, odnosno intenzitet emitirane svjetlosti, određuje se pomoću luminometra. Luminometar je jednostavni uređaj koji se sastoji od kivete u kojoj se nalazi uzorak, sustava za injekciju reagensa u kivetu i detektora. Luminometrija je vrlo osjetljiva metoda s vrlo širokim područjem linearnosti. Ipak, moguća je pojava pozadinske luminiscencije. Luminometrija se koristi u različitim imunokemijskim testovima i za obilježavanje DNA molekula (Kricka i Park, 2012).

1.9.1. Luminiscencija kao metoda određivanja aktivnosti kaspaza

Aktivnost kaspaza može se mjeriti tehnikama mikroskopskog oslikavanja, pri čemu je potrebno imunokemijski obojiti stanice i tkiva. Kaspaze u stanicama mogu se obilježiti fluorescentnom bojom i odrediti fluorescentnom spektroskopijom ili protočnom citometrijom. Također, mogu se odrediti ELISA tehnikom u lizatu stanica (Adamova i sur., 2014).

Određivanje aktivnosti kaspaza temeljeno na luminiscenciji osjetljivije je od ELISA metode. Razvijen je test u kojem kaspaza kida specifični peptid s vezanim biotinom, a onda se biotin veže na streptavidinom obložene čestice koje sadrže rutenijev kompleks i koje su vezane na elektrodu. U elektrokemiluminiscentnoj reakciji detektira se signal proporcionalan aktivnosti kaspaze (Dong i sur., 2016).

Drugi test temelji se na svojstvu luminiscencije luciferina. Kaspaza specifično kida tetrapeptid koji je vezan na aminoluciferin. Nakon oslobađanja aminoluciferina, on se oksidira uz ATP, ione magnezija i kisik pomoću enzima luciferaze i nastaje oksiaminoluciferin koji se pobuđuje, a tijekom vraćanja u osnovno stanje emitira svjetlost. Intenzitet emitirane svjetlosti proporcionalan je aktivnosti kaspaze. Reakciju prikazuje Slika 3. Ovisno o kaspazi koju želimo mjeriti, reagens sadrži određeni tetrapeptid prema kojem je kaspaza specifična (Adamova i sur., 2014; https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocol.pdf?la=en).



Slika 3. Kemiluminiscentna reakcija pomoću koje se određuje aktivnost kaspaze-1 (pristupljeno na: https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocol.pdf?la=en)

Metoda se može koristiti za ispitivanje aktivnosti kaspaza u lizatu stanica i u mediju za stanične kulture te aktivnosti pročišćenih kaspaza. Vrlo je jednostavna jer ne zahtijeva ispiranje stanica ni uklanjanje medija iznad stanica, a reagens sadrži i pufer za lizu stanica. Da bismo uklonili pozadinsku luminiscenciju, potrebna je slijepa proba u kojoj se čistom mediju za stanice dodaje reagens. Metoda je prikladna za korištenje na većem broju uzoraka i na mikrotitarskim pločicama. Intenzitet luminiscencije očitava se u čitaču mikrotitarskih pločica (https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocol.pdf?la=en).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

KOPB je progresivna kronična upalna bolest koja može biti i opasna po život, s čestim egzacerbacijama te komorbiditetima. Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da oko 3 milijuna ljudi godišnje umre od te bolesti, a više od 90 % smrtnih slučajeva javlja se u slabije razvijenim zemljama. Prema procjenama iz 2004. godine, oko 64 milijuna ljudi u svijetu boluje od te bolesti, a do 2030. godine KOPB će postati treći najčešći uzrok smrti u svijetu (http://www.who.int/respiratory/copd/en/).

Patogeneza KOPB-a je kompleksna i nije potpuno razjašnjena, a uključuje kroničnu upalu, infiltraciju upalnih stanica u plućima i oštećenje tkiva te sistemske učinke. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati djelovanje različitih koncentracija izvanstaničnog proteina Hsp70 te LPS-a i LTA preko receptora TLR2 i TLR4 na diferencirane monocite iz periferne krvi zdravih donora i na THP-1 stanice, te utvrditi dolazi li, i pri kojim koncentracijama, do aktivacije apoptoze i inflamasoma u ovim stanicama. Prisutnost upale i aktivacije inflamasoma ćemo ispitati mjerenjem aktivnosti kaspaze-1 u stanicama, a prisutnost apoptoze mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Aktivnost kaspaza-1, -3/7, -8 i -9 u diferenciranim THP-1 stanicama i monocitima odredili smo pomoću test paketa Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay, Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay i Caspase-Glo® 9 Assay (Promega).

3.1.1. Kemikalije

- RPMI medij (Capricorn) - sastav: RPMI 1640 medij + L-glutamin + HEPES; uz dodatak:
  - 0,6 mM natrijevog piruvata (Fluka)
  - 10 % telećeg fetalnog seruma koji je inaktiviran zagrijavanjem (Capricorn)
  - 1 % 100 puta koncentrirane otopine antimikotika i antibiotika - sastav: 10000 U/mL penicilina + 10 mg/mL streptomicina + 25 μg/mL amfotericina B (Lonza)
- 20 nM forbol 12-miristat-13-acetat (PMA) (Sigma-Aldrich)
- 1 % neesencijalne aminokiseline (Lonza)
- 1 % piruvat (Lonza)
- 25 mg/ml čimbenika koji stimulira rast makrofagnih kolonija (M-CSF) (PeproTech EC Ltd)
- tripansko plavilo (Sigma Aldrich)
- različite koncentracije otopina rekombinantnog humanog rhHsp70 proteina s niskom koncentracijom endotoksina LPS-a (0,27 ng/mL) (Enzo Life Sciences)
  - 0,3 μg/mL
  - 1 μg/mL
  - 3 μg/mL
  - 10 μg/mL
- 0,1 μg/mL LPS (Sigma-Aldrich)
- 1 μg/mL LTA (Invivogen)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica (R&D Systems)
- pokrovne folije (R&D Systems)

3.1.2. Reagensi u test paketima

- Caspase-Glo® 1 Assay (Promega)
  - 10 ml Caspase-Glo® 1 pufer
  - liofilizirani supstrat Z-WEHD
  - 2 x 30 µl inhibitora MG-132
  - 10 µl inhibitora Ac-YVAD-CHO
- Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega)
  - 10 ml Caspase-Glo® 3/7 pufer
  - liofilizirani supstrat Caspase-Glo® 3/7
- Caspase-Glo® 8 Assay (Promega)
  - 10 ml Caspase-Glo® 8 pufer
  - liofilizirani supstrat Caspase-Glo® 8
  - 30 µl inhibitora MG-132
- Caspase-Glo® 9 Assay (Promega)
  - 10 ml Caspase-Glo® 9 pufer
  - liofilizirani supstrat Caspase-Glo® 9
  - 30 µl inhibitora MG-132

3.1.3. Stanične linije

- THP-1 su stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta, u suspenziji su i rastu u manjim grudama
- monociti su izolirani iz periferne krvi zdravih ispitanika metodom razdvajanja magnetskim česticama obilježenim s CD14 (Lonza)

3.1.4. Aparat za detekciju

- čitač mikrotitarskih pločica Victor3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica

THP-1 stanice uzgajane su u kompletnom RPMI mediju koji se sastoji od RPMI 1640 medija s L-glutaminom i HEPES-om uz dodatak 0,6 mM natrijeva piruvata, 10 % telećeg fetalnog seruma koji je inaktiviran zagrijavanjem, 1 % 100 puta koncentrirane otopine antimikotika i antibiotika koji sadrži 10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 µg/mL amfotericina B. Stanice rastu u suspenziji i razrjeđuju se jednom do dva puta tjedno. Uvjeti u kojima se stanice uzgajaju su: temperatura 37 ˚C, vlažnost zraka 95 % i udio CO_2 5 %.

3.2.2. Nasađivanje stanica za pokus

THP-1 stanice se moraju prenijeti iz boca za uzgoj u sterilne epruvete i centrifugirati 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi. Nadsloj uklanjamo vakuum sisaljkom, a talog resuspendiramo u 1 mL medija za uzgoj stanica. Resuspendirane stanice pomiješaju se s otopinom tripanskog plavila u omjeru 1:40, dobro promiješaju i izbroje u Neubauerovoj komorici. Tripansko plavilo služi za razlikovanje mrtvih i živih stanica. Žive stanice aktivno izbacuju tripansko plavilo, dok mrtve stanice ostaju obojene. Nakon brojanja stanica, razrjeđujemo ih na potreban volumen i nasađujemo na mikrotitarske pločice s 96 jažica. Prije tretiranja, stanice se tijekom 48 sati diferenciraju u makrofage pomoću 20 nM PMA i inkubiraju u 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

Monociti se nakon izolacije nasađuju na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica gdje se diferenciraju u makrofage tijekom 7 dana pomoću 25 ng/ml M-CSF-a u kompletnom RPMI mediju uz dodatak 1 % neesencijalnih aminokiselina i 1 % piruvata. Prije diferencijacije, monociti su bili u suspenziji, no tijekom diferencijacije vezali su se na podlogu. Također se inkubiraju u 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.2.3. Tretiranje stanica

THP-1 stanice tretiraju se nakon 48 sati inkubacije s 20 nM PMA, a monociti nakon 7 dana inkubacije s M-CSF-om. Stanice tretiramo s rhHsp70, LPS-om i LTA prema koncentracijama navedenim u Tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije rhHsp70 proteina, LPS-a i LTA kojima tretiramo THP-1 stanice i monocite.

THP-1 stanice	monociti
0,3 μg/ml rhHsp70	1 μg/ml rhHsp70
1 μg/ml rhHsp70	3 μg/ml rhHsp70
3 μg/ml rhHsp70	10 μg/ml rhHsp70
0,1 μg/ml LPS	0,1 μg/ml LPS
1 μg/ml LTA	1 μg/ml LTA

3.2.4. Mjerenje

Ovisno o tome koju kaspazu određujemo, potreban je optimalan broj stanica po jažici. Za određivanje kaspaze-1 nasadili smo 50000 stanica po jažici, za kaspaze-3/7 20000 stanica po jažici, a za kaspaze-8 i -9 25000 stanica po jažici. U svakoj jažici nalazi se 100 μl suspenzije stanica. Na svakoj mikrotitarskoj pločici imamo jažice u kojima se nalazi slijepa proba i negativna kontrola. Kao slijepu probu koristili smo medij bez stanica, a kao negativnu kontrolu netretirane stanice. Za određivanje aktivnosti kaspaza koristili smo test pakete Caspase-Glo® koji sadrže potreban reagens. Nakon dodatka reagensa stanice se liziraju, oslobađaju se kaspaze i kidaju supstrat pa dolazi do luminiscencije čiji je intenzitet proporcionalan aktivnosti prisutne kaspaze. Reagens sadrži pufer koji osigurava optimalne uvjete za lizu stanica, aktivnost kaspaza i luciferaze.

3.2.4.1. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9

Aktivnost kaspaza-3/7, -8 i -9 u monocitima mjerili smo 6 sati i 8 sati nakon inkubacije s rhHsp70, LPS-om i LTA, a u THP-1 stanicama 2, 4, 6 i 8 sati nakon inkubacije. Reagens iz test paketa Caspase-Glo® priprema se na način da se liofiliziranom supstratu doda pufer u kojem se supstrat otapa. U pufer koji se koristi za određivanje kaspaza-8 i -9 dodaje se i MG-132, inhibitor proteasoma koji smanjuje intenzitet pozadinskog signala. 100 μl otopljenog reagensa dodaje se izravno u medij. Mikrotitarske pločice potrebno je lagano promiješati tijekom 30 sekundi, a nakon toga se inkubiraju 3 h na sobnoj temperaturi. Nakon 3 sata, na čitaču mikrotitarskih ploča mjeri se luminiscencija uzoraka. Supstrat kaspaze-3/7 je Z-DEVD-aminoluciferin, kaspaze-8 Z-LETD-aminoluciferin, a kaspaze-9 Z-LEHD-aminoluciferin.

3.2.4.2. Određivanje aktivnosti kaspaze-1

Aktivnost kaspaze-1 u monocitima mjerili smo 2 sata i 8 sati nakon inkubacije s rhHsp70, LPS-om i LTA, a u THP-1 stanicama 2, 4, 6 i 8 sati nakon inkubacije. Za određivanje aktivnosti kaspaze-1 koristimo dva reagensa. Prvi reagens iz test paketa Caspase-Glo® priprema se tako da se liofiliziranom supstratu Z-WEHD-aminoluciferinu doda pufer i MG-132, inhibitor proteasoma. Drugi reagens priprema se na isti način, no dodaje mu se još i inhibitor kaspaze-1 Ac-YVAD-CHO. Jednu polovicu mikrotitarske pločice inkubiramo s prvim reagensom, a drugu polovicu s drugim reagensom s inhibitorom kaspaze-1. 100 µl otopljenog reagensa dodaje se izravno u medij, lagano miješamo pločicu tijekom 30 sekundi i zatim se provodi inkubacija tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon 60, 90 i 120 minuta inkubacije mjeri se luminiscencija uzoraka na čitaču mikrotitarskih pločica. Intenzitet luminiscencije u jažicama s dodanim inhibitorom oduzima se od intenziteta luminiscencije u jažicama bez dodanog inhibitora. Na taj način dobivamo intenzitet luminiscencije koji potječe samo od aktivnosti kaspaze-1.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati analizirani su upotrebom programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, verzija 6.01). Statističke razlike između skupina testirane su testom za usporedbu više od dvije skupine podataka – testom jednosmjerne analize varijanci (ANOVA, *engl.* One Way Analysis of Variance) i Sidakovim testom značajnosti za *post hoc* analizu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti. Za statistički značajne razlike uzeta je vrijednost $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Rezultati za kaspaze-3/7, -8 i -9 su izraženi kao udio aktivnosti pojedinih kaspaza u tretiranim stanicama u odnosu na netretirane stanice, a rezultati za kaspazu-1 kao udio preostale aktivnosti nakon oduzimanja nespecifičnog luminiscentnog signala.

4.1.1. THP-1 stanice

4.1.1.1. Kaspaza-1

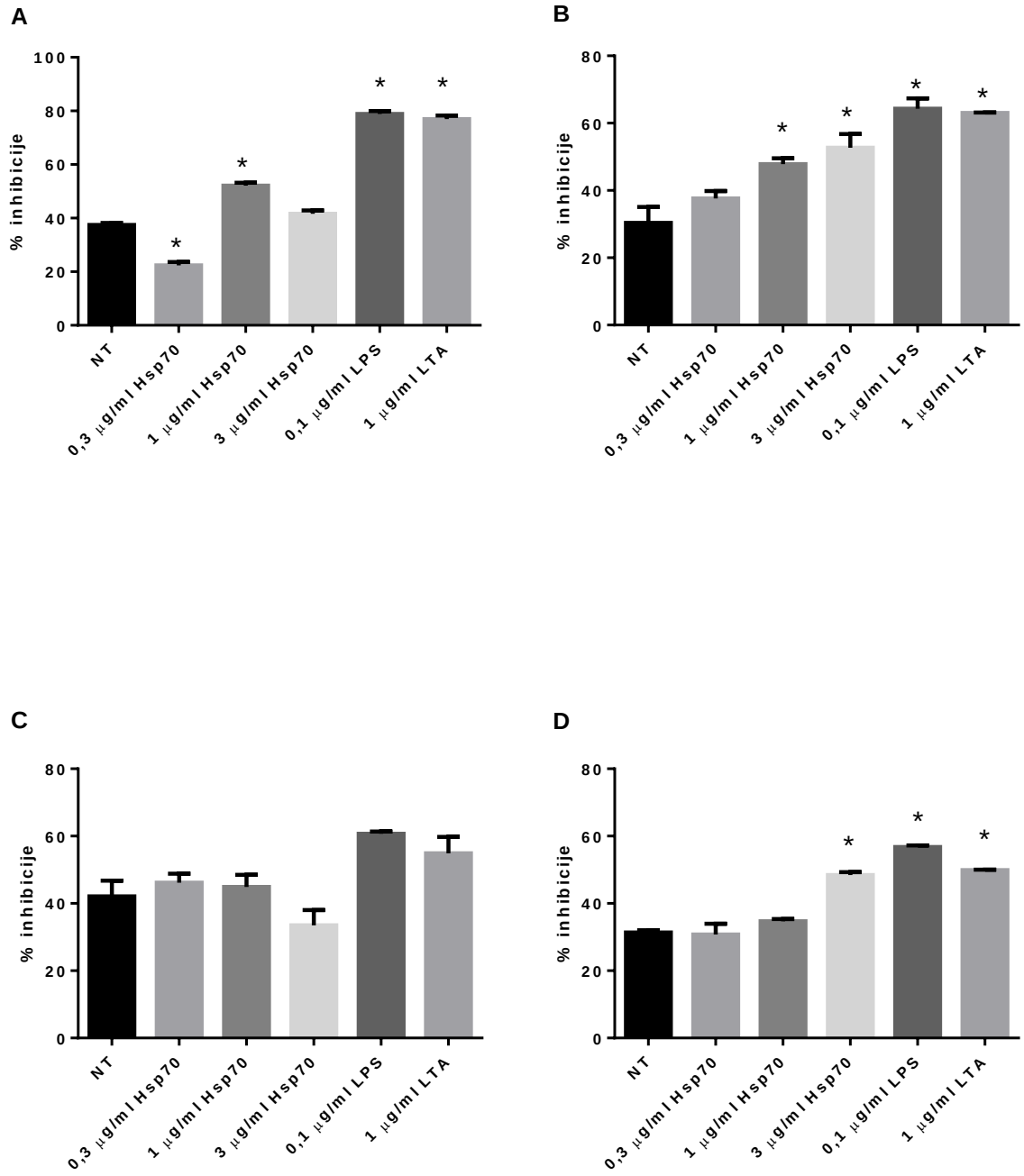
Određivanjem aktivnosti kaspaze-1 u THP-1 stanicama nakon 2 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3 i 1 μg/mL uočena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,0004$ i $P = 0,0005$), no nakon inkubacije s rhHsp70 u koncentraciji 3 μg/mL nije bilo statistički značajne razlike ($P = 0,1946$). Aktivnost kaspaze-1 statistički je značajno različita i viša u odnosu na netretirane stanice nakon 2 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA ($P < 0,0001$ i $P < 0,0001$).

Aktivnost kaspaze-1 u THP-1 stanicama nakon 4 h inkubacije s rhHsp70 u koncentraciji 0,3 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,5439$). Međutim, nakon inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3 μg/mL, uočena je statistički značajna razlika te je aktivnost kaspaze-1 viša nego u netretiranm stanicama ($P = 0,0342$ i $P = 0,0105$). Također, aktivnost kaspaze-1 statistički je značajno različita i viša u odnosu na netretirane stanice nakon 4 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA ($P = 0,0012$ i $P = 0,0014$).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-1 u THP-1 stanicama nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/mL nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,9612$, $P = 0,9922$ i $P = 0,5808$). Aktivnost kaspaze-1 nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice ni nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA ($P = 0,0654$ i $P = 0,2462$).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-1 u THP-1 stanicama nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3 i 1 μg/mL nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,9993$ i $P = 0,5612$). Aktivnost kaspaze-1 statistički je značajno različita i viša u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentraciji 3 μg/mL ($P = 0,0007$). Također, uočena je statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaze-1 u odnosu na

netretirane stanice nakon 8 h inkubacije s 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (P < 0,0001 i P = 0,0005).



Slika 4. Aktivnost kaspaze-1 u THP-1 stanicama nakon 2 sata (A), 4 sata (B), 6 sati (C) i 8 sati (D) inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70 te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA. NT = netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P < 0,05 (*).

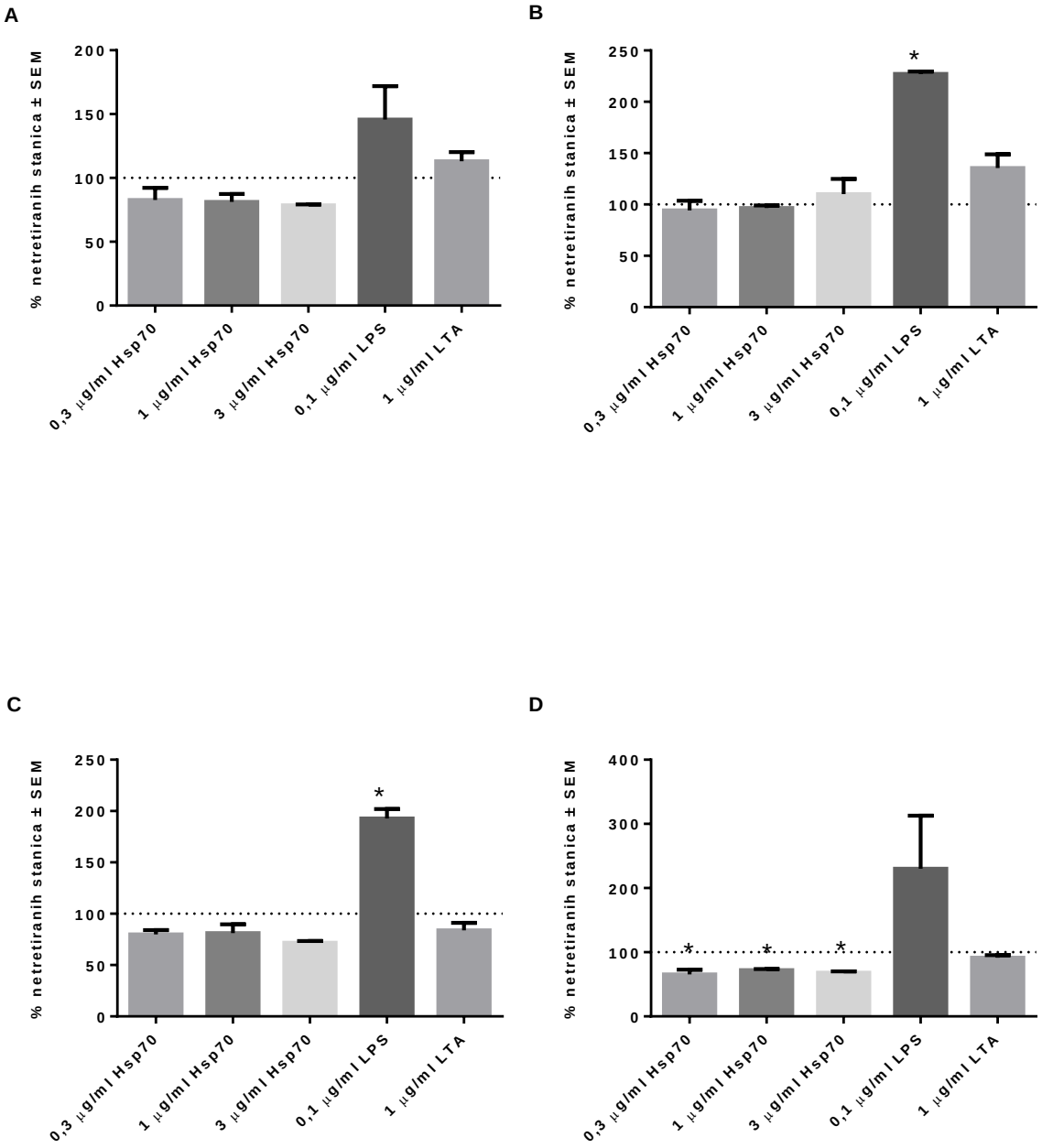
4.1.1.2. Kaspaze-3/7

Određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 2 h inkubacije s 0,3 µg/ml rhHsp70 nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,8820). Statistički značajna razlika nije uočena ni nakon 2 h inkubacije s koncentracijama od 1 i 3 µg/ml rhHsp70, kao ni kod inkubacije s 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (P = 0,8469, P = 0,7676, P = 0,1672 i P = 0,9578).

Određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 4 h inkubacije s koncentracijama od 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9969, P = 0,9997 i P = 0,9601). Aktivnost kaspaza-3/7 je statistički značajno viša u odnosu na netretirane stanice nakon 4 h inkubacije s 0,1 µg/mL LPS-a (P = 0,0004). Nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nakon 4 h inkubacije s 1 µg/mL LTA (P = 0,1715).

Određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 6 h inkubacije s koncentracijama od 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70, nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,2904, P = 0,3425 i P = 0,0963). Aktivnost kaspaza-3/7 je statistički značajno viša u odnosu na netretirane stanice nakon 6 h inkubacije s 0,1 µg/mL LPS-a (P = 0,0002). Nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nakon 6 h inkubacije s 1 µg/mL LTA (P = 0,4858).

Određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 8 h inkubacije s 0,3 µg/ml rhHsp70, uočena je statistički značajno snižena aktivnost (P = 0,0103). Također, statistički je značajno snižena aktivnost kaspaza-3/7 i nakon 8 h inkubacije s koncentracijama od 1 i od 3 µg/ml rhHsp70 (P = 0,0221 i P = 0,0140). Nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h inkubacije s 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (P = 0,2784 i P = 0,9914).



Slika 5. Aktivnost kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 2 sata (A), 4 sata (B), 6 sati (C) i 8 sati (D) inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70 te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P < 0,05$ (*).

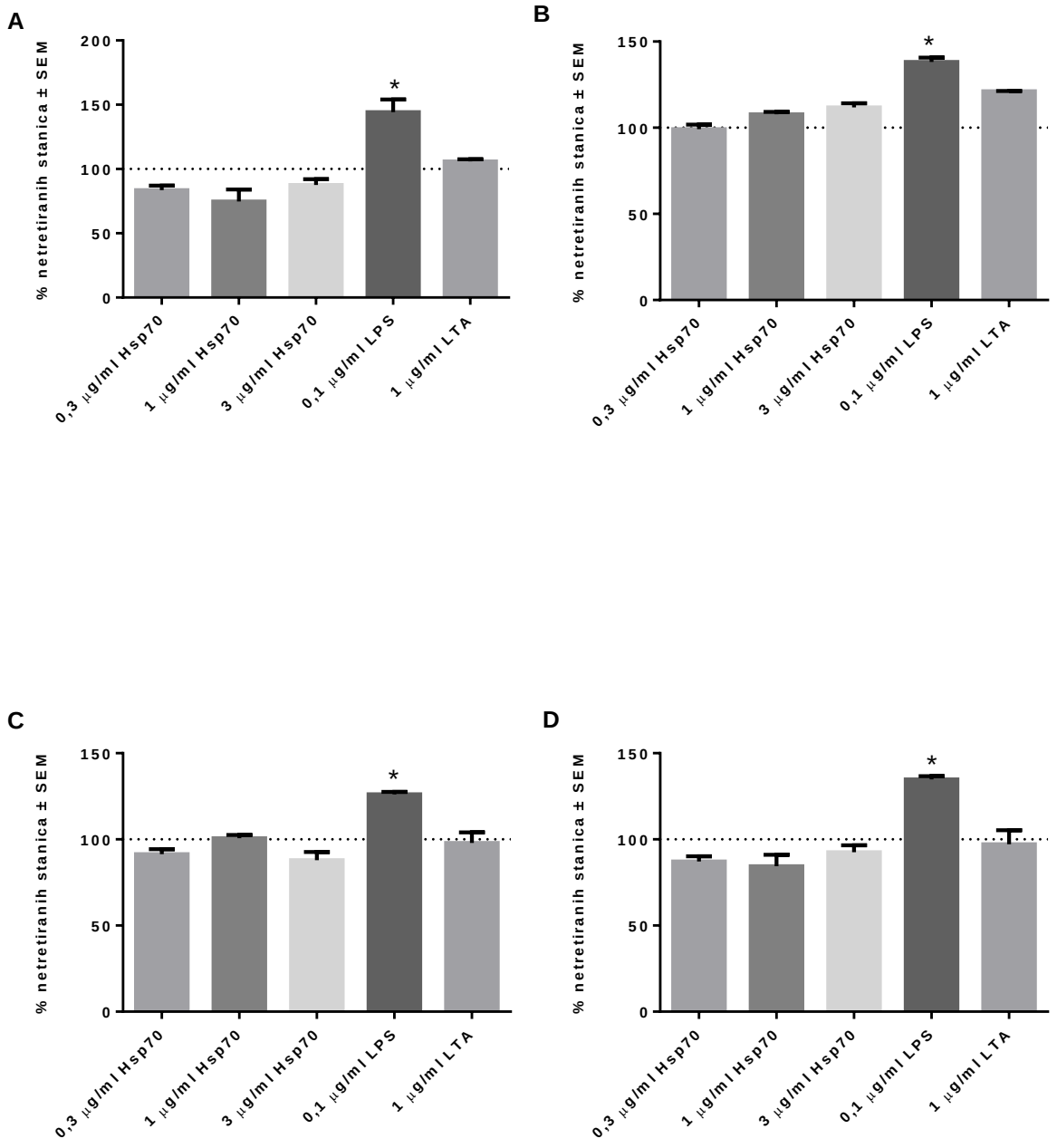
4.1.1.3. Kaspaza-8

Određivanjem aktivnosti kaspaze-8 u THP-1 stanicama nakon 2 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,6697, P = 0,2940 i P = 0,8532). Aktivnost kaspaze-8 je statistički značajno veća nakon 2 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0391). Statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaze-8 nakon 2 h inkubacije s 1 μg/mL LTA u odnosu na netretirane stanice nije uočena (P = 0,9925).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-8 u THP-1 stanicama nakon 4 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P > 0,9999, P = 0,9585 i P = 0,8251). Aktivnost kaspaze-8 je viša i statistički značajno različita nakon 4 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0477). Statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaze-8 nakon 4 h inkubacije s 1 μg/mL LTA u odnosu na netretirane stanice nije uočena (P = 0,3566).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-8 u THP-1 stanicama nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,5145, P > 0,9999 i P = 0,2294). Aktivnost kaspaze-8 je viša i statistički značajno različita nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0091). Statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaze-8 nakon 6 h inkubacije s 1 μg/mL LTA u odnosu na netretirane stanice nije uočena (P = 0,9968).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-8 u THP-1 stanicama nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,4285, P = 0,2704 i P = 0,8502). Aktivnost kaspaze-8 je viša i statistički značajno različita nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0104). Statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaze-8 nakon 8 h inkubacije s 1 μg/mL LTA u odnosu na netretirane stanice nije uočena (P = 0,9974).



Slika 6. Aktivnost kaspaze-8 u THP-1 stanicama nakon 2 sata (A), 4 sata (B), 6 sati (C) i 8 sati (D) inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70 te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P < 0,05$ (*).

4.1.1.4. Kaspaza-9

Određivanjem aktivnosti kaspaze-9 u THP-1 stanicama nakon 2 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9349, P = 0,9026 i P = 0,9536). Aktivnost kaspaze-9 nije statistički značajno različita ni nakon 2 h inkubacije s 0,1 μg/ml LPS-a i s 1 μg/ml LTA (P = 0,6327 i P = 0,9865).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-9 u THP-1 stanicama nakon 4 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9969, P = 0,2384 i P = 0,9284). Aktivnost kaspaze-9 nije statistički značajno različita ni nakon 4 h inkubacije s 0,1 μg/ml LPS-a (P = 0,8276) ni nakon 4 h inkubacije s 1 μg/ml LTA (P > 0,9999).

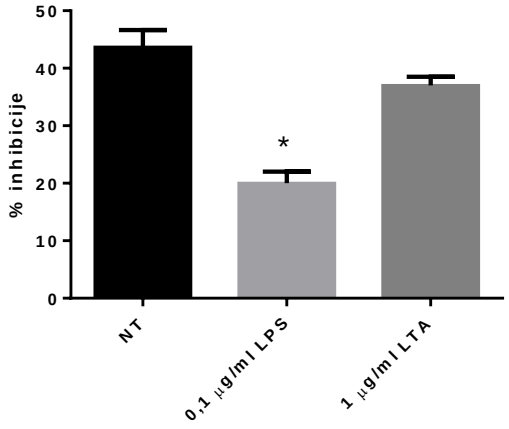
Određivanjem aktivnosti kaspaze-9 u THP-1 stanicama nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9849, P = 0,9696 i P = 0,8486). Aktivnost kaspaze-9 nije statistički značajno različita ni nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/ml LPS-a (P = 0,5564) ni nakon 6 h inkubacije s 1 μg/ml LTA (P = 0,8026).

Određivanjem aktivnosti kaspaze-9 u THP-1 stanicama nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/ml nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P > 0,9999, P = 0,6127 i P = 0,6397). Aktivnost kaspaze-9 nije statistički značajno različita ni nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/ml LPS-a i s 1 μg/ml LTA (P = 0,1654 i P = 0,8147).

4.1.2. Monociti

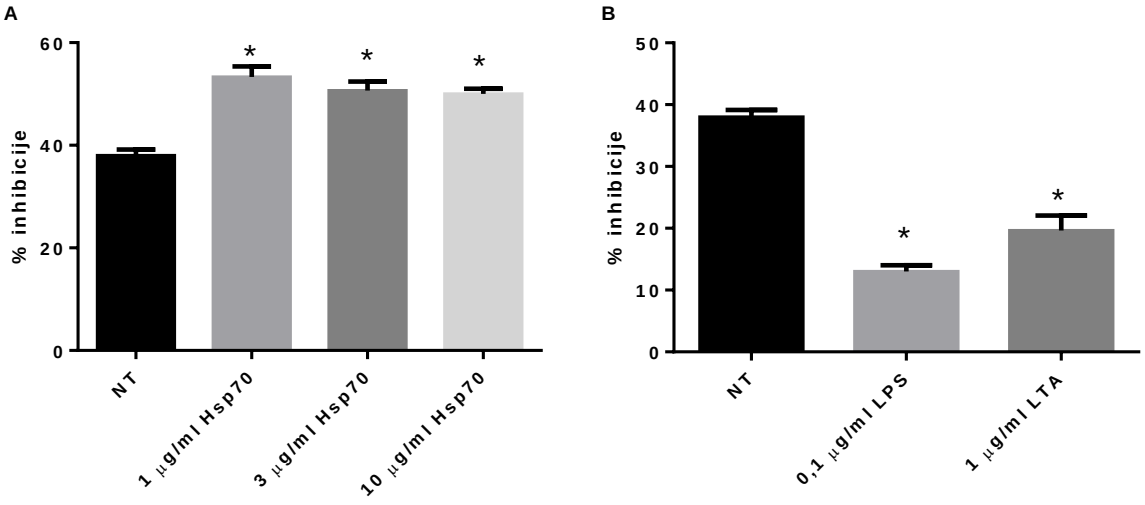
4.1.2.1. Kaspaza-1

Aktivnost kaspaze-1 u monocitima nakon 2 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1, 3 i 10 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9993, P = 0,3722 i P = 0,9976). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice uočena je nakon 2 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0006), no ne i nakon 2 h inkubacije s LTA (P = 0,1544).



Slika 7. Aktivnost kaspaze-1 u monocitima nakon 2 sata inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA. NT = netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P < 0,05 (*).

Aktivnost kaspaze-1 u monocitima nakon 8 h inkubacije s 1 μg/mL rhHsp70 statistički je značajno različita i viša u odnosu na netretirane stanice (P = 0,0008). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice uočena je i nakon 8 h inkubacije s 3 i 10 μg/mL rhHsp70 (P = 0,0024 i P = 0,0061). Nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a izmjerena aktivnost kaspaze-1 je statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P = 0,0005), a statistički značajna razlika uočena je i nakon inkubacije s 1 μg/mL LTA (P = 0,0013).



Slika 8. Aktivnost kaspaze-1 u monocitima nakon 8 sati inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70 (A) te 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA (B). NT = netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P < 0,05$ (*).

4.1.2.2. Kaspaze-3/7

Aktivnost kaspaza-3/7 u monocitima nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1, 3 i 10 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,5651$, $P = 0,2986$ i $P = 0,6906$). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nije uočena ni nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a ni s 1 μg/mL LTA ($P = 0,0651$ i $P = 0,5826$).

Ni nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1, 3 i 10 μg/mL nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti kaspaza-3/7 u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,8939$, $P = 0,4628$ i $P = 0,1339$). Aktivnost kaspaza-3/7 nije statistički značajno različita nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a ni s 1 μg/mL LTA ($P = 0,9800$ i $P = 0,0568$).

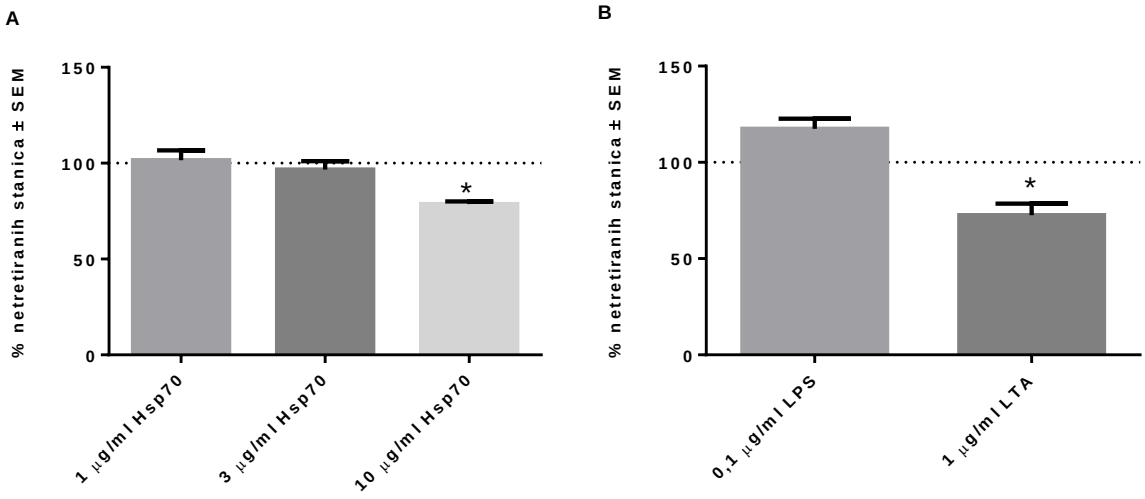
4.1.2.3. Kaspaza-8

Aktivnost kaspaze-8 u monocitima nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1, 3 i 10 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice ($P = 0,6228$, $P = 0,9977$ i $P > 0,9999$). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nije uočena ni nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a ni s 1 μg/mL LTA ($P = 0,5126$ i $P = 0,9434$).

Aktivnost kaspaze-8 u monocitima nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1, 3 i 10 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P = 0,7848, P = 0,6214 i P = 0,9944). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nije uočena ni nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a ni s 1 μg/mL LTA (P = 0,9852 i P = 0,9587).

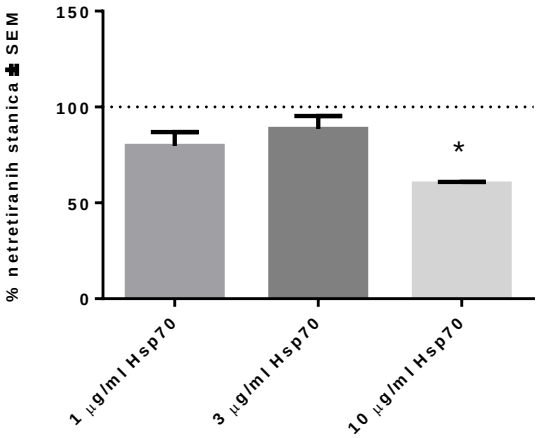
4.1.2.4. Kaspaza-9

Aktivnost kaspaze-9 u monocitima nakon 6 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P = 0,9841 i P = 0,8421), no nakon inkubacije s rhHsp70 u koncentraciji od 10 μg/mL uočena je statistički značajna razlika (P = 0,0049). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nije uočena nakon 6 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a (P = 0,0742), međutim nakon inkubacije s 1 μg/mL LTA aktivnost kaspaze-9 bila je statistički značajno snižena (P = 0,0119).



Slika 9. Aktivnost kaspaze-9 u monocitima nakon 6 sati inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70 (A) te 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA (B). Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P < 0,05 (*).

Aktivnost kaspaze-9 u monocitima nakon 8 h inkubacije s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3 μg/mL nije statistički značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P = 0,0717 i P = 0,3094), no nakon inkubacije s rhHsp70 u koncentraciji od 10 μg/mL uočena je statistički značajna razlika (P = 0,0013). Statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nije uočena nakon 8 h inkubacije s 0,1 μg/mL LPS-a ni s 1 μg/mL LTA (P = 0,5406 i P = 0,0689).



Slika 10. Aktivnost kaspaze-9 u monocitima nakon 8 sati inkubacije s različitim koncentracijama rhHsp70. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P < 0,05$ (*).

4.2. Rasprava

Proveli smo istraživanje u kojem smo kao modele sistemske upale u KOPB-u koristili THP-1 staničnu liniju koja predstavlja monocitno-makrofagnu lozu te primarne stanice, monocite iz periferne krvi zdravih ispitanika. Stanice smo tretirali različitim koncentracijama rhHsp70 koji se kod bolesnika s KOPB-om može naći u izvanstaničnom prostoru i djelovati kao DAMP molekula na receptore TLR2 i TLR4. Kao poznate ligande receptora TLR2 i TLR4 koristili smo LPS i LTA. Da bismo ispitali uzrokuju li rhHsp70, LPS i LTA upalu i apoptozu THP-1 stanica i monocita, izmjerili smo aktivnost kaspaza.

Aktivne kaspaze često se određuju mjerenjem koncentracije metodom Western blot i enzimimunokemijskom metodom (ELISA, *engl*. enzyme-linked immunosorbent assay). Aktivnost kaspaze-1 može se procijeniti na temelju koncentracije oslobođenih citokina, IL-1β ili IL-18. Pritom se koriste imunokemijske metode koje zahtijevaju veći broj koraka i ne mjere aktivnost kaspaze. U našem istraživanju koristili smo Caspase-Glo® testove koji se temelje na bioluminiscenciji produkta enzimske reakcije i mjere aktivnost kaspaza. Kao supstrat enzimske reakcije koristi se tetrapeptid s vezanim luciferinom kojeg kaspaza kida na specifičnom mjestu. Budući da i proteasom može pokidati tetrapeptid, u reagens je potrebno dodati inhibitor proteasoma MG-132. Također, tetrapeptid koji je supstrat kaspaze-1 nije specifičan samo za kaspazu-1, već ga kidaju i druge kaspaze, pa je za točno određivanje aktivnosti kaspaze-1 potrebno dodati i inhibitor kaspaze-1 tako da se odredi luminiscentni signal koji potječe od aktivnosti kaspaze-1 i ostalih kaspaza, te signal koji potječe samo od aktivnosti drugih kaspaza. Razlika između ta dva signala daje signal koji potječe isključivo od aktivnosti kaspaze-1 (O'Brien i sur., 2017).

Korišteni testovi za određivanje aktivnosti kaspaza mogu se koristiti u ispitivanjima na različitim vrstama stanica, neovisno o tome radi li se o aktivnosti kaspaza u stanicama ili u mediju iznad stanica (O'Brien i sur., 2017). Prednost bioluminiscencije je da nema pozadinskog signala ili je on vrlo slab pa je metoda vrlo osjetljiva. Istraživanje koje je provedeno da bi se usporedile metode određivanja kaspaze-3 pokazalo je da je bioluminiscentni test Caspase-Glo® dva reda veličine osjetljiviji od ELISA metode određivanja koncentracije aktivne kaspaze-3 koja za detekciju koristi kemiluminiscenciju te da je bioluminiscentni test brži i jednostavniji za izvođenje (Liškova i sur., 2013).

U našem istraživanju izlaganje THP-1 stanica LPS-u i LTA uzrokovalo je značajni porast aktivnosti kaspaze-1 u odnosu na netretirane stanice nakon 2, 4 i 8 sati inkubacije. Ovi

rezultati u skladu su s porastom izlučivanja IL-1β ovisnog o kaspazi-1 u THP-1 stanicama nakon izlaganja LPS-u kojeg su uočili Wynick i sur. (Wynick i sur., 2016) te u skladu s porastom koncentracije mRNA prokaspaze-1 u stanicama plućnog tkiva nakon izlaganja LPS-u (Eltom i sur., 2011). Unatoč tome, Eltom i sur. nisu uočili porast aktivnosti kaspaze-1 u stanicama plućnog tkiva.

Ispitivanjem aktivnosti kaspaze-1 u monocitima zdravih donora, uočili smo pad aktivnosti kaspaze-1 nakon 2 h inkubacije s LPS-om, a nakon 8 h pad aktivnosti uočen je nakon inkubacije s LPS-om i s LTA.

Wang i sur. su istraživali razinu ekspresije kaspaze-1 u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi i u stanicama tkiva pluća bolesnika s KOPB-om te uočili značajno povišene razine mRNA kaspaze-1 kod bolesnika u akutnoj egzacerbaciji u odnosu na bolesnike koji se oporavljaju od akutne egzacerbacije, u odnosu na bolesnike koji su u stabilnoj fazi bolesti i u odnosu na zdrave pušače. Osim toga, utvrdili su i da postoji korelacija između koncentracije bakterija u bronhoalveolarnom ispirku tijekom akutne egzacerbacije i razine mRNA kaspaze-1 u stanicama plućnog tkiva (Wang i sur., 2018). Također, Faner i sur. nisu uočili značajni porast ekspresije kaspaze-1 u stanicama plućnog tkiva bolesnika u stabilnoj fazi KOPB-a, no primijetili su da je koncentracija kaspaze-1 povišena u sputumu bolesnika u egzacerbaciji koja je uzrokovana infekcijom (Faner i sur., 2016). Razlike u našim rezultatima i rezultatima Wang i sur. moguće su jer smo mi mjerili aktivnost kaspaze-1, a ne razinu ekspresije. Osim toga, proveli smo ispitivanje na monocitima zdravih ispitanika, a ne bolesnika s KOPB-om.

Jedno istraživanje pokazalo je da izlaganje monocita izoliranih iz krvi LPS-u uzrokuje aktivaciju kaspaze-1 i posljedično lučenje citokina, dok izlaganje makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita ne uzrokuje aktivaciju kaspaze-1. S druge strane, THP-1 stanice nemaju aktiviranu kaspazu-1 nakon izlaganja LPS-u, no ako ih se inkubira s PMA i diferencira u makrofage, kaspaza-1 se aktivira (Netea i sur., 2009). Ovi rezultati u skladu su s onima koje smo mi dobili.

Izlaganje monocita dobivenih iz uzoraka periferne krvi zdravih pojedinaca različitim koncentracijama rhHsp70 proteina uzrokovalo je statistički značajan porast aktivnosti kaspaze-1 nakon 8 sati inkubacije, dok nakon 2 sata inkubacije nismo uočili porast aktivnosti. U THP-1 stanicama tretiranim s rhHsp70 proteinom u različitim koncentracijama uočeno je da je aktivnost kaspaze-1 značajno snižena nakon 2 sata inkubacije s 0,3 μg/mL, dok je nakon 2 h inkubacije s 1 μg/mL rhHsp70 aktivnost povišena. Također, aktivnost je povišena i nakon 4 h inkubacije s koncentracijama 1 i 3 μg/mL, kao i nakon 8 h inkubacije s 3 μg/mL rhHsp70 proteina. Ovi rezultati upućuju na to da je učinak rhHsp70 proteina na THP-1 stanice ovisan o

koncentraciji i duljini izlaganja stanica rhHsp70 proteinu, pa tako nakon 2 h niske koncentracije proteina djeluju zaštitno, dok pri višim koncentracijama rhHsp70 i nakon duljeg vremena izlaganja dolazi do aktivacije inflamasoma i porasta aktivnosti kaspaze-1.

Istraživanje Romao-Veige i sur. na monocitima iz periferne krvi trudnica s preeklampsijom pokazalo je da je i u toj sistemskoj bolesti u serumu prisutna povišena koncentracija DAMP molekula, među kojima i Hsp70 proteina, no njihovi rezultati nisu pokazali da izlaganje monocita eHsp70 proteinu dovodi do aktivacije kaspaze-1. Međutim, u svom istraživanju koristili su tisuću puta manju koncentraciju rhHsp70 proteina kojom su tretirali monocite (Romao-Veiga i sur., 2018).

Izlaganje THP-1 stanica LPS-u uzrokovalo je aktivaciju kaspaza-3/7 nakon 4 i 6 sati inkubacije te aktivaciju kaspaze-8 nakon 2, 4, 6 i 8 sati inkubacije, dok se aktivnost kaspaze-9 nije značajno promijenila. Ovi rezultati upućuju na to da je LPS uzrokovao aktivaciju vanjskog puta apoptoze.

Sličan rezultat dobiven je u istraživanju u kojem su THP-1 stanice bile izložene LPS-u tijekom 168 sati. Pritom je povećana koncentracija kaspaze-3 bila zabilježena tek pri primjeni 20 μg/mL LPS-a. S druge strane, u pokusu je korištena imunokemijska metoda za određivanje koncentracije aktivne kaspaze-3, a ne metoda određivanja aktivnosti kaspaze-3 (Mytych i sur., 2017).

Harrison i sur. ispitivali su djelovanje LPS-a na nediferencirane i diferencirane THP-1 stanice i utvrdili da kod nediferenciranih stanica LPS uzrokuje apoptozu, no tek nakon dugotrajne izloženosti, dok su diferencirane stanice pod utjecajem LPS-a brzo ulazile u apoptozu. Također su ustanovili da je pritom bila povišena aktivnost kaspaze-3 (Harrison i sur., 2005).

Liu i sur. također su ispitivali djelovanje LPS-a na THP-1 stanice. Kao i mi, zabilježili su povećanje aktivnosti kaspaze-8, no, za razliku od nas, uočili su i aktivaciju kaspaze-9 te su zaključili da LPS potiče vanjski i unutarnji put aktivacije apoptoze. Vanjski put aktivira se djelovanjem liganda sličnog TNF-u koji potiče apoptozu (TRAIL, *engl*. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) na receptore smrti (DR, *engl*. death receptor) DR4 i DR5, a unutarnji put aktivira se jer LPS inhibira transkripciju Bcl-2 proteina, a potiče transkripciju apoptoznih molekula Noxa i Puma (Liu i sur., 2016).

S druge strane, jedno istraživanje pokazalo je da LPS ne uzrokuje apoptozu THP-1 stanica (Li i sur., 2005.), no pritom aktivnost kaspaza nije bila izravno izmjerena.

U diferenciranim monocitima koje smo izlagali LPS-u ili LTA, kaspaze-3/7, -8 i -9 nisu se aktivirale, dok se aktivnost kaspaze-9 značajno smanjila nakon tretiranja s LTA.

Jedno starije istraživanje pokazalo je da svježi monociti iz periferne krvi ulaze u apoptozu ako ne primaju signale koji potiču preživljavanje, no ako su izloženi LPS-u, ne ulaze u apoptozu, što je u skladu s našim rezultatima prema kojima LPS ne uzrokuje aktivaciju apoptoznih kaspaza (Fahy i sur., 1999). Nekoliko istraživanja pokazalo je da LTA inhibira apoptozu kod neutrofila (Vinokurov i sur., 2012; Lotz i sur., 2004), a naše ispitivanje pokazuje da to vrijedi i za monocite.

Izvanstanični Hsp70 u našem radu nije uzrokovao aktivaciju apoptoznih kaspaza ni u THP-1 stanicama ni u monocitima, već je doveo do smanjenja aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama nakon 8 sati izlaganja pri svim primijenjenim koncentracijama rhHsp70. U monocitima je koncentracija od 10 μg/mL uzrokovala pad aktivnosti kaspaze-9 nakon 6 i nakon 8 sati izlaganja. Izvanstanični Hsp70 nije uzrokovao promjenu aktivnosti kaspaze-8.

Zaštitno djelovanje izvanstaničnog Hsp70 dokazano je i u istraživanjima u kojima je izlaganje eHsp70 proteinu dovelo do inhibicije apoptoze u promonocitnoj staničnoj liniji U-937 (Guzhova i sur., 1998) te u neutrofilima (Yurinskaya i sur., 2017).

Također, istraživanje Luo i sur. pokazalo je da izvanstanični Hsp70 sprječava aktivaciju kaspaza-3 i -9 te apoptozu u Schwannovim stanicama štakora koje su bile tretirane vodikovim peroksidom te uzrokuje porast koncentracije Bcl-2 proteina u stanici (Luo i sur., 2012). Slično istraživanje provedeno je na staničnoj liniji U-937, pri čemu su stanice također tretirane vodikovim peroksidom, a eHsp70 spriječio je aktivaciju kaspaze-3 i apoptozu (Franco i sur., 2016).

Nekoliko istraživanja pokazalo je da eHsp70 inhibira apoptozu motornih neurona uzrokovanu nedostatkom faktora rasta neurona ili stresom. Pritom je eHsp70 uzrokovao i pad aktivnosti kaspaze-3 (Robinson i sur., 2005; Tidwell i sur., 2004).

5. ZAKLJUČCI

- Tretiranje THP-1 stanica s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA tijekom 2, 4 i 8 sati uzrokuje aktivaciju kaspaze-1 i upalu.

- Tretiranje monocita s 0,1 μg/mL LPS-a tijekom 2 sata i s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA tijekom 8 sati dovodi do smanjenja aktivnosti kaspaze-1.

- Učinak rhHsp70 proteina na THP-1 stanice ovisi o koncentraciji i trajanju izlaganja tako da 0,3 μg/mL rhHsp70 nakon 2 sata izlaganja uzrokuje pad aktivnosti kaspaze-1, dok 1 μg/mL rhHsp70 nakon 2 i 4 sata izlaganja te 3 μg/mL rhHsp70 nakon 4 i 8 sati izlaganja uzrokuje porast aktivnosti kaspaze-1.

- Nakon 8 sati izlaganja monocita izvanstaničnom Hsp70 u svim primijenjenim koncentracijama aktivnost kaspaze-1 je povećana.

- Tretiranje THP-1 stanica s 0,1 μg/mL LPS-a tijekom 4 i 6 sati uzrokuje porast aktivnosti kaspaza-3/7, a nakon 2, 4, 6 i 8 sati izlaganja povećava se i aktivnost kaspaze-8. Aktivnost kaspaze-9 ne mijenja se nakon izlaganja korištenim agensima.

- Izvanstanični Hsp70 u koncentracijama od 0,3, 1 i 3 μg/mL tijekom 8 sati uzrokuje pad aktivnosti kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama, dok na druge ispitivane apoptozne kaspaze ne utječe.

- Aktivnost kaspaza-3/7 i kaspaze-8 u monocitima nije promijenjena nakon izlaganja korištenim agensima.

- Aktivnost kaspaze-9 u monocitima smanjuje se nakon 6 sati izlaganja rhHsp70 proteinu u koncentraciji 10 μg/mL i 1 μg/mL LTA te nakon 8 sati tretiranja s 10 μg/mL rhHsp70.

- LPS i LTA uzrokuju upalu u THP-1 stanicama, a LPS dodatno uzrokuje i apoptozu u kojoj je aktiviran vanjski put.

- rhHsp70 u nižim koncentracijama i nakon kraćeg vremena inkubacije djeluje zaštitno na THP-1 stanice i sprječava upalu, dok pri višim koncentracijama i nakon duljeg

vremena izlaganja uzrokuje aktivaciju inflamasoma i upalu. S druge strane, rhHsp70 sprječava apoptozu THP-1 stanica.

- LPS i LTA ne uzrokuju aktivaciju inflamasoma ni apoptozu kod monocita, a LTA čak djeluje i zaštitno te sprječava apoptozu monocita.
- rhHsp70 potiče aktivaciju inflamasoma i upalu kod monocita te sprječava aktivaciju unutarnjeg puta apoptoze.

6. LITERATURA

1. Adamova E, Liškova M, Matalova E, Kleparnik K. A miniaturized device for bioluminescence analysis of caspase-3/7 activity in a single apoptotic cell. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406, 5389-5394.
2. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138, 16-27.
3. Bezemer GFG, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G. Dual Role of Toll-Like Receptors in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*, 2012, 64, 337-358.
4. Bohannon JK, Hernandez A, Enkhbaatar P, Adams WL, Sherwood ER. The Immunobiology of TLR4 Agonists: From Endotoxin Tolerance to Immunoadjuvants. *Shock*, 2013, 40, 451-462.
5. Boland K, Flanagan L, Prehn JHM. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e725.
6. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*, 2013, 14, 32.
7. Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, Kuchmiy A, Lamkanfi M. Inflammasomes in Respiratory Disease. *CHEST*, 2014, 145, 1211-1133.
8. Chan SL, Yu VC. Proteins of the Bcl-2 Family in Apoptosis Signalling: From Mechanistic Insights to Therapeutic Opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31, 119-128.
9. Cuda CM, Pope RM, Perlman H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12, 543-558.
10. de Marco R, Accordini S, Marcon A, Cerveri I, Anto JM, Gislason T, Heinrich J, Janson C, Jarvis D, Kuenzli N, Leynaert B, Sunyer J, Svanes C, Wjst M, Burney P. Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a European Cohort of Young Adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183, 891–897.
11. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*, 2006, 7, 53.
12. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6, a016287.

13. Dong YP, Chen G, Zhou Y, Zhu JJ. Electrochemiluminescent sensing for caspase-3 activity based on $Ru(bpy)_3^{2+}$-doped silica nanoprobe. *Anal Chem*, 2016, 88, 1922-1929.
14. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR. An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 693–718.
15. Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, Catley MC, Belvisi MG, Birrell MA. P2X7 Receptor and Caspase 1 Activation Are Central to Airway Inflammation Observed after Exposure to Tobacco Smoke. *PLoS one*, 2011, 9, e24097.
16. Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD. Spontaneous Human Monocyte Apoptosis Utilizes a Caspase-3-Dependent Pathway That Is Blocked by Endotoxin and Is Independent of Caspase-1. *J Immunol*, 1999, 163, 1755-1762.
17. Faner R, Sobradillo P, Noguera A, Gomez C, Cruz T, Lopez-Giraldo A, Ballester E, Soler N, Arostegui JI, Pelegrin P, Rodriguez-Roisin R, Yagüe J, Cosio BG, Juan M, Agusti A. The inflammasome pathway ins table COPD and acute exacerbations. *ERJ Open Res*, 2016, 3, pii:00002-2016.
18. Franco L, Terrinca J, Rodriguez AB, Espino J, Pariente JA. Extracellular heat shock proteins protect U937 cells from H_2O_2-induced apoptotic cell death. *Mol Cell Biochem*, 2016, 412, 19-26.
19. Gershon AS, Warner L, Cascagnette P, Victor JC, To T. Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. *Lancet*, 2011, 378, 991-996.
20. Giffard RG, Han R, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia – the complex roles of Heat Shock Protein 70. *Anesthesiology*, 2008, 109, 339-348.
21. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease (2018 report), 2018., www.goldcopd.org/gold-reports/, pristupljeno 6.4.2018.
22. Grabiec AM, Hussell T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin Immunopathol*, 2016, 38, 409-423.

23. Guzhova IV, Arnholdt ACV, Darieva ZA, Kinev AV, Lasunskaia EB, Nilsson K, Bozhkov VM, Voronin AP, Margulis BA. Effects of exogenous stress protein 70 on the functional properties of human promonocytes through binding to cell surface and internalization. *Cell Stress Chaperones*, 1998, 3, 67-77.
24. Harrison LM, Cherla RP, van den Hoogen C, van Haaften WCE, Lee SY, Tesh VL. Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in human monocytic and macrophage-like cells. *Microb Pathog*, 2005, 38, 63-76.
25. Hirsch MI, Junger WG. Roles of Heat Shock Proteins and γδT Cells in Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39, 509–513.
26. Hoenderdos K, Condliffe A. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48, 531-539.
27. Kennedy D, Jäger R, Mosser DD, Samali A. Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins. *IUBMB Life*, 2014, 66, 327-338.
28. Kricka LJ, Park JY. Optical Techniques. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, urednici, St Louis, Elsevier, 2012, 233-257.
29. Kwak MS, Lim M, Lee YJ, Lee HS, Kim YH, Youn JH, Choi JE, Shin JS. HMGB1 Binds to Lipoteichoic Acid and Enhances TNF-α and IL-6 Production through HMGB1-Mediated Transfer of Lipoteichoic Acid to CD14 and TLR2. *J Innate Immun*, 2015, 7, 405-416.
30. Lange P, Celli B, Agusti A, Jensen GB, Divo M, Faner R, Guerra S, Marott JL, Martinez FD, Martinez-Camblor P, Meek P, Owen CA, Petersen H, Pinto-Plata V, Schnohr P, Sood A, Soriano JB, Tesfaigzi Y, Vestbo J. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*, 2015, 373, 111-122.
31. Li T, Hu J, Thomas JA, Li L. Differential induction of apoptosis by LPS and taxol in monocytic cells. *Mol Immunol*, 2005, 42, 1049-1055.
32. Liškova M, Kleparnik K, Matalova E, Hegrova J, Přikryl J, Švandova E, Foret F. Bioluminescence determination of active caspase-3 in single apoptotic cells. *Electrophoresis*, 2013, 34, 1772-1777.
33. Liu B, Sun R, Luo H, Liu X, Jiang M, Yuan C, Yang L, Hu J. Both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cell death in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology*, 2016, 222, 198-205.

34. Liu X, Liebermann J. A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. *Adv Immunol*, 2017, 135, 81-117.
35. Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive Care Med*, 2010, 36, 1826-1835.
36. Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol*, 2004, 75, 467-477.
37. Luo X, Tao L, Lin P, Mo X, Chen H. Extracellular Heat Shock Protein 72 Protects Schwann Cells From Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis. *J Neurosci Res*, 2012, 90, 1261-1269.
38. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2, 258–266.
39. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*, 2015, 265, 6-21.
40. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 7, 1-9.
41. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SPS. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis*, 2016, 20, 193-204.
42. Mytych J, Romerowicz-Misielak M, Koziorowski M. Long-term culture with lipopolysaccharide induces dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects in THP-1 monocytes. *Toxicol In Vitro*, 2017, 42, 1-9.
43. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JWM, Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages. *Blood*, 2009, 113, 2324-2335.
44. O'Brien M, Moehring D, Munoz-Planillo R, Nunez G, Callaway J, Ting J, Scurria M, Ugo T, Bernad L, Cali J, Lazar D. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *J Immunol Methods*, 2017, 447, 1-13.
45. Promega, Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay, Technical Manual, 2015, https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocol.pdf?la=en, pristupljeno 24.3.2018.

46. Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20, 885-892.
47. Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE. Extracellular Heat Shock Protein 70: A Critical Component for Motoneuron Survival. *J Neurosci*, 2005, 42, 9735-9745.
48. Romão-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine*, 2018, 105, 23-31.
49. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*, 2009, 374, 733-743.
50. Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biologica*, 2005, 51, 148-156.
51. Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *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.
52. Sevin M, Girodon F, Garrido C, de Thonel A. HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm*, 2015, 21, 1-8.
53. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, 2015, 22, 526-539.
54. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, 2016, 213, 617-629.
55. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner Caspase-3, -6 and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J Biol Chem*, 2001, 276, 7320-7326.
56. Solier S, Fontenay M, Vainchenker W, Droin N, Solary E. Non-apoptotic functions of caspases in myeloid cell differentiation. *Cell Death Differ*, 2017, 24, 1337-1347.
57. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immun*, 2014, 20, 115-125.

58. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet*, 2007, 370, 758-764.
59. Stoller JK, Aboussouan LS. α1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005, 365, 2225-2236.
60. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*, 2016, 100, 961-967.
61. Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise R, The Lung Health Study Research Group 4. The Lung Health Study: Airway Responsiveness to Inhaled Methacholine in Smokers with Mild to Moderate Airflow Limitation. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145, 301-310.
62. Tidwell JL, Houenou LJ, Tytell M. Administration of Hsp70 in vivo inhibits motor and sensory neuron degeneration. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9, 88-98.
63. Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2012, 122, 2749–2755.
64. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*, 2017, 277, 76-89.
65. Vinokurov M, Ostrov V, Yurinskaya M, Garbuz D, Murashev A, Antonova O, Evgen'ev M. Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal level. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17, 89-101.
66. Wang H, Lv C, Wang S, Ying H, Weng Y, Yu W. NLRP3 Inflammasome Involves in the Acute Exacerbation of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation*, 2018, doi: 10.1007/s10753-018-0780-0.
67. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*, 1999, 29, 748-751.
68. WHO, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2017., http://www.who.int/respiratory/copd/en/, pristupljeno 25.3.2018.
69. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activity and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*, 2012, 318, 1213-1220.
70. Wynick C, Petes C, Tigert A, Gee K. Lipopolysaccharide-Mediated Induction of Concurrent IL-1β and IL-23 Expression in THP-1 Cells Exhibits Differential Requirements for Caspase-1 and Cathepsin B Activity. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36, 477-487.

71. Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 476, 28-37.
72. Yaron J. Ion Flux Regulates Inflammasome Signaling., 10.13140/RG.2.2.32297.60007 https://www.researchgate.net/publication/316635702_Ion_Flux_Regulates_Inflammasome_Signaling, pristupljeno 14.4.2018.
73. Yurinskaya MM, Kochetkova OY, Shabarchina LI, Antonova OY, Suslikov AV, Evgen'ev MB, Vinokurov MG. Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNFα in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22, 163-171.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Izvanstanični protein Hsp70 djeluje kao molekularni obrazac oštećenja (DAMP, *engl*. damage-associated molecular pattern) preko receptora sličnog Tollu TLR2 i TLR4 te može uzrokovati upalni odgovor. Povišen je u krvi bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti. Patogeneza te bolesti uključuje kroničnu upalu i oštećenje tkiva, no nije potpuno razjašnjena. Cilj rada bio je ispitati djelovanje različitih koncentracija izvanstaničnog proteina Hsp70 te lipopolisaharida (LPS) i lipoteikoične kiseline (LTA) preko receptora TLR2 i TLR4 na diferencirane monocite iz periferne krvi zdravih donora i na THP-1 stanice, te utvrditi uzrokuju li aktivaciju inflamasoma i programirane stanične smrti (apoptoze). Prisutnost upale i aktivacije inflamasoma ispitani su mjerenjem aktivnosti kaspaze-1 u stanicama, a prisutnost apoptoze mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9.

Istraživanje smo proveli na THP-1 stanicama koje smo prethodno diferencirali u makrofage pomoću forbol 12-miristat-13-acetata (PMA) te na monocitima iz periferne krvi zdravih donora koje smo diferencirali pomoću čimbenika koji stimulira rast makrofagnih kolonija (M-CSF). Stanice su tretirane rekombinantnim humanim (rh) Hsp70 proteinom u koncentracijama od 0,3, 1, 3 i 10 μg/mL, s 0,1 μg/mL LPS-a te 1 μg/mL LTA tijekom 2, 4, 6 i 8 sati. Aktivnosti kaspaza u stanicama izmjerene su luminometrijskim testom.

Rezultati su pokazali da tretiranje LPS-om i LTA u THP-1 stanicama dovodi do aktivacije kaspaze-1. LPS potiče i aktivaciju kaspaza-3/7 te kaspaze-8 u THP-1 stanicama. Kod monocita, LPS i LTA potiskuju aktivnost kaspaze-1, a LTA uzrokuje i smanjenje aktivnosti kaspaze-9. rhHsp70 primijenjen u nižim koncentracijama i nakon kraćeg vremena inkubacije potiskuje aktivnost kaspaze-1 u THP-1 stanicama, a pri višim koncentracijama i nakon duljeg vremena inkubacije stimulira njenu aktivnost. Nakon 8 sati inkubacije rhHsp70 uzrokuje i smanjenje aktivnosti kaspaza-3/7 u ovim stanicama. Kod monocita, tretiranje s rhHsp70 potiče aktivnost kaspaze-1, dok visoke koncentracije rhHsp70 snižavaju aktivnost kaspaze-9.

Zaključno, LPS i LTA uzrokuju aktivaciju inflamasoma, a LPS aktivira i apoptozne kaspaze-3/7 i -8 u THP-1 stanicama, dok u monocitima LPS i LTA ne dovode do aktivacije inflamasoma i apoptoze. rhHsp70 djeluje protu-upalno u nižim koncentracijama, a u višim koncentracijama uzrokuje aktivaciju inflamasoma u THP-1 stanicama, dok na monocite djeluje upalno i protu-apoptozno.

Extracellular Hsp70 protein acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) and can activate Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) and cause an immune response. It is elevated in blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Its pathogenesis involves chronic inflammation and tissue damage, but it is not yet completely understood. Aim of this study was to examine the effect of different concentrations of extracellular Hsp70, lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) via TLR2 and TLR4 receptors on differentiated monocytes from peripheral blood of healthy donors and on THP-1 cells, and to determine if they cause activation of inflammasome and programmed cell death (apoptosis). Presence of inflammation and inflammasome activation is examined by measuring caspase-1 activity in cells, and presence of apoptosis by measuring caspase-3/7, -8 and -9 activities.

We did our study on THP-1 cells which we had previously differentiated to macrophages with phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) and on monocytes from peripheral blood of healthy donors which we had differentiated with macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). Cells were treated with recombinant human (rh) Hsp70 protein in concentrations of 0,3, 1, 3 and 10 μg/mL, with 0,1 μg/mL of LPS and with 1 μg/mL of LTA during 2, 4, 6 and 8 hours. Caspase activities in cells were measured with luminometric test.

Results showed that treatments with LPS and LTA in THP-1 cells stimulate caspase-1 activation. LPS also causes activation of caspases-3/7 and caspase-8 in THP-1 cells. In monocytes LPS and LTA reduce caspase-1 activity and LTA additionaly causes reduction of caspase-9 activity. Low concentrations of rhHsp70 applied for a short period of time decrease caspase-1 activity in THP-1 cells, while high concentrations and longer incubation time increase activity. After 8 hours of incubation, rhHsp70 also decreases caspases-3/7 activity. In monocytes, treatment with rhHsp70 induces caspase-1 activity, while high concetrations of rhHsp70 lower caspase-9 activity.

In conclusion, LPS and LTA trigger inflammasome activation, and LPS also induces activity of caspase-3/7 and -8 in THP-1 cells. However, LPS and LTA don't cause activation of inflammasome and apoptosis in monocytes. rhHsp70 has anti-inflammatory effect in low concentrations, but in high concetrations it causes inflammasome activation in THP-1 cells, while in monocytes it has pro-inflammatory and anti-apoptotic effect.

8. PRILOZI

8.1.Popis kratica

ADP	adenozin-difosfat
ALR	receptor sličan proteinu 2 odsutnom u melanomu (*engl*. absent in melanoma 2-like receptors)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (*engl.* One Way Analysis of Variance)
AP-1	aktivacijski protein 1 (*engl*. activator protein-1)
Apaf-1	čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze (*engl*. apoptotic protease activating factor-1)
ASC	protein nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (*engl*. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain)
ATP	adenozin-trifosfat
BH	Bcl-2 homologna domena
CAD	DNaza aktivirana kaspazama (*engl.* caspase activated DNase)
CARD	domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza (*engl*. caspase activation and recruitment domain)
CD14	biljeg diferencijacije 14 (*engl*. cluster of differentiation 14)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja (*engl*. damage-associated molecular pattern)
DED	izvršna domena smrti (*engl*. death effector domain)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (*engl*. death inducing signaling complex)
DR	receptor smrti (*engl*. death receptor)
eHsp70	izvanstanični Hsp70
ELISA	enzimimunokemijska metoda (*engl*. enzyme-linked immunosorbent assay)
GOLD	Svjetska inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (*engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
GSDMD	gasdermin D
GSDMD-NT	N-terminalni fragment gasdermina D
HMGB1	protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (*engl*. high mobility group box 1 protein)
Hsp	protein toplinskog šoka (engl. heat shock protein)
IL	interleukin

IRF3	čimbenik regulacije interferona 3 (*engl*. interferon regulatory factor 3)
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LBP	protein koji veže LPS (*engl*. LPS binding protein)
LPS	lipopolisaharid
LRR	područje bogato leucinom (*engl*. leucine-rich repeat)
LTA	lipoteikoična kiselina (*engl*. lipoteichoic acid)
M-CSF	čimbenik koji stimulira rast makrofagnih kolonija (*engl*. macrophage colony-stimulating factor)
MD 2	molekula 2 koja veže lipopolisaharid (*engl*. molecule that confers lipopolysaccharide)
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)
NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (*engl*. NOD-like receptor pyrin 3)
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima (*engl*. pathogen-associated molecular pattern)
PMA	forbol 12-miristat-13-acetat
PRR	receptor za obrasce (*engl*. pattern recognition receptor)
PYD	pirinska domena (*engl*. pyrin domain)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70 protein
TIR	citoplazmatska domena homologna Tollu i receptoru za interleukin-1 (*engl*. Toll/interleukin 1 receptor homology domain)
TLR	receptor sličan Tollu (*engl*. Toll-like receptor)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora α (*engl*. tumor necrosis factor-α)
TRAIL	ligand sličan TNF-u koji potiče apoptozu (*engl*. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI UPALNIH I APOPTOZNIH KASPAZA U THP-1 STANICAMA I MONOCITIMA

Lucija Franin

SAŽETAK

Izvanstanični protein Hsp70 djeluje kao molekularni obrazac oštećenja (DAMP, *engl*. damage-associated molecular pattern) preko receptora sličnog Tollu TLR2 i TLR4 te može uzrokovati upalni odgovor. Povišen je u krvi bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti. Patogeneza te bolesti uključuje kroničnu upalu i oštećenje tkiva, no nije potpuno razjašnjena. Cilj rada bio je ispitati djelovanje različitih koncentracija izvanstaničnog proteina Hsp70 te lipopolisaharida (LPS) i lipoteikoične kiseline (LTA) preko receptora TLR2 i TLR4 na diferencirane monocite iz periferne krvi zdravih donora i na THP-1 stanice, te utvrditi uzrokuju li aktivaciju inflamasoma i programirane stanične smrti (apoptoze). Prisutnost upale i aktivacije inflamasoma ispitani su mjerenjem aktivnosti kaspaze-1 u stanicama, a prisutnost apoptoze mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9. Istraživanje smo proveli na THP-1 stanicama koje smo prethodno diferencirali u makrofage pomoću forbol 12-miristat-13-acetata (PMA) te na monocitima iz periferne krvi zdravih donora koje smo diferencirali pomoću čimbenika koji stimulira rast makrofagnih kolonija (M-CSF). Stanice su tretirane rekombinantnim humanim (rh) Hsp70 proteinom u koncentracijama od 0,3, 1, 3 i 10 μg/mL, s 0,1 μg/mL LPS-a te 1 μg/mL LTA tijekom 2, 4, 6 i 8 sati. Aktivnosti kaspaza u stanicama izmjerene su luminometrijskim testom. Rezultati su pokazali da tretiranje LPS-om i LTA u THP-1 stanicama dovodi do aktivacije kaspaze-1. LPS potiče i aktivaciju kaspaza-3/7 te kaspaze-8 u THP-1 stanicama. Kod monocita, LPS i LTA potiskuju aktivnost kaspaze-1, a LTA uzrokuje i smanjenje aktivnosti kaspaze-9. rhHsp70 primijenjen u nižim koncentracijama i nakon kraćeg vremena inkubacije potiskuje aktivnost kaspaze-1 u THP-1 stanicama, a pri višim koncentracijama i nakon duljeg vremena inkubacije stimulira njenu aktivnost. Nakon 8 sati inkubacije rhHsp70 uzrokuje i smanjenje aktivnosti kaspaza-3/7 u ovim stanicama. Kod monocita, tretiranje s rhHsp70 potiče aktivnost kaspaze-1, dok visoke koncentracije rhHsp70 snižavaju aktivnost kaspaze-9. Zaključno, LPS i LTA uzrokuju aktivaciju inflamasoma, a LPS aktivira i apoptozne kaspaze-3/7 i -8 u THP-1 stanicama, dok u monocitima LPS i LTA ne dovode do aktivacije inflamasoma i apoptoze. rhHsp70 djeluje protu-upalno u nižim koncentracijama, a u višim koncentracijama uzrokuje aktivaciju inflamasoma u THP-1 stanicama, dok na monocite djeluje upalno i protu-apoptozno.
Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 10 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 73 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: izvanstanični Hsp70, LPS, LTA, kaspaze, THP-1 stanice, monociti

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Andrea Hulina, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sandra Šupraha-Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUANTIFICATION OF ACTIVITY OF INFLAMMATORY AND APOPTOTIC CASPASES IN THP-1 CELLS AND MONOCYTES

Lucija Franin

SUMMARY

Extracellular Hsp70 protein acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) and can activate Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) and cause an immune response. It is elevated in blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Its pathogenesis involves chronic inflammation and tissue damage, but it is not yet completely understood. Aim of this study was to examine the effect of different concentrations of extracellular Hsp70, lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) via TLR2 and TLR4 receptors on differentiated monocytes from peripheral blood of healthy donors and on THP-1 cells, and to determine if they cause activation of inflammasome and programmed cell death (apoptosis). Presence of inflammation and inflammasome activation is examined by measuring caspase-1 activity in cells, and presence of apoptosis by measuring caspase-3/7, -8 and -9 activities. We did our study on THP-1 cells which we had previously differentiated to macrophages with phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) and on monocytes from peripheral blood of healthy donors which we had differentiated with macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). Cells were treated with recombinant human (rh) Hsp70 protein in concentrations of 0,3, 1, 3 and 10 μg/mL, with 0,1 μg/mL of LPS and with 1 μg/mL of LTA during 2, 4, 6 and 8 hours. Caspase activities in cells were measured with luminometric test. Results showed that treatments with LPS and LTA in THP-1 cells stimulate caspase-1 activation. LPS also causes activation of caspases-3/7 and caspase-8 in THP-1 cells. In monocytes LPS and LTA reduce caspase-1 activity and LTA additionaly causes reduction of caspase-9 activity. Low concentrations of rhHsp70 applied for a short period of time decrease caspase-1 activity in THP-1 cells, while high concentrations and longer incubation time increase activity. After 8 hours of incubation, rhHsp70 also decreases caspases-3/7 activity. In monocytes, treatment with rhHsp70 induces caspase-1 activity, while high concetrations of rhHsp70 lower caspase-9 activity. In conclusion, LPS and LTA trigger inflammasome activation, and LPS also induces activity of caspase-3/7 and -8 in THP-1 cells. However, LPS and LTA don't cause activation of inflammasome and apoptosis in monocytes. rhHsp70 has anti-inflammatory effect in low concentrations, but in high concetrations it causes inflammasome activation in THP-1 cells, while in monocytes it has pro-inflammatory and anti-apoptotic effect.

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

Thesis includes: 49 pages, 10 figures, 1 table and 73 references. Original is in Croatian language.

Keywords: extracellular Hsp70, LPS, LTA, caspases, THP-1 cells, monocytes

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

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

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

Sandra Šupraha-Goreta, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2018.