

Izvanstanični Hsp70 i ATP kao potencijalni biomarkeri kod kronične opstruktivske plućne bolesti

Gavranović, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:437271>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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



Tomislav Gavranović

**IZVANSTANIČNI Hsp70 I ATP KAO
POTENCIJALNI BIOMARKERI KOD
KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE
BOLESTI**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći, a posebno prof. dr. sc. Ladi Rumora i asistentici Ivi Hlapčić na svim stručnim savjetima i pomoći u izradi diplomskog rada, ali i svojoj obitelji i prijateljima na kontinuiranoj podršci tokom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB).....	1
1.1.1. Dijagnosticiranje KOPB-a i GOLD smjernice	2
1.2. Protein toplinskog šoka Hsp70	3
1.2.1. Izvanstanični Hsp70 (eHsp70).....	4
1.3. Adenozin-trifosfat i izvanstanični ATP (eATP).....	7
1.3.1. Receptori za ATP i purinergijsko signaliziranje	7
1.4. Luminometrija.....	10
1.5. ELISA	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Test paketi.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparat za detekciju	14
3.2. Metode	14
3.2.1. Sudionici istraživanja.....	14
3.2.2. Uzorci.....	15
3.2.3. Određivanje eHsp70.....	15
3.2.4. Određivanje eATP-a	15
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Rezultati	17
4.1.1. eHsp70	17
4.1.2. eATP	21
4.2. Rasprava.....	25

5. ZAKLJUČCI.....	28
6. LITERATURA	29
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	33
8. PRILOZI	35
8.1. Popis kratica.....	35
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	37

1. UVOD

1.1 Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

Kronična opstruktivska plućna bolest je učestala progresivna bolest karakterizirana trajnim respiracijskim simptomima i ograničenim protokom zraka, a ti simptomi su uzrokovani oštećenjima dišnih putova i alveola. Najčešći uzrok kronične opstrukcije koja karakterizira KOPB je kombinacija bolesti malih dišnih putova (opstruktivski bronhiolitis) i oštećenja parenhima (emfizem). Do strukturnih promjena, odnosno sužavanja malih dišnih putova i uništenja plućnog parenhima, dolazi uslijed kronične upale. To dovodi do gubitka povezanosti alveola s malim dišnim putovima i smanjene elastičnosti pluća, što smanjuje mogućnost dišnih putova da ostanu otvoreni tijekom izdisaja (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2020.).

Prema procjeni iz 2010. godine, oko 328 milijuna ljudi u svijetu boluje od KOPB-a, od čega je 168 milijuna muškaraca i 160 milijuna žena. (Lopez-Campos i sur., 2016.). WHO (*engl.* World Health Organisation) procjenjuje kako je 2015. oko 3,17 milijuna ljudi preminulo od posljedica bolesti, što je oko 5 % od ukupnog broja umrlih te godine (www.who.int). Pušači i bivši pušači te muškarci obolijevaju češće nego nepušači i žene (GOLD, 2020.).

Troškovi liječenja KOPB-a u Europskoj uniji godišnje iznose oko 38,6 milijardi eura, čineći oko 56 % troškova liječenja respiracijskih bolesti, koje iznose oko 6 % ukupnog godišnjeg proračuna za zdravstvo. Egzacerbacije bolesti su najveći izvor troškova (GOLD, 2020.).

Rizični čimbenici mogu se podijeliti na endogene i egzogene, odnosno okolišne. Pušenje i pasivno pušenje smatraju se najvećim rizičnim čimbenikom, a uz njih su značajni i zagađenje zraka te profesionalna izloženost. U urbanim sredinama, najčešći izvor zagađenja su promet i industrija, dok je u zemljama u razvoju veliki problem zagađenje zraka u zatvorenim prostorima zbog izgaranja biomase i ugljena (Viegi i sur., 2007.). Kao endogeni rizični čimbenik, najznačajniji je genski uvjetovan nedostatak α -1 antitripsina (AATD), a prisutan je kod 1 – 2 % bolesnika (Decramer i sur., 2012.). AAT služi za inaktivaciju drugih enzima, kao što su proteaze, a kod takvih osoba dolazi do njegove polimerizacije unutar stanica koje ga sintetiziraju. To dovodi do pretjerane aktivnosti proteaza u plućima, što je jedan od glavnih patogenih mehanizama nastanka KOPB-a (Gooptu i sur., 2009.)

Patogeni mehanizmi KOPB-a nastaju kao posljedica međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika rizika, a tri najznačajnija patološka procesa su trajna upala, pretjerana aktivnost proteaza te oksidacijski stres. Izlaganje duhanskom dimu ili stranim česticama mogu uzrokovati i izravno oštećenje tkiva, a potiču izlučivanje citokina i infiltraciju upalnih stanica poput makrofaga, neutrofila i limfocita. Makrofagi i neutrofilni otpuštaju više vrsta proteaza, poput neutrofilne elastaze i metaloproteinaza matriksa. Ti enzimi razgrađuju elastinska i kolagenska vlakna koji su komponente izvanstaničnog matriksa, što dovodi do razaranja plućnog tkiva, koje je pospješeno aktivacijom apoptoze stanica plućnog parenhima. Dodatno, narušena je proliferacija epitelnih i endotelnih alveolarnih stanica i sposobnost obnove plućnog tkiva. Razaranje plućnog tkiva ključni je čimbenik u patogenezi KOPB-a, a smanjenje površine dostupne za izmjenu plinova dovodi do nastanka emfizema. Pušenje također izlaže pluća povećanoj razini i štetnim učincima reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva (ROS, *engl.* reactive oxygen species, odnosno RNS, *engl.* reactive nitrogen species), koje također mogu stvarati upalne stanice (Decramer i sur., 2012.; Tuder i Petrache., 2012.; Fischer i sur., 2011.).

1.1.1. Dijagnosticiranje KOPB-a i GOLD smjernice

Dijagnosticiranje KOPB-a razmatra se kod pacijenata koji imaju više od 40 godina te simptome koji uključuju trajnu dispneju koja se pogoršava s vremenom i prilikom tjeleježbe, kronični kašalj i stvaranje sputuma, ponavljajuće infekcije donjeg dišnog sustava te rizične čimbenike. Ključna pretraga je spirometrija, a najznačajniji klinički parametar je omjer vrijednosti FEV₁ (forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi) i FVC (forsirani vitalni kapacitet) koji mora biti manji od 0,7 (FEV₁/FVC < 0,7) nakon primjene bronhodilatatora.

Prema GOLD smjernicama, a sukladno nalazima spirometrije i FEV₁ vrijednosti, pacijenti čiji je FEV₁/FVC omjer manji od 0,7, mogu se podijeliti u skupine GOLD 1-4, prikazano u Tablici 1.

skupina	klinički opis	FEV ₁ vrijednost
GOLD 1	blaga	FEV ₁ ≥ 80% očekivane
GOLD 2	umjerena	50% ≤ FEV ₁ < 80% očekivane
GOLD 3	jaka	30% ≤ FEV ₁ < 50% očekivane
GOLD 4	vrlo jaka	FEV ₁ < 30% očekivane

Tablica 1. Podjela pacijenata u GOLD skupine sukladno smanjenju FEV₁ vrijednosti (GOLD, 2020.)

Međutim, sam nalaz spirometrije ne daje kompletnu kliničku sliku pacijenta. U svrhu detaljnijeg kliničkog opisivanja bolesti razvijeni su dodatni testovi. Dispneju procjenjuje modificirana skala zaduhe (mMRC, *engl.* Modified British Medical Research Council Questionnaire), a uz nju se koristi i test za procjenu KOPB-a (CAT, *engl.* COPD Assessment Test) koji procjenjuje zdravstveno stanje pacijenta. Uzimajući navedene testove u obzir, razvijena je i podjela pacijenata u skupine GOLD A-D koje uzimaju u obzir simptome pacijenta i broj egzacerbacija u protekloj godini, prema Tablici 2. (GOLD, 2020.)

	mMRC 0 - 1 CAT < 10	mMRC ≥ 2 CAT ≥ 10
0 do 1 egzacerbacija godišnje	A	B
≥ 2 egzacerbacije ili ≥ 1 koja zahtijeva hospitalizaciju	C	D

Tablica 2. Skupine GOLD A-D prema broju hospitalizacija i mMRC ili CAT vrijednosti (GOLD, 2020.)

1.2. Protein toplinskog šoka Hsp70

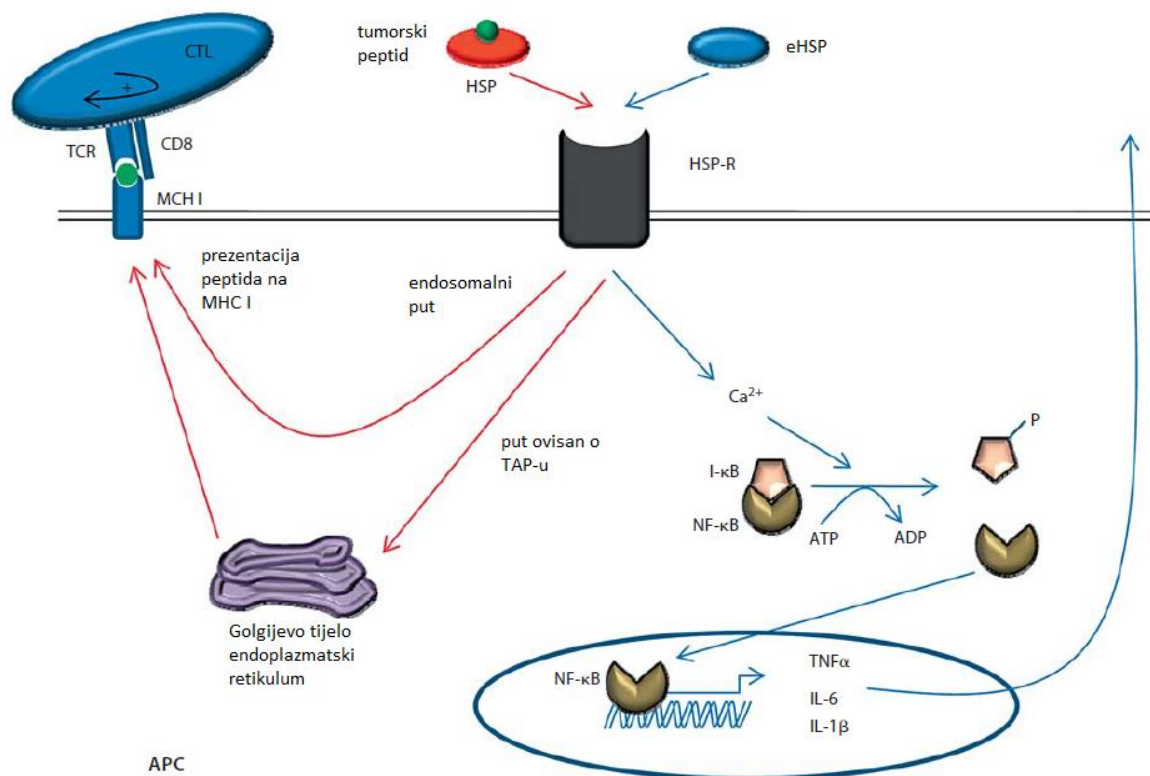
Proteini toplinskog šoka (*engl.* Heat shock proteins, Hsp) skupina su visoko konzerviranih proteina, podijeljeni u porodice imenovane po njihovoj približnoj molekularnoj masi (Hsp60, Hsp70, Hsp90 itd.). Porodica proteina Hsp70 sastoji se od 13 genskih produkata, građeni su

kao monomerni proteini i nalaze se u svakom odjeljku eukariotske stanice koji sadrži ATP, a mogu se naći i u staničnoj membrani. Sastoje se od N-kraja koji sadrži domenu za vezanje i hidrolizu ATP-a, središnje domene s mjestima osjetljivim na proteaze i C-kraja koji veže supstrat, odnosno polipeptide. Kao i ostali proteini toplinskog šoka, Hsp70 mogu biti inducibilni i konstitutivno eksprimirani. Konstitutivni Hsp imaju ulogu šaperona i pomažu ispravno smatanje proteina koristeći energiju hidrolize adenzin-trifosfata (ATP), pomažu u njihovom razvrstavanju i prijenosu u stanici te sprječavaju agregaciju proteina i nastajanje proteinskih kompleksa, a imaju i ulogu u razgradnji proteina putem proteasoma. Inducibilni Hsp sintetiziraju se kao odgovor stanice na stresne uvijete kao što su toplinski šok, ishemija, teški metali, radijacija, oksidacijski stres, upala, kemijska oštećenja te štite stanicu i pomažu obnovu djelomično denaturiranih proteina (Radons, 2016.; Sevin i sur., 2015.). Hsp snažno inhibiraju apoptozu, a to se može događati na pred-mitohondrijskoj razini inhibicijom signaliziranja induciranoog stresom, mitohondrijskoj razini smanjenjem permeabilnosti njihove membrane te na post-mitohondrijskoj razini inhibicijom aktivacije kaspaza i fragmentacije DNA (Joly i sur., 2010.).

1.2.1. Izvanstanični Hsp70 (eHsp70)

Nasuprot unutarstaničnom Hsp70 koji ima zaštitnu ulogu, izvanstanični se smatra molekulom s imunomodulacijskim svojstvima. Hsp70 i drugi proteini iz porodice mogu se naći vezani na membrane stanica i u izvanstaničnom prostoru. Izvanstanični Hsp može postojati u slobodnom obliku, vezan na antigene ili unutar egzosoma. Hsp su najčešće oslobođeni u međustanični prostor kao posljedica nekroze ili traume stanice, ali vjerojatno postoji i mehanizam kojim se izlučuju, no on još nije potpuno razjašnjen. Izvan stanice Hsp djeluje kao molekularni obrazac oštećenja (DAMP, *engl.* damage-associated molecular pattern). To su molekule koje se pri fiziološkim uvjetima nalaze unutar stanice, ali se prilikom oštećenja stanice ili u uvjetima staničnog stresa oslobađaju u izvanstanični prostor te aktiviraju stanice urođene imunosti (Kono i Rock, 2008.). Važnu ulogu u prepoznavanju DAMP-ova, kao i molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMP, *engl.* pathogen-associated molecular pattern), imaju receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR, *engl.* pattern recognition receptor). Takvi receptori eksprimirani su kod makrofaga, dendritičkih stanica te epitelnih stanica. Aktivacija tih receptora dovodi do sinteze upalnih citokina, interferona (IFN) i kemokina što potiče daljnji imunski odgovor. Postoji više skupina receptora koji pripadaju PRR-ovima, poput receptora sličnih Tollu (TLR, *engl.* Toll-like receptor), lektinskih receptora tipa C (CLR, *engl.* C-type

lectin receptor), receptora sličnih oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl.* nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD)-like receptor), receptora krajnjih produkata uznapredovale glikacije (RAGE, *engl.* receptor for advanced glycation end-products) i receptora slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (RIG-1R, *engl.* retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor). Pokazano je da Hsp70 aktiviraju receptore TLR-2 i TLR-4, čime dolazi do aktivacije puta vezanog za biljeg diferencijacije 14 (CD14, *engl.* cluster of differentiation 14) i daljnje aktivacije jezgrinog čimbenika kappa B (NF- κ B, *engl.* nuclear factor kappa B) i čimbenika regulacije interferona 3 (IRF3, *engl.* interferon regulatory factor 3). To na kraju dovodi do aktivacije urođene imunosti i izlučivanja upalnih citokina kao što su interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF α , *engl.* tumor necrosis factor alpha). Hsp također može aktivirati i stečenu imunost. Zbog njihove uloge kao šaperona, oni vežu proteine te nakon izlaska iz stanice mogu djelovati kao prenosiooci antigena koje prenose antigen prezentirajućim stanicama (APC, *engl.* antigen-presenting cells). APC tada mogu putem glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase I (MHC I, *engl.* major histocompatibility complex I) prezentirati te antigene T limfocitima i dovesti do njihove aktivacije. Proteine porodice Hsp često se naziva „šaperokinima“ upravo zbog njihove dvojne uloge kao citokina i kao šaperona (Radons, 2016.; Joly i sur., 2010.; Optiz i sur., 2010.).



Slika 1. Uloga Hsp-a kao „šaperokina“ i signaliziranje unutar stanice (ADP – adenzin-difosfat, ATP – adenzin-difosfat, CD8 – biljeg diferencijacije 8, CTL – citotoksični T limfocit, eHSP – izvanstanični Hsp, Hsp – protein toplinskog šoka, HSP-R – receptor za Hsp, I-κB – inhibitor NF-κB, IL – interleukin, NF-κB – jezgrin čimbenik kappa B, TAP – transporter povezan s procesiranjem antigena (*engl.* transporter associated with antigen processing), TCR – T stanični receptor (*engl.* T-cell receptor), TNFα – čimbenik nekroze tumora alfa) (preuzeto iz Joly i sur., 2010.)

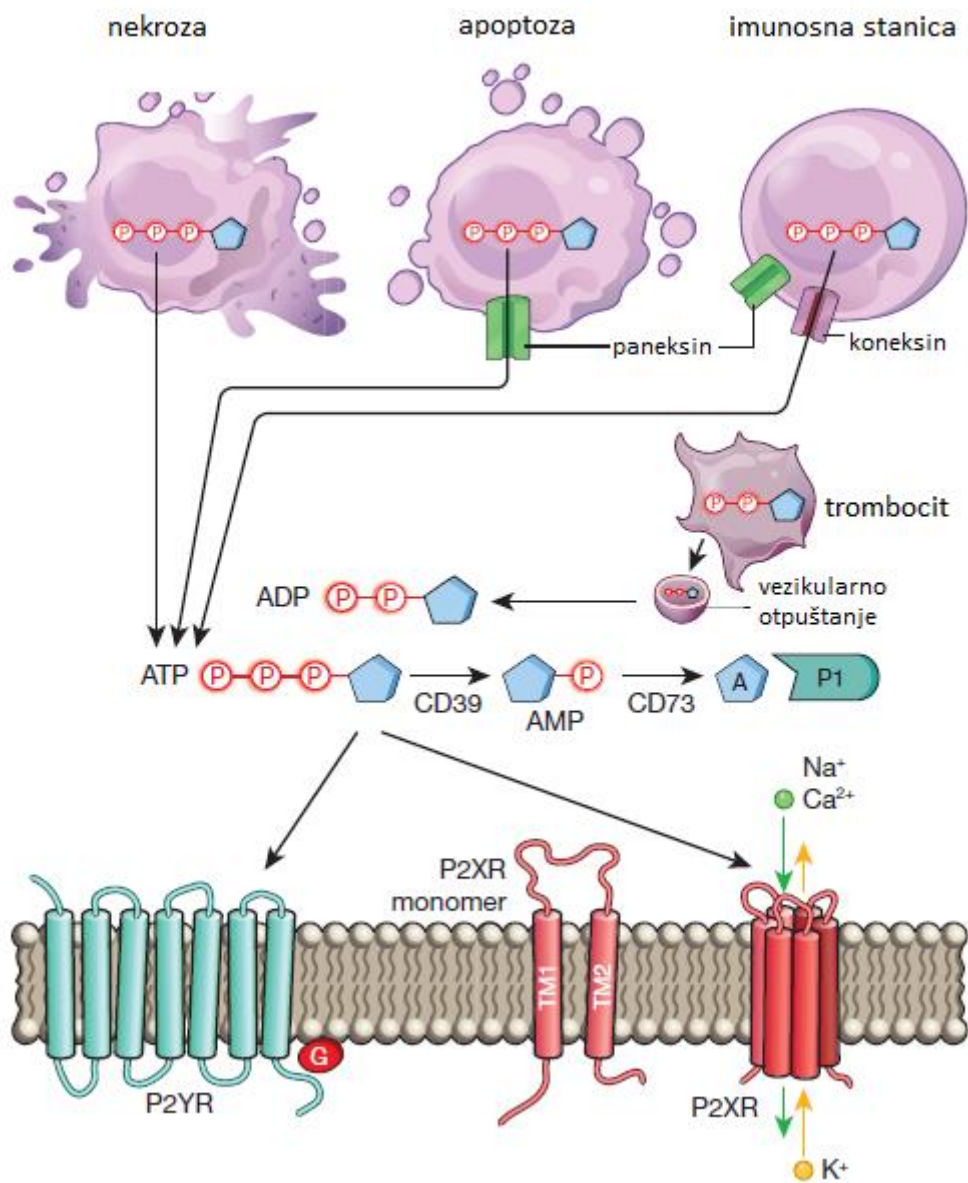
1.3. Adenozin-trifosfat i izvanstanični ATP (eATP)

Adenozin-trifosfat (ATP) je nukleotid građen od dušične baze adenina, šećera riboze i tri fosfatne skupine koje su međusobno povezane visokoenergijskim i nestabilnim fosfodieterskim vezama. Te nestabilne veze u fiziološkim uvjetima lako pucaju i predstavljaju izvor energije za obavljanje mnogih staničnih reakcija i funkcija poput mehaničkog rada, sinteze kemijskih spojeva i prijenosa tvari kroz membrane (Guyton i Hall, 2017.).

Osim unutarstaničnih uloga ATP-a, on može postojati i kao izvanstaničan, odnosno eATP (*engl.* extracellular ATP). Točni mehanizmi izlučivanja ATP-a iz stanica nisu potpuno razjašnjeni. Može se otpustiti iz imunskih stanica putem više vrsta kanala, kao što su koneksinski i paneksinski kanali, a može izlaziti i ukoliko dođe do promjene permeabilnosti ili pucanja membrane te lize stanice. ATP brzo izlazi iz stanice zbog velikog koncentracijskog gradijenta između visoke unutarstanične i niske izvanstanične koncentracije. Ako je porast izvanstanične koncentracije značajan, dolazi do aktivacije membranskih receptora susjednih stanica, što predstavlja jak upalni signal. Takav eATP također djeluje kao DAMP i dolazi do aktivacije imunskih stanica (Rajendran i sur., 2016.).

1.3.1. Receptori za ATP i purinergijsko signaliziranje

Izvanstanični ATP i drugi purinski i primidinski nukleotidi svoj učinak izražavaju putem membranskih purinskih P2 receptora koji su eksprimirani na imunskim i drugim stanicama tijela. Postoje dvije porodice P2 receptora: P2X (P2XR) i P2Y (P2YR). P2Y receptori vezani su uz G proteine te postoji osam podtipova receptora. U svojoj strukturi posjeduju sedam transmembranskih domena, a osjetljivi su i na druge nukleotide osim ATP-a. P2X receptori građeni su kao homotrimeri ili heterotrimeri, specifični su za ATP te djeluju kao ionski kanali koji se otvaraju vezanjem liganda (Jacob i sur., 2013.).



Slika 2. Otpuštanje ATP-a iz stanica i receptori na koje djeluje (A – adenzin, ADP – adenzin-difosfat, AMP – adenzin-monofosfat, ATP – adenzin-trifosfat, CD39 – biljeg diferencijacije 39, CD73 – biljeg diferencijacije 73, P – fosfatna skupina, P1 – adenzinski receptor) (preuzeto iz Idzko i sur., 2014.)

Jedan od receptora čija aktivacija predstavlja jak upalni signal je P2X7. Vežanjem tri molekule ATP-a dolazi do otvaranja kanala pri čemu dolazi do ulaska Na^+ i Ca^{2+} te izlaska K^+ , što dovodi do depolarizacije membrane stanice. Zbog povećane koncentracije Ca^{2+} aktiviraju se signalni putovi vezani uz kalcij, poput p38 protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, *engl.* mitogen activated protein kinase) i fosfolipaze A_2 (Idzko i sur., 2014.). Vežanje ATP-a na P2X7 receptor dovodi i do pada koncentracije K^+ , što može biti jedan od načina aktivacije NLR receptora koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (NLRP3, *eng.* NOD-like receptor pyrin 3) i aktivacije inflamiasoma. NLRP3 inflamiasom je multimerni proteinski kompleks sastavljen od jednog ili dva NLR-a, adaptacijske molekule proteina nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (ASC, *engl.* apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; CARD, *engl.* caspase recruitment domain) te proteaze kaspaze-1. Sam NLRP3 inflamiasom je dio NLRP podskupine NLR receptora, koje karakterizira pirinska domena. Kao i ostali članovi porodice NLR, NLRP3 sadrži središnju NOD domenu koja veže nukleotide, sljedove bogate leucinom (LRR, *engl.* leucine-rich repeat) koji služe za vežanje liganda te na N-kraju domene koje služe za vežanje efektorskih molekula, poput CARD domene ili pirinske domene (PYD), preko kojih mogu aktivirati daljnje signalne putove. Do aktivacije NLRP3 dolazi vežanjem DAMP molekula, kao što je eATP i eHsp, mikrobnih molekula, štetnih čestica, a to posljedično dovodi do apoptoze regulirane kaspazom-1 i posttranslacijske aktivacije upalnih citokina IL-1 β i IL-18. Upravo aktivacija NLRP3 inflamiasoma je jedan od ključnih patogenih mehanizama upale plućnog tkiva i kroničnih bolesti poput KOPB-a (Optiz i sur., 2010.).

Također značajni medijator upale je P2Y2 receptor, koji služi za privlačenje imunskih stanica na mjesto upale ili ozljede, a eATP koji se oslobađa iz oštećenih stanica služi kao njegov ligand. Neutrofili i makrofagi privučeni kemotaksijom fagocitiraju oštećene stanice te tako dovode do smanjenja upale. Signaliziranje putem P2Y2R doprinosi i temeljnim funkcijama leukocita, poput migracije, dok kod neutrofila, eozinofila i dendritičkih stanica potiče sintezu medijatora upale. Kod KOPB-a dolazi do njegove neadekvatne aktivacije, a to zajedno s pojačanom aktivacijom neutrofila i oštećenjem tkiva dovodi do fibroze i poticanja kronične upale. Jedna od posljedica vežanja eATP-a za P2Y2R je i povećana sekrecija Cl^- i surfaktanata te stimulacija proizvodnje mucina, što dovodi do povećanog mukocilijarnog klirensa i smanjenja plućnih egzacerbacija (Idzko i sur., 2014.).

1.4. Luminometrija

Luminiscencija je pojava pri kojoj dolazi do ekscitacije elektrona i njegovog prijelaza u pobuđeno stanje prilikom oslobađanja energije u kemijskoj, biokemijskoj ili elektrokemijskoj reakciji, a ne zbog izlaganja svjetlosti ili povišenoj temperaturi. S obzirom na izvor energije koji uzrokuje prijelaz elektrona u pobuđeno stanje, govori se o kemiluminiscenciji, bioluminiscenciji i elektroluminiscenciji. Slično kao i kod fluorescencije, emisija svjetlosti nastaje zbog oslobađanja energije u obliku svjetlosti prilikom povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno energijsko stanje. Kemiluminiscencija je posljedica ekscitacije elektrona prilikom odvijanja kemijske reakcije, uglavnom oksidacije, s tvarima kao što su luminol, izoluminol, vodikov peroksid, luciferin, kisik i drugi spojevi. Osim reaktanata, potrebni su i katalizirajući enzimi (npr. alkalna fosfataza, mikroperoksidaza) ili metalni ioni, poput Mg^{2+} i Cu^{2+} . Vrsta kemiluminiscencije je i bioluminiscencija, a nju pronalazimo u biološkim sustavima. Enzimi poput luciferaze i akvorina kataliziraju oksidaciju (www.britannica.com).

Metode luminometrije osjetljivije su od drugih spektrofotometrijskih i fluorimetrijskih metoda, detektiraju niže koncentracije analita, ali njihovu učinkovitost mogu smanjiti propuštanje svjetlosti prilikom mjerenja i pozadinska interferencija koja nastaje zbog prisutnosti drugih tvari u analitu. (Burtis i Burns, 2015.)

1.5. ELISA

Enzimimunokemijska analiza (ELISA, *engl.* enzyme-linked immunosorbent assay) je osjetljiva i jednostavna imunokemijska analitička metoda koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje proteina ili antigena u biološkim uzorcima. Za detekciju proteina se koriste enzimi kovalentno vezani za protutijela koja prepoznaju analit, a kataliziraju reakciju prevođenja nekog supstrata u obojani produkt. Prema obojenju reakcijske smjese, može se odrediti prisutnost i koncentracija analita. Postoji više vrsta ELISA testova, a najznačajniji su neizravna i „sendvič“ ELISA.

Kod neizravne ELISA-e, protein koji želimo detektirati u uzorku se adsorbira na stijenke jažica na pločici, nakon čega se ploča ispiri te dodaje otopina u kojoj se nalaze protutijela na analit koji se određuje. Potom se pločica ispiri te dodaje otopina sekundarnih protutijela koja se vežu na primarna protutijela. Na ta protutijela kovalentno su vezani enzimi koji stvaraju obojeni produkt nakon ispiranja pločice i dodavanja otopine koja sadrži supstrat. Kod direktne ELISA-e enzimi su vezani na primarna protutijela te nije potrebno dodavanje sekundarnih.

Umjesto antigena adsorbiranog na stijenke, kod „sendvič“ ELISA-e adsorbirana su protutijela na analit koji se veže na njih. Nakon toga se dodaje otopina monoklonskih protutijela koja se vežu na analit u tom kompleksu. Na njih je vezan enzim koji djeluje na jednak način kao i u indirektnoj ELISA-i (Berg i sur., 2012.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstruktivna plućna bolest jedna je od najraširenijih kroničnih bolesti u svijetu koju karakterizira stalna opstrukcija dišnih putova uz razaranje plućnog parenhima, oštećenje mehanizama popravka tkiva i obrambenih mehanizama te smanjenje površine dostupne za izmjenu plinova. KOPB je progresivna i ireverzibilna bolest sa složenom patogenezom i trajnim posljedicama za pacijenta i njegovo zdravstveno stanje, s čestim egzacerbacijama i hospitalizacijama.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati povezanost između progresije KOPB-a i koncentracije eHsp70 i eATP-a u plazmi pacijenata te raste li njihova koncentracija s težinom bolesti. Također se ispitivala povezanost njihovih koncentracija s pušenjem. U ovom radu određivala se koncentracija eHsp70 i eATP-a u plazmi pacijenata te su se koncentracije uspoređivale s kontrolnom skupinom. Skupina pacijenata podijeljena je u GOLD skupine s obzirom na opstrukciju dišnih putova i težine simptoma, kako bi se procijenila povezanost koncentracije eHsp70 i eATP-a s progresijom bolesti. Kontrolna skupina i skupina pacijenata podijeljene su prema njihovom pušačkom statusu te je ispitana i povezanost njihovih koncentracija s pušenjem. Daljnja istraživanja njihove primjene kao potencijalnih markera koji bi mogli ukazivati na progresiju bolesti služila bi u cilju primjene adekvatnih medicinskih postupaka i farmakoterapije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Test paketi

Koncentraciju eHsp70 u uzorcima plazme odredili smo pomoću ELISA metode, komercijalno dostupnim test paketom AMP'D® HSP70 High Sensitivity ELISA Kit (Enzo Life Sciences).

Metodom luminiscencije te koristeći komercijalno dostupni test paket ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (Perkin Elmer), odredili smo koncentraciju eATP-a u uzorcima plazme. Metoda je bila prilagođena s obzirom na to da je namjenjena mjerenju koncentracije ATP-a u lizatu stanica, a korištena je za mjerenje ATP-a u plazmi.

3.1.2. Kemikalije

Test paket za određivanje eHsp70 sadržavao je sljedeće kemikalije i materijale (Enzo Life Sciences):

- mikrotitarksa pločica s 96 jažica (jažice obložene mišjim monoklonskim protutijelom za Hsp70)
- 50 ml fiziološke otopine s fosfatnim puferom (*engl.* Assay buffer)
- 10 ml AMP'D® Hsp70 ELISA konjugat (plava otopina kozjeg anti-zečjeg IgG protutijela konjugiranog s alkalnom fosfatazom)
- 10 ml AMP'D® Hsp70 ELISA antitijelo (žuta otopina zečjeg poliklonskog protutijela specifičnih za Hsp70)
- 25 µl standarda rekombinantnog ljudskog Hsp70 (koncentracije 10 µg/ml)
- 100 ml koncentrata pufera za ispiranje pločice
- liofilizirani AMP'D® supstrat koji sadrži NADPH
- liofilizirani AMP'D® pojačivač signala koji sadrži alkohol-dehidrogenazu i diaforazu
- 5,5 ml AMP'D® otapala za supstrat
- 5,5 ml AMP'D® otapala za pojačivač signala
- 5 ml AMP'D® otopine za zaustavljanje reakcije (0,3 M otopina sumporne kiseline)

Kemikalije i materijali sadržani u test paketu za određivanje eATP-a:

- 20 ml otopine za lizu stanica
- 20 ml pufera za otapanje supstrata
- liofilizirani supstrat
- liofilizirani standard ATP-a

3.1.3. Aparat za detekciju

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

3.2. Metode

3.2.1. Sudionici istraživanja

U istraživanju je sudjelovalo 232 ljudi, od toga 95 zdravih sudionika u kontrolnoj skupini te 137 pacijenata koji boluju od KOPB-a i u stabilnoj su fazi bolesti. Raspodjela prema dobi i spolu bila je slična u obje skupine. Svi pacijenti su odgovarali dijagnostičkim kriterijima prema GOLD smjernicama ($FEV_1/FVC < 0,7$) te nisu imali egzacerbacije u posljednja tri mjeseca, promjene u terapiji i simptome infekcije donjih dišnih putova. Sudionici nisu smjeli imati manje od 40 godina, druge respiracijske bolesti, sistemske upalne bolesti, akutne infekcije, dijabetes s teškim komplikacijama, teške bolesti jetre ili bubrega, maligne bolesti, transplantacije te druge specifične ili nespecifične akutne upale. Kontrolna skupina odgovarala je istim kriterijima, osim što im nije bio dijagnosticiran KOPB. U kontrolnoj skupini bilo je 48 nepušača i 47 pušača, a u skupini pacijenata koji boluju od KOPB-a bilo je 10 nepušača, 90 bivših pušača te 37 pušača. Pacijenti su također bili podijeljeni prema klasifikaciji GOLD smjernica u skupine GOLD 1-4 i GOLD A-D. Nijedan od pacijenata nije zadovoljavao uvjetima za skupine GOLD 1 i GOLD C. U kliničkoj praksi, pacijenti koji odgovaraju skupini GOLD 1 rijetko se obraćaju liječniku zbog blagih simptoma, a skupina GOLD C je relativno rijetka jer ljudi s manje simptoma imaju i rjeđe egzacerbacije. Osnovne karakteristike sudionika istraživanja prikazane su u Tablici 3.

parametar	kontrolna skupina	pacijenti s KOPB-om	P – vrijednost
dob	64 (46 – 83)	65 (44 – 87)	0,073
spol	muškarci	49	0,118
	žene	46	
FEV ₁ (L)	2,60 (2,12 – 3,19)	1,08 (0,78 – 1,57)	<0,001
FEV ₁ (%)	93,30 (86,38 – 104,20)	39,00 (28,08 – 59,73)	<0,001
FVC (L)	3,35 (2,77 – 4,16)	2,28 (1,81 – 2,77)	<0,001
FEV ₁ /FVC	0,81 (0,77 – 0,88)	0,48 (0,41 – 0,58)	<0,001

Tablica 3. Osnovne karakteristike sudionika istraživanja

3.2.2. Uzorci

U testiranju su korišteni uzorci plazme. Uzorci krvi sudionika uzimani su ujutro prije jela, koristeći epruvete s K₃-etilendiamintetraocetnom kiselinom (K₃-EDTA) kao antikoagulansom. Uzorci su potom bili centrifugirani dvaput, s tim da je nakon prvog centrifugiranja otklonjen sloj koji sadrži leukocite i trombocite (korišten u drugom istraživanju). Sloj plazme nakon drugog centrifugiranja korišten je za određivanje eHsp70 i eATP-a. Plazma je odabrana kao uzorak jer je u prijašnjim istraživanjima otkriveno da su koncentracije Hsp70 bile najveće u EDTA plazmi, u usporedbi s uzorcima gdje je heparin korišten kao antikoagulans ili ukoliko je uzorak serum (Whitham i Fortes, 2006.). Također, korištenjem plazme kao uzorka, uklonjena je mogućnost interferencije zbog unutarstaničnog ATP-a iz krvnih stanica i razgradnje ATP-a enzimima prisutnim u krvnim stanicama.

3.2.3. Određivanje eHsp70

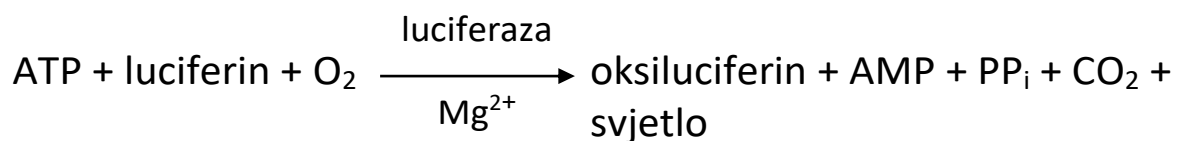
Koncentracije eHsp70 u uzorcima plazme ispitivali smo pomoću ELISA metode. Komercijalno dostupni test paket AMP'D[®] HSP70 High Sensitivity ELISA Kit (Enzo Life Sciences, SAD) sadržavao je mikrotitarsku pločicu s 96 jažica koje su bile obložene monoklonskim protutijelima specifičnim za Hsp70. Uzorci su bili razrijeđeni s otopinom pufera („assay buffer“) u omjeru 1:4. Nakon dodavanja uzoraka na pločicu, inkubiraju se na tresilici na sobnoj temperaturi dva sata te potom ispiru otopinom pufera za ispiranje. Nakon ispiranja, Hsp70 ostaje vezan za protutijela te se dodaje otopina poliklonskih protutijela za Hsp70 koja se vežu za prethodno adsorbirani Hsp70. Pločica se ponovno inkubira na sobnoj temperaturi jedan sat, a višak protutijela se ispiru istom otopinom pufera te se dodaje otopina sekundarnog protutijela koje je konjugirano s alkalnom fosfatazom. Ponovno slijedi inkubacija u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi, ispiranje, a zatim se dodaje otopina supstrata. Pločica se inkubira 15 minuta te se zatim doda otopina pojačivača signala i ponovno inkubira 15 minuta. Nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije, očita se apsorbancija uzoraka pomoću spektrofotometra. Na pločici su uz uzorke dodane i otopine standarda poznate koncentracije te se uz pomoć vrijednosti njihove apsorbancije izradi baždarni pravac (https://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ENZ-KIT-101_insert.pdf).

3.2.4. Određivanje eATP-a

Koncentracije eATP-a u plazmi odredili smo metodom luminometrije i komercijalno dostupnim test paketom ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, SAD). Sama metoda bazirana je na enzimu luciferazi iz krijesnice (*Photinus pyralis*). Pošto je

ATP marker stanične aktivnosti i njegova koncentracija brzo opada u slučaju apoptoze ili nekroze stanica, ovaj test se koristi za procjenu proliferacije stanica ili djelovanja citotoksičnih tvari. Koristi se kao alternativa kolorimetrijskim i fluorimetrijskim testovima, a njegove prednosti su dobra linearnost, jednostavnost, brzi rezultati i jednostavna priprema uzoraka. Test također koristi otopinu za lizu stanica koja podizanjem pH inaktivira enzime koji razgrađuju ATP koji su inače prisutni u stanicama te dodatno stabilizira prisutni ATP. Dodatkom supstrata za reakciju, pH se smanjuje na vrijednost pogodnu za odvijanje reakcije. Također, proizvedeni svjetlosni signal ima dugo vrijeme poluraspada zbog čega sam test ne zahtjeva posebnu opremu za njegovo provođenje.

Tijekom reakcije, ATP i D-luciferin, uz kisik, enzim luciferazu i Mg^{2+} ione, daju oksiluciferin i svjetlost, a intenzitet svjetlosti proporcionalan je koncentraciji ATP-a. Reakcija je prikazana na Slici 3. (<https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf>).



Slika 3. Reakcija određivanja ATP-a luminometrijom

Koristili smo mikrotitarsku pločicu s 96 jažica na koju smo nanijeli standarde poznate koncentracije te uzorke.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Podaci su podvrgnuti Kolmogorov-Smirnov testu normalnosti, ali ga nisu zadovoljili. Korišten je neparametrijski Mann-Whitney test između kontrolne skupine i skupine pacijenata. Kada je uspoređivano više skupina s obzirom na klasifikaciju, korišten je jednostrani Kruskal-Wallis test varijance s post-hoc analizom. Kategorijske varijable testirane su Chi-kvadrat testom. Korišten je MedCalc statistički program verzije 17.9.2. (Ostend, Belgija), a rezultati su bili statistički značajni ako je $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

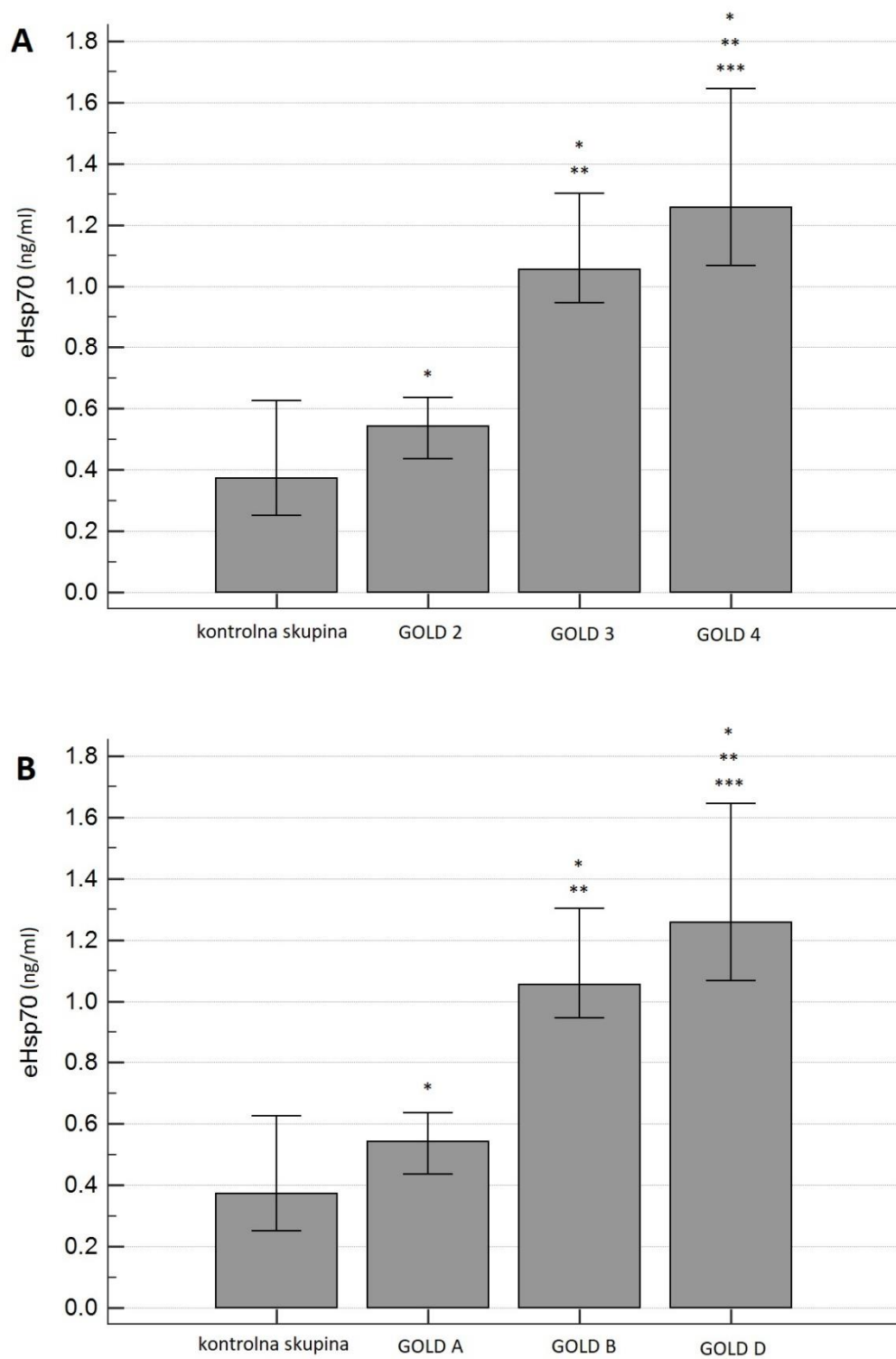
4.1. Rezultati

4.1.1. eHsp70

Rezultati su dobiveni mjerenjem koncentracije eHsp70 u uzorcima plazme ELISA metodom, pomoću komercijalno dostupnog test paketa, gdje je koncentracija određena pomoću baždarnog pravca koji je dobiven mjerenjem apsorbancije uzoraka standarda poznate koncentracije eHsp70. Kao negativna kontrola korištena je otopina pufera bez uzorka ili standarda.

Koncentracija eHsp70 kod pacijenata koji boluju od KOPB-a bila je povišena (0,98 ng/ml (0,63 – 1,29 ng/ml)) u usporedbi s kontrolnom skupinom (0,37 ng/ml (0,25 – 0,63 ng/ml)) ($P < 0,001$). Koncentracije eHsp70 uspoređene su i između pacijenata s obzirom na ograničenje protoka zraka temeljenom na vrijednosti FEV₁ (Slika 4. A) te simptoma i povijesti egzacerbacija (Slika 4. B). Pokazane su statistički značajne razlike u koncentracijama eHsp70 između skupina GOLD 2-4 ($P < 0,001$) i GOLD A-D ($P < 0,001$) te kontrolne skupine. Također, s obzirom na porast koncentracije u usporedbi s progresijom bolesti, primijećene su i statistički značajne razlike između pojedinih skupina prethodno spomenutih podjela.

Kada su koncentracije eHsp70 uspoređene s pušačkim statusom sudionika istraživanja, primijećena je viša koncentracija kod pacijenata s KOPB-om nego kod zdravih nepušača i zdravih pušača ($P < 0,001$) (Slika 5.). Daljnjom usporedbom koncentracija eHsp70 između pacijenata i kontrolne skupine s obzirom na pušački status, kod pacijenata u grupama GOLD 2-4 (Slika 6. A) i GOLD A-D (Slika 6. B) primijećena je statistički značajna razlika ($P < 0,001$) naspram kontrolne skupine. Zdravi pušači su imali više koncentracije eHsp70 od zdravih nepušača te su one bile slične koncentracijama pacijenata u skupinama GOLD 2 i GOLD A. Nije bilo razlika u koncentracijama eHsp70 između pacijenata koji su bolovali od KOPB-a s obzirom na njihov pušački status.

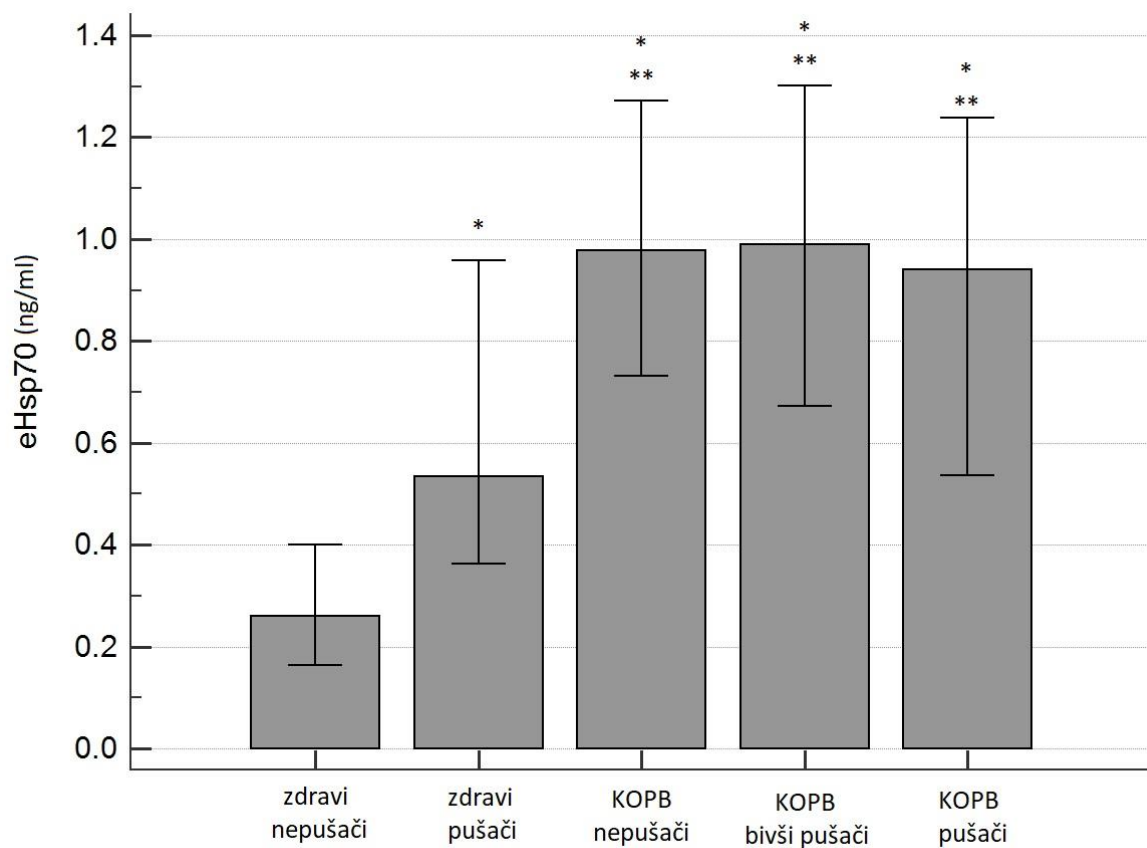


Slika 4. Koncentracije eHsp70 kod pacijenta prema klasifikacijama GOLD 1-4 (A) i GOLD A-D (B) u usporedbi s kontrolnom skupinom

* statistički značajni porast koncentracije u usporedbi s kontrolnom skupinom

** statistički značajni porast koncentracije u usporedbi sa skupinom GOLD 2 ili A

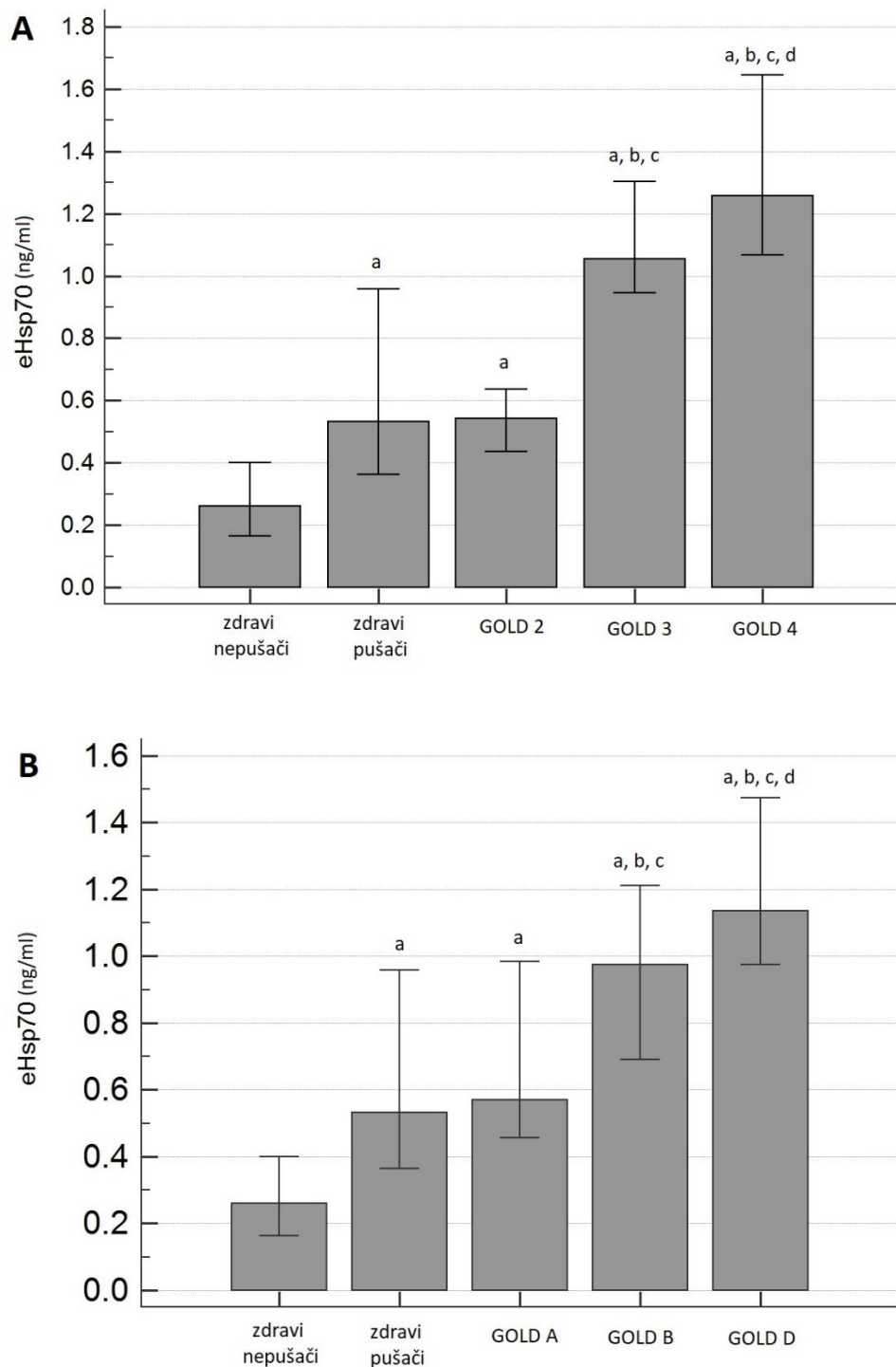
*** statistički značajni porast koncentracije u usporedbi sa skupinom GOLD 3 ili B



Slika 5. Koncentracije eHsp70 kod kontrolne skupine i skupine pacijenata s obzirom na njihov pušački status

* statistički značajni porast koncentracije u usporedbi sa skupinom zdravih nepušača

** statistički značajni porast koncentracije u usporedbi sa skupinom zdravih pušača



Slika 6. Koncentracije eHsp70 kod pacijenata podijeljenih prema klasifikacijama GOLD 1-4 (A) i GOLD A-D (B) u usporedbi s kontrolnom skupinom s obzirom na pušački status a statistički značajan porast koncentracije u usporedbi sa skupinom zdravih pušača b statistički značajan porast koncentracije u usporedbi sa skupinom zdravih nepušača c statistički značajan porast koncentracije u usporedbi sa skupinom GOLD 2 ili A d statistički značajan porast koncentracije u usporedbi sa skupinom GOLD 3 ili B

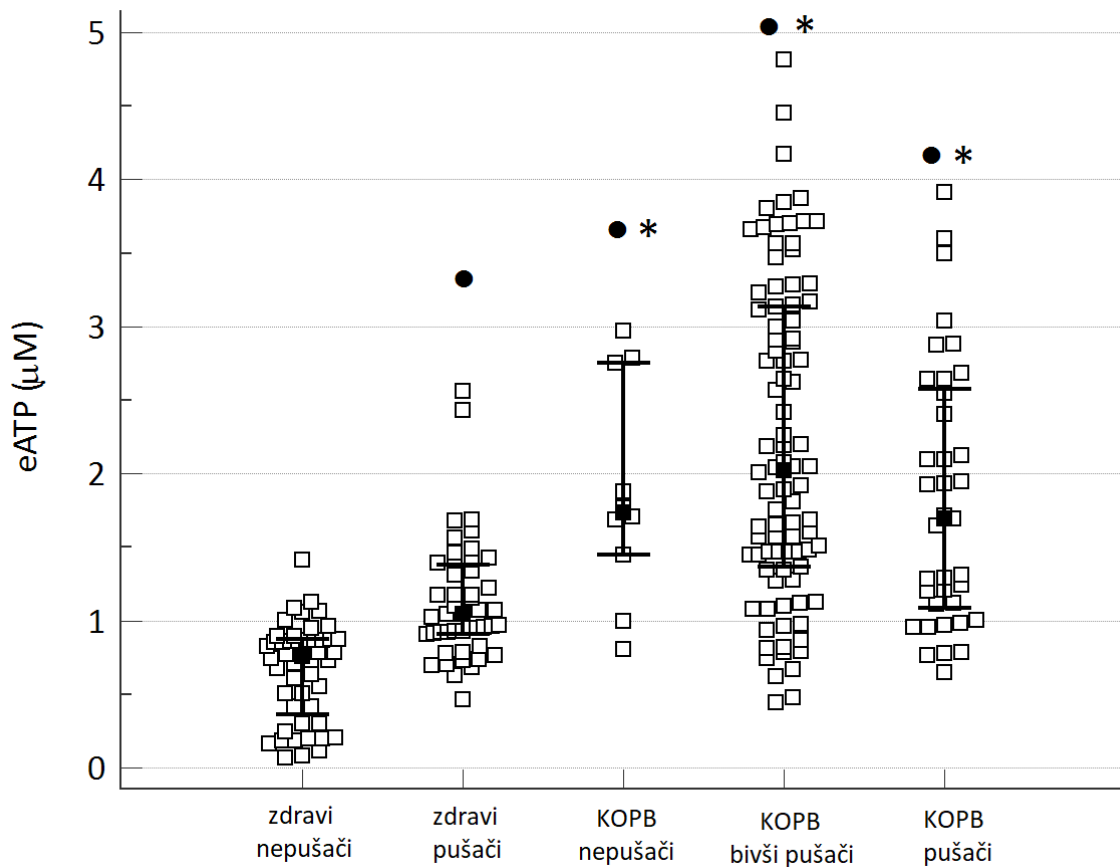
4.1.2. eATP

Rezultati su dobiveni mjerenjem koncentracije eATP u plazmi sudionika istraživanja metodom luminiscencije, pomoću komercijalno dostupnog test paketa, gdje je intenzitet emitirane svjetlosti odgovarao koncentraciji u uzorku. Koncentracije su određene pomoću baždarnog pravca koji je određen mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti za niz uzoraka standarda poznate koncentracije. Kao slijepa proba korištena je otopina pufera bez uzorka ili standarda. Analiziranjem koncentracija eATP-a uočena je značajno viša koncentracija kod pacijenata koji boluju od KOPB-a ($1,879 \mu\text{M}$ ($1,262 - 2,888 \mu\text{M}$)) u odnosu na kontrolnu skupinu ($0,875 \mu\text{M}$ ($0,701 - 1,074 \mu\text{M}$)) ($P < 0,001$).

Zdravi pušači su imali više koncentracije eATP-a od zdravih nepušača ($P < 0,05$), a općenito su pacijenti koji boluju od KOPB-a imali više koncentracije od zdravih pušača i zdravih nepušača ($P < 0,001$). Nije postojala statistički značajna razlika između koncentracija eATP-a kod pacijenata s obzirom na to jesu li pušači, bivši pušači ili nikada nisu pušili (Slika 7.).

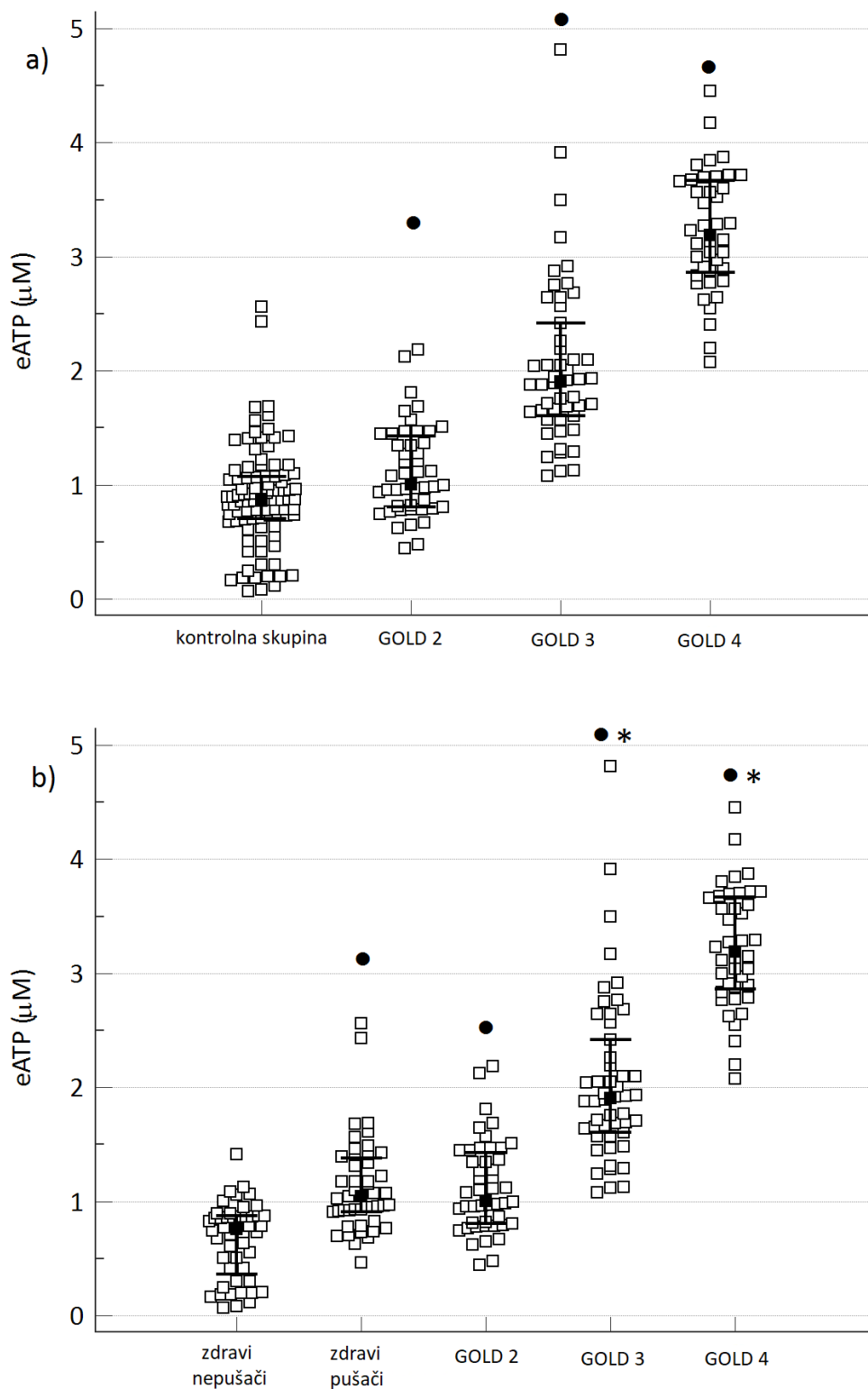
Koncentracija je također rasla i s povećanjem ograničenja protoka zraka (Slika 8. a). Kada su skupine pacijenata uspoređene s kontrolnom skupinom podijeljenom prema pušačkom statusu, primijećeno je da su pacijenti u skupinama GOLD 3 i GOLD 4 imali višu koncentraciju u usporedbi sa zdravim pušačima i zdravim nepušačima ($P < 0,05$), dok nije primijećena statistički značajna razlika između pacijenata u skupini GOLD 2 i zdravih pušača (Slika 8. b).

Kada su pacijenti bili podijeljeni u skupine prema težini simptoma i egzacerbacijama (GOLD A-D), uočena je viša koncentracija u usporedbi s kontrolom. Postojala je i statistički značajna razlika u koncentracijama između pojedinih skupina ove klasifikacije, pri čemu je koncentracija eATP-a rasla i s težinom simptoma ($P < 0,05$) (Slika 9. a). Pacijenti u skupinama GOLD B i D imali su i više razine eATP-a od zdravih pušača i nepušača ($P < 0,05$), ali nije primijećena razlika između pacijenata u skupini GOLD A i zdravih pušača (Slika 9. b).



Slika 7. Usporedba koncentracija eATP-a između kontrolne skupine i skupine pacijenata s obzirom na njihov pušački status

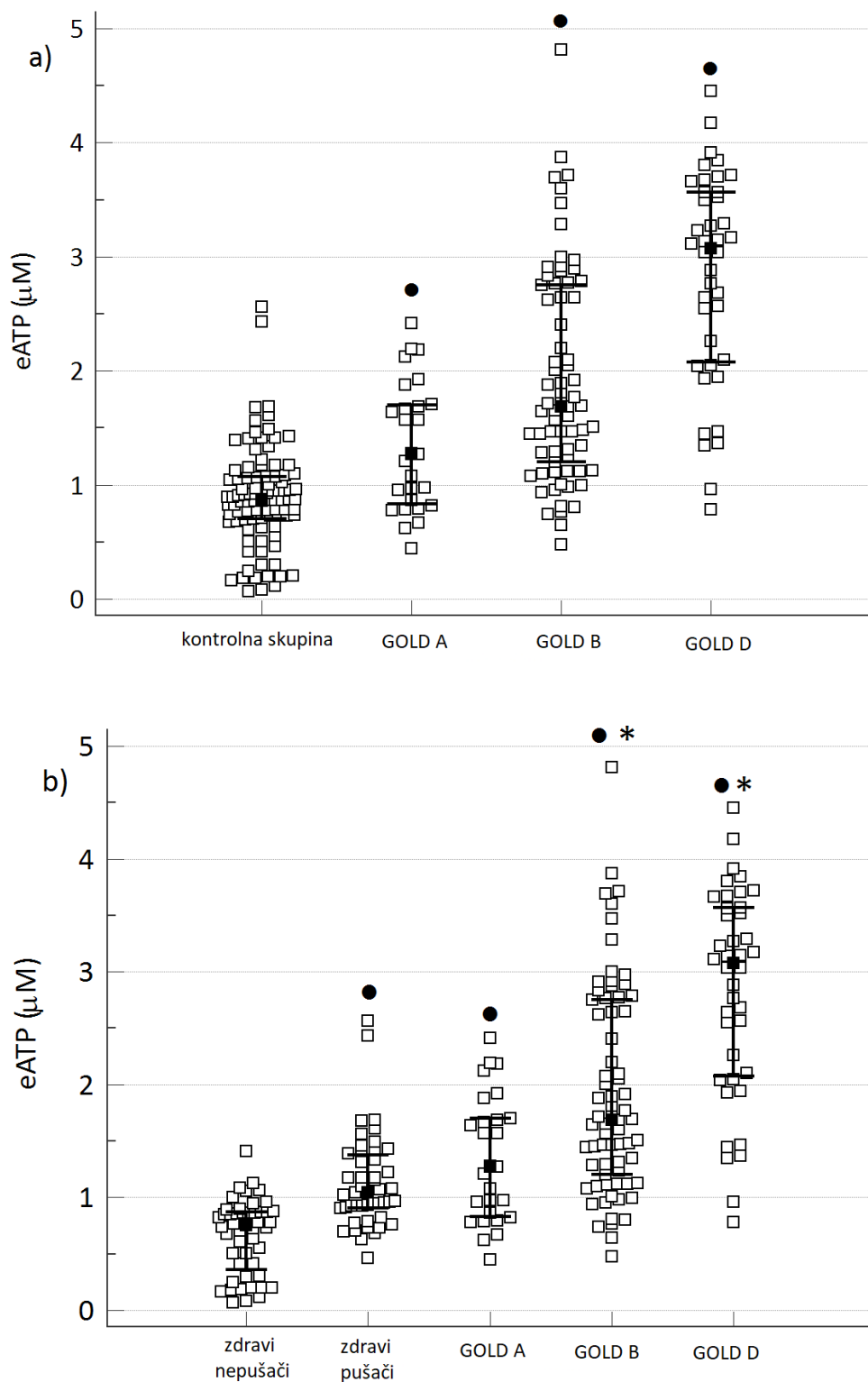
- statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom nepušača
- * statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom pušača



Slika 8. Koncentracije eATP-a kod pacijenata prema klasifikaciji GOLD 1-4 u usporedbi s ukupnom kontrolnom skupinom i podijeljenom prema pušačkom statusu.

- statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom (a), odnosno s kontrolnom skupinom nepušača (b)

- * statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom pušača (b)



Slika 9. Koncentracije eATP-a kod pacijenata prema klasifikaciji GOLD A-D u usporedbi s ukupnom kontrolnom skupinom i podijeljenom prema pušačkom statusu.

- statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom (a), odnosno s kontrolnom skupinom nepušača (b)

- * statistički značajan porast u usporedbi s kontrolnom skupinom pušača (b)

4.2. Rasprava

Kronična opstruktivska plućna bolest je bolest s velikom prevalencijom, ali nedostatnim metodama dijagnoze, zbog kompleksnih patofizioloških procesa i mehanizama nastanka bolesti. To također uzrokuje drukčije kliničke slike kod pacijenata. Upravo radi toga velik broj osoba s KOPB-om se ne dijagnosticira i ne prima potrebnu terapiju. Prepoznato je i da upala kod KOPB-a nije prisutna samo na lokalnoj razini, odnosno u plućima, nego kao i sistemska upala (Augusti i sur., 2012.). Pronalazak dijagnostičkog, prognostičkog i predikcijskog biomarkera u perifernoj krvi značajno bi olakšao dijagnosticiranje i skrb za pacijente.

Zbog djelovanja eHsp70 i eATP-a kao DAMP molekula, njihove bi koncentracije u krvi mogle biti dobar pokazatelj progresije KOPB-a. Njihove koncentracije su i ranije dovedene u vezu s upalom kod različitih upalnih bolesti. Koncentracije eHsp70 ispitivane su kod upalnih bolesti (Qu i sur., 2015.), a ranije istraživanje dokazalo je povišene koncentracije eHsp70 u sputumu pacijenata koji boluju od astme te je porast koncentracije povezan s težinom bolesti (Changchun i sur., 2011.). Povišene koncentracije eHsp70 u krvi pacijenata koji boluju od KOPB-a također su pronađene u više istraživanja, međutim ta su istraživanja provedena s manjim brojem sudionika, a koncentracija je ovisila o vrsti uzorka. U tim istraživanjima kao uzorak je korišten serum ili plazma gdje je heparin korišten kao antikoagulans te su korišteni test paketi koji nisu bili potpuno prikladni za mjerenje Hsp70 u krvi (Ünver i sur., 2016.; Cui i sur., 2015.; Hacker i sur., 2009.). U ovom istraživanju korišten je test paket s nižom granicom detekcije koji je bio validiran za mjerenje Hsp70 u plazmi kao uzorku (Lee i sur., 2015.).

U usporedbi sa zdravim osobama, koncentracije eHsp70 bile su značajno više kod svih pacijenata koji boluju od KOPB-a. Povećanje koncentracije eHsp70 također je bilo povezano s pogoršanjem ograničenja protoka zraka i težinom simptoma kod pacijenata i njihovim egzacerbacijama. Izmjerene koncentracije bile su najviše kod pacijenata u skupinama GOLD 4 i GOLD D, ali su bile povišene i kod skupina GOLD 2 i GOLD A u usporedbi s ukupnom kontrolnom skupinom. Nakon podjele kontrolne skupine po pušačkom statusu, pacijenti u skupinama GOLD 2 i GOLD A imali su povišene koncentracije eHsp70 u usporedbi s kontrolnom skupinom nepušača, dok je kontrolna skupina pušača s normalnom plućnom funkcijom imala koncentracije sličnije prethodno spomenutim skupinama pacijenata. Takva povišena koncentracija eHsp70 kod „zdravih“ pušača mogla bi uzrokovati povećanu sklonost promijenjenim upalnim odgovorima zbog djelovanja eHsp70 kao citokina.

Razlike u koncentracijama između kontrolne skupine i skupine pacijenata, ali i između pojedinih skupina pacijenata, bile su dovoljno značajne te je bilo moguće uspješno odrediti kojoj skupini pacijent pripada po njegovoj koncentraciji eHsp70. Postojala je značajna povezanost između koncentracije eHsp70 i progresije bolesti, a to znači da bi njegova koncentracija mogla biti dobar predikcijski marker za progresiju KOPB-a.

Povišene koncentracije eATP-a prethodno su dokazane u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) pacijenata koji boluju od KOPB-a, ali nije bilo istraživanja gdje se pratila koncentracija u krvi (Lommatzch i sur., 2010.). Kada su izmjerene koncentracije eATP-a u plazmi pacijenata koji boluju od KOPB-a uspoređene s koncentracijama kod kontrolne skupine, pronađene su značajno više koncentracije kod pacijenata. Pušenje je jedan od najznačajnijih uzročnika KOPB-a te je izloženost cigaretnom dimu u ranijim istraživanjima povezana s povišenom koncentracijom eATP-a. Na mišjem modelu akutne upale pluća i emfizema izazvanih cigaretnim dimom pokazan je porast eATP-a u BAL-u, što ukazuje na ulogu signalizacije ATP-a putem P2Y2R u patofiziologiji KOPB-a (Cicko i sur., 2010.). U istraživanju koje su proveli Lommatzch i sur. primijećena je povišena koncentracija eATP-a kod pacijenata koji boluju od KOPB-a čak i nakon prestanka pušenja. U ovom istraživanju, koncentracije eATP-a značajno su se razlikovale između zdravih nepušača i pušača te je kontrolna skupina zdravih pušača imala više koncentracije. Iako su oni imali niže koncentracije od skupine pacijenata, takva povišena razina mogla bi ukazivati na početak oštećenja tkiva ili na pojačane upalne odgovore. Unatoč tome, koncentracije eATP-a kod pacijenata nisu se razlikovale s obzirom na njihov pušački status. Zbog toga bi se moglo zaključiti da bi neki drugi čimbenici osim samog pušenja mogli biti odgovorni za oslobađanje ATP-a kod pacijenata, što dalje dovodi do pogoršanja same upale. Ograničenje protoka zraka i ishemija, koji su često prisutni kod KOPB-a, također bi mogli biti jedan od uzroka oslobađanja ATP-a iz stanica dišnog sustava i povišenja koncentracije eATP-a (Lázár i sur., 2008.). Koncentracija ATP-a u plazmi pacijenata koji boluju od KOPB-a rasla je s pogoršanjem opstrukcije dišnih putova i s težinom simptoma. Pacijenti u skupini GOLD 4 imali su najviše koncentracije. Pacijenti u skupini GOLD 2 i GOLD A imali su slične koncentracije kao i kontrolna skupina pušača, a skupine GOLD 3 i 4 te GOLD B i D imali su značajno više koncentracije od obje kontrolne skupine. Povišena koncentracija ATP-a kod pacijenata dovodi do aktivacije purinergijskih receptora. Aktivacija P2Y2 receptora dovodi do dodatnog otpuštanja ATP-a putem paneksinskih kanala. Sam P2Y2R važan je čimbenik u poticanju upalnog odgovora i privlačenju makrofaga i neutrofila na mjesto upale gdje oni fagocitiraju oštećene stanice. P2Y2R bi mogli pojačavati samu upalu

i oštećenje tkiva poticanjem kronične upale pojačavanjem aktivnosti neutrofila i njihove sposobnosti migracije (Pelleg i sur., 2016.).

Postoji značajna povezanost između koncentracije eATP-a i pada vrijednosti FEV₁ i ostalih pokazatelja progresije KOPB-a. Razlike između koncentracija pojedinih skupina bile su dovoljno značajne da je bilo moguće odrediti kojoj skupini bi pacijent mogao pripadati po izmjerenoj koncentraciji eATP-a. Koncentracija eATP-a bi također potencijalno mogla biti dobar predikcijski marker progresije KOPB-a.

Zaključno, oba parametra, eHsp70 i eATP, pokazala su statistički značajni porast povezan s progresijom KOPB-a, a postojala je i razlika između kontrolne skupine zdravih ispitanika te pojedinih skupina pacijenata obzirom na težinu bolesti.

5. ZAKLJUČCI

- Koncentracije eHsp70 bile su povišene kod pacijenata koji boluju od KOPB-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Koncentracije su također bile povišene kada su se uspoređivale pojedine skupine pacijenata (GOLD 2-4 i GOLD A-D) s kontrolnom skupinom.
- Koncentracije su se značajno razlikovale i između pojedinih skupina pacijenata s obzirom na ograničenje protoka zraka i težinu simptoma te povijest egzacerbacija. Postojala je statistički značajna razlika u koncentracijama između pojedinih GOLD 2-4 i GOLD A-D skupina.
- Pacijenti koji boluju od KOPB-a imali su više koncentracije eHsp70 od skupina zdravih nepušača i pušača, ali nije postojala razlika između pacijenata s obzirom na njihov pušački status. Kontrolna skupina pušača imala je više koncentracije eHsp70 od skupine nepušača koje su bile slične pacijentima u skupinama GOLD 2 i GOLD A.
- Koncentracije eATP-a bile su povišene kod pacijenata koji boluju od KOPB-a u usporedbi s ukupnom kontrolnom skupinom.
- Skupina pacijenata imala je više koncentracije eATP-a od kontrolnih skupina zdravih pušača i nepušača, ali nije postojala značajna razlika između skupina pacijenata s obzirom na pušački status.
- Koncentracija eATP-a rasla je sa smanjenjem protoka zraka. Uspoređivanjem skupina pacijenata sa zdravim ispitanicima s obzirom na pušački status, primijećeno je da skupine GOLD 3 i 4 imaju statistički značajno više koncentracije od zdravih pušača i zdravih nepušača, dok je skupina GOLD 2 imala slične koncentracije kao i kontrolna skupina pušača.
- S obzirom na težinu simptoma i povijesti egzacerbacija, skupine GOLD B i D imali su više koncentracije eATP-a od obje kontrolne skupine, dok su pacijenti u skupini GOLD A imali slične koncentracije kao kontrolna skupina pušača.

6. LITERATURA

Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, Vestbo J, Lomas DA, Calverley PMA, Wouters E, Crim C, Yates JC, Silverman EK, Coxson HO, Bakke P, Mayer RJ, Celli N. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One*, 2012., 7(5): e37483

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Biochemistry, New York, W. H. Freeman and Company, 2012., str. 88, 89.

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

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 2017., [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)), pristupljeno 17.4.2020.

Cicko S, Lucattelli M, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, Zissel G, Boeynaems JM, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC, Lungarella G, Idzko M. Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema. *Journal of immunology*. 2010., 185, 688–697.

Cui X, Xing J, Liu Y, Zhou Y, Luo X, Zhang Z, Han W, Wu T, Chen W. COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a casecontrol study. *Cell Stress Chaperones*. 2015., 20, 473–81.

Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2012., 379, 1341-1351.

Enzo Life Sciences, AMP'D[®] HSP70 High Sensitivity ELISA Kit, Manual, 2017., https://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ENZ-KIT-101_insert.pdf, pristupljeno 21.6.2020.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD; oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *International Journal of COPD*, 2011., 6, 413-421.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2020., www.goldcopd.org, pristupljeno 15.04.2020.

Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA. Mechanisms of emphysema in α 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J*, 2009., 34, 475–488.

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

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 α in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Markers for Immune Activation and Tissue Destruction. *Clinical laboratory*. 2009., 55, 31–40.

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

Jacob F, Pérez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal*. 2013., 9, 285-306.

Jolly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual Role of Heat Shock Proteins as Regulators of Apoptosis and Innate Immunity. *J Innate Immun*, 2010., 2, 238–247.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 2008., 8, 279–289.

Lázár Z, Huszár E, Kullmann T, Barta I, Antus B, Bikov A, Kollai M, Horváth I. Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res*. 2008, 57, 367-373.

Lee BJ, Sukri NM, Ogden H, Vine C, Thake CD, Turner JE, Bilzon JLJ. A comparison of two commercially available ELISA methods for the quantification of human plasma heat shock protein 70 during rest and exercise stress. *Cell Stress Chaperones*. 2015., 20, 917–26.

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

Luminescence, 2011., <https://www.britannica.com/science/luminescence>, pristupljeno 5.6.2020.

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

Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest*. 2016, 150, 908-915.

PerkinElmer, ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System, Technical Manual, 2015, <https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf>, pristupljeno 22.6.2020.

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

Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?. *Cell Stress and Chaperones*, 2016., 21, 379-404.

Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *Biol Bull*. 2016., 231, 73-84

Sevin M, Giordon 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.

Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2012..., 122, 2749-2755.

Ünver R, Deveci F, Kırkıl G, Telo S, Kaman D, Kuluöztürk M. Serum heat shock protein levels and the relationship of heat shock proteins with various parameters in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Turkish Thorac J*. 2016., 17, 153–9.

Viegi, G, Pistelli, F, Sherrill, DL, Maio, S, Baldacci, S, Carrozzi, L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *European Respiratory Journal*, 2007., 30, 993-1013.

Whitham M, Fortes MB. Effect of blood handling on extracellular Hsp72 concentration after high-intensity exercise in humans. *Cell Stress Chaperones*, 2006., 11, 304-308.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Glavne karakteristike kronične opstruktivske plućne bolesti, opstrukcija dišnih putova i oštećenje tkiva, uzrokovane su kroničnom i progresivnom upalom. Izlaganje duhanskom dimu ili drugim stranim česticama uzrokuje oksidacijski stres te potiče izlučivanje citokina i infiltraciju imunskih stanica, koje svojim djelovanjem uništavaju plućno tkivo. Dvije molekule koje su dovedene u vezu s upalnim procesima u KOPB-u su izvanstanični Hsp70 i ATP. Njihov izvor u međustaničnom prostoru je posljedica oštećenja stanica te epitelne i imunostane stanice koje ih izlučuju tijekom upale. Obje molekule djeluju na imunostni sustav te su povezane s oštećenjem tkiva. Unatoč velikoj prevalenciji KOPB-a, metode dijagnostike su nedostatne i veliki broj pacijenata nema točnu dijagnozu i ne prima adekvatnu terapiju. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati koncentracije eHsp70 i eATP-a kod pacijenata koji boluju od KOPB-a i usporediti ih s koncentracijama kod kontrolne skupine zdravih ispitanika. Također se ispitala povezanost njihovih koncentracija s pušenjem i s težinom bolesti.

Koncentracije oba parametra, eHsp70 i eATP-a, bile su povišene kod skupine pacijenata s obzirom na kontrolnu skupinu, rasle su s težinom bolesti te su se značajno razlikovale i između pojedinih GOLD skupina. Koncentracije eHsp70 i eATP-a bile su više u bolesnika neovisno o njihovom pušačkom statusu u usporedbi sa skupinama zdravih pušača i zdravih nepušača. Međutim, koncentracije oba parametra kod skupine zdravih pušača bile su slične koncentracijama kod pacijenata u skupinama GOLD 2 i GOLD A, što bi moglo ukazati na početne upalne promjene kod tih osoba te mogućnost kasnijeg razvitka KOPB-a kod genski i drukčije podložnih pojedinaca.

Zaključno, koncentracije izvanstaničnog Hsp70 i ATP-a povišene su kod pacijenata koji boluju od KOPB-a, a porast koncentracije pokazuje povezanost s progresijom i težinom same bolesti.

Main characteristics of chronic obstructive pulmonary disease, obstruction of the airways and tissue damage, are caused by chronic and progressive inflammation. Exposure to tobacco smoke or other foreign particles causes oxidative stress and promotes production of cytokines and infiltration of the inflammatory cells, which further cause tissue damage. Two molecules that might be involved in inflammatory processes connected with COPD progression are extracellular Hsp70 and ATP. The source of those molecules in the extracellular matrix are damaged cells, and epithelial and immune cells which release them during inflammation. Both molecules interact with the immune system and are markers of tissue damage. Despite COPD's large prevalence, diagnostic methods are somewhat inadequate, and a large number of patients are undiagnosed or are not receiving appropriate treatment. The goal of this research was to assess concentrations of eHsp70 and eATP in patients diagnosed with COPD and to compare them with a control group, regarding their smoking status and GOLD classifications.

The concentrations of both parameters, eHsp70 and eATP, were increased in the patient group when compared to the control group, increased with the severity of the disease, and differed significantly between each GOLD group. The concentrations of eHsp70 and eATP were increased in patients regardless of their smoking status when compared to the healthy smokers and healthy nonsmokers. However, in the group of healthy smokers the concentrations of both parameters were similar to groups GOLD 2 and GOLD A. That could indicate some initial inflammatory changes and a possibility of later COPD development in genetically or otherwise susceptible individuals.

In conclusion, the concentrations of extracellular Hsp70 and ATP were increased in patients diagnosed with COPD, and the concentration increase shows correlation with the progression of the disease.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

AATD	nedostatak α -1 antitripsina
ADP	adenozin-difosfat
AMP	adenozin-monofosfat
APC	antigen prezentirajuće stanice (<i>engl.</i> antigen-presenting cells)
ASC	protein nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (<i>engl.</i> apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain)
ATP	adenozin-trifosfat
CARD	domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza (<i>engl.</i> caspase recruitment domain)
CAT	test za procjenu KOPB-a (<i>engl.</i> COPD Assesment Test)
CD	biljeg diferencijacije (<i>engl.</i> cluster of differentiation)
CLR	lektinski receptor tipa C (<i>engl.</i> C-type lectin receptor)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja (<i>engl.</i> danger-associated molecular pattern)
ELISA	enzimimunokemijska analiza (<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
FEV ₁	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GOLD	Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (<i>engl.</i> Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
Hsp	protein toplinskog šoka (<i>engl.</i> heat shock protein)
IFN	interferon
IL	interleukin
IRF3	čimbenika regulacije interferona 3 (IRF3, <i>engl.</i> interferon regulatory factor)
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LLR	peptidni slijedovi bogati leucinom (<i>engl. engl.</i> leucine-rich repeat)
MAPK	protein-kinaze aktivirane mitogenom (<i>engl.</i> mitogen activated protein kinase)
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
mMRC	modificirana skala zaduhe (<i>engl.</i> Modified British Medical Research Council Questionnaire)
NF- κ B	jezgrin čimbenik kappa B (<i>engl.</i> nuclear factor kappa B)
NLR	receptori slični NOD-u (<i>eng.</i> NOD-like receptors)

NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (<i>engl.</i> NOD-like receptor pyrin 3)
NOD	oligomerizacijska domena koja veže nukleotide (<i>engl.</i> nucleotide-binding oligomerisation domain)
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima (<i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern)
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture (<i>engl.</i> pattern recognition receptor)
PYD	pirinska domena (<i>engl.</i> pyrin domain)
RAGE	receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije (<i>engl.</i> receptor for advanced glycation end-products)
RIG-1R	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (<i>engl.</i> retinoic acidinducible gene 1 (RIG-I)-like receptor)
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
TLR	receptor sličan Tollu (<i>engl.</i> Toll-like receptors)
TNF α	čimbenik nekroze tumora alfa (<i>engl.</i> tumor necrosis factor alpha)
WHO	svjetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organisation)

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

IZVANSTANIČNI Hsp70 I ATP KAO POTENCIJALNI BIOMARKERI KOD KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

Tomislav Gavranović

SAŽETAK

Glavne karakteristike kronične opstruktivne plućne bolesti, opstrukcija dišnih putova i oštećenje tkiva, uzrokovane su kroničnom i progresivnom upalom. Izlaganje duhanskom dimu ili drugim stranim česticama uzrokuje oksidacijski stres te potiče izlučivanje citokina i infiltraciju imunskih stanica, koje svojim djelovanjem uništavaju plućno tkivo. Dvije molekule koje su dovedene u vezu s upalnim procesima u KOPB-u su izvanstanični Hsp70 i ATP. Njihov izvor u međustaničnom prostoru je posljedica oštećenja stanica te epitelne i imunske stanice koje ih izlučuju tijekom upale. Obje molekule djeluju na imunski sustav te su povezane s oštećenjem tkiva. Unatoč velikoj prevalenciji KOPB-a, metode dijagnostike su nedostatne i veliki broj pacijenata nema točnu dijagnozu i ne prima adekvatnu terapiju. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati koncentracije eHsp70 i eATP-a kod pacijenata koji boluju od KOPB-a i usporediti ih s koncentracijama kod kontrolne skupine zdravih ispitanika. Također se ispitivala povezanost njihovih koncentracija s pušenjem i s težinom bolesti.

Koncentracije oba parametra, eHsp70 i eATP-a, bile su povišene kod skupine pacijenata s obzirom na kontrolnu skupinu, rasle su s težinom bolesti te su se značajno razlikovale i između pojedinih GOLD skupina. Koncentracije eHsp70 i eATP-a bile su više u bolesnika neovisno o njihovom pušačkom statusu u usporedbi sa skupinama zdravih pušača i zdravih nepušača. Međutim, koncentracije oba parametra kod skupine zdravih pušača bile su slične koncentracijama kod pacijenata u skupinama GOLD 2 i GOLD A, što bi moglo ukazati na početne upalne promjene kod tih osoba te mogućnost kasnijeg razvitka KOPB-a kod genski i drukčije podložnih pojedinaca.

Zaključno, koncentracije izvanstaničnog Hsp70 i ATP-a povišene su kod pacijenata koji boluju od KOPB-a, a porast koncentracije pokazuje povezanost s progresijom i težinom same bolesti.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 9 grafičkih prikaza, 3 tablice i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: eHsp70, eATP, kronična opstruktivna plućna bolest

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. Marija Grdić Rajković, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach Rojceky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad 2020.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

EXTRACELLULAR Hsp70 AND ATP AS POTENTIAL BIOMARKERS FOR PROGRESSION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Tomislav Gavranović

SUMMARY

Main characteristics of chronic obstructive pulmonary disease, obstruction of the airways and tissue damage, are caused by chronic and progressive inflammation. Exposure to tobacco smoke or other foreign particles causes oxidative stress and promotes production of cytokines and infiltration of the inflammatory cells, which further cause tissue damage. Two molecules that might be involved in inflammatory processes connected with COPD progression are extracellular Hsp70 and ATP. The source of those molecules in the extracellular matrix are damaged cells, and epithelial and immune cells which release them during inflammation. Both molecules interact with the immune system and are markers of tissue damage. Despite COPD's large prevalence, diagnostic methods are somewhat inadequate, and a large number of patients are undiagnosed or are not receiving appropriate treatment. The goal of this research was to assess concentrations of eHsp70 and eATP in patients diagnosed with COPD and to compare them with a control group, regarding their smoking status and GOLD classifications.

The concentrations of both parameters, eHsp70 and eATP, were increased in the patient group when compared to the control group, increased with the severity of the disease, and differed significantly between each GOLD group. The concentrations of eHsp70 and eATP were increased in patients regardless of their smoking status when compared to the healthy smokers and healthy nonsmokers. However, in the group of healthy smokers the concentrations of both parameters were similar to groups GOLD 2 and GOLD A. That could indicate some initial inflammatory changes and a possibility of later COPD development in genetically or otherwise susceptible individuals.

In conclusion, the concentrations of extracellular Hsp70 and ATP were increased in patients diagnosed with COPD, and the concentration increase shows correlation with the progression of the disease.

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

Thesis includes: 39 pages, 9 figures, 2 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: eHsp70, eATP, chronic obstructive pulmonary disease

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

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

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: october 2020.