

# Utjecaj izvanstaničnog proteina Hsp70 i cigaretnog dima na aktivaciju inflammasoma, nekroptoze i piroptoze u staničnim modelima kronične opstruktivske plućne bolesti

---

Fabijanec, Marija

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:603840>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Fabijanec

**Utjecaj izvanstaničnog proteina Hsp70 i  
cigaretnog dima na aktivaciju inflammasoma,  
nekroptoze i piroptoze u staničnim modelima  
kronične opstruktivske 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.



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

Iskrene i posebne zahvale dragoj mentorici prof. dr. sc. Ladi Rumora, prije svega na podršci, pruženim mogućnostima, stručnom vodstvu, ideji, strpljenju, suradljivosti i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i dragima doc. dr. sc. Mariji Grdić Rajković, doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura i doktorandici Ivi Hlapčić na suradljivosti i strpljenju prilikom izvođenja praktičnog dijela ovog rada.

Zahvale i svim ostalim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu kojeg je ovaj rad nastao. Zahvaljujem mojoj obitelji, prijateljima i kolegama što su mi na bilo koji način pomogli na putu do diplome. Ne moram vas posebno isticati, znate koji ste i da je s vama sve lakše.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pluća .....	1
1.2. Kronična opstruktivna plućna bolest.....	2
1.2.1. Patogeneza kronične opstruktivne plućne bolesti .....	4
1.3. Protein Hsp70 .....	5
1.4. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRRs) .....	6
1.4.1. TLR.....	7
1.4.2. NLR.....	8
1.5. Inflamasom .....	10
1.5.1. Uloga NLRP3 inflamasoma u KOPB-u .....	12
1.6. Stanična smrt .....	12
1.6.1. Apoptoza.....	12
1.6.2. Nekroptoza .....	14
1.6.3. Piroptoza.....	16
1.7. Kaspaze .....	18
1.7.1. Kaspaza-1 .....	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3. MATERIJALI I METODE .....	20
3.1. Kultura stanica.....	20
3.1.1. Stanične linije.....	20
3.1.2. Primarne stanice .....	21
3.2. Presađivanje stanica .....	21
3.3. Određivanje broja stanica.....	22
3.4. Tretiranje stanica .....	22
3.4.1. Tretiranje stanica rekombinantnim humanim Hsp70 proteinom.....	22
3.4.2. Tretiranje stanica ekstraktom cigaretnog dima .....	23

3.5. Određivanje koncentracije citokina IL-1 $\beta$ .....	23
3.6. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat-dehidrogenaze u mediju iznad stanica .....	24
3.7. Detekcija proteina Western blot metodom.....	25
3.7.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize.....	25
3.7.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu .....	26
3.7.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....	26
3.7.4. Western blot analiza .....	27
3.8. Detekcija mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, <i>engl.</i> quantitative PCR) .....	29
3.8.1. Izolacija RNA iz stanica.....	29
3.8.2. Sinteza cDNA.....	29
3.8.3. Određivanje ekspresije gena.....	30
3.9. Statistička obrada podataka .....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4.1. Rezultati .....	32
4.1.1. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ u NCI-H292 i NHBE stanicama.....	32
4.1.2. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ u THP-1 i MDM stanicama.....	33
4.1.3. Određivanje koncentracije IL-1 $\beta$ izlučenog iz NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanica.....	36
4.1.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a, rhHsp70 te njihovih kombinacija na NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanice .....	38
4.1.5. Western blot analiza ekspresije GSDMD-a te aktivacije RIPK3 i MLKL-a u MDM, THP-1, NCI-H292 i NHBE stanicama .....	40
4.2. Rasprava .....	42
5. ZAKLJUČCI .....	45
6. LITERATURA.....	47
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	58
8. PRILOZI.....	60

8.1. Popis kratica ..... 60

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1. Pluća

Pluća su glavni organ dišnog sustava u čovjeka. Građena su od lijevog i desnog plućnog krila pri čemu je lijevo podijeljeno na dva (gornji i donji), a desno na tri režnja (gornji, srednji i donji), a režnjevi su podijeljeni na po deset odsječaka. Pluća zauzimaju najveći dio prsišta. Na unutarnjoj (medijalnoj) strani pluća nalazi se plućna stapka kojom u pluća ulaze dušnice, krvne i limfne žile te živci. Plućni mjehurići, odnosno alveole, prostori su s tankim stijenkama jednoslojnog epitela koje se međusobno dotiču, stijenke su obložene mrežom krvnih kapilara koja je okružena elastičnim vezivnim vlaknima. U alveolama se nalazi zrak pa je krv od zraka odijeljena samo tankom stijenkom, alveokapilarnom opnom, i međustaničnim prostorom. U stijenci se nalaze pneumociti, a to su stanice koje izlučuju tvar surfaktant koja povećava površinsku napetost i sprječava kolabiranje alveola.

Osnovna uloga pluća je disanje. Alveole čine veliku dišnu površinu. Samo disanje je izmjena plinova između zraka u alveolama i krvi u plućnim kapilarama, a omogućeno je mišićnim djelovanjem pri čemu udisajem zrak ulazi u pluća, a izdisajem se potiskuje iz pluća. Udisajem zrak dišnim putovima dolazi do alveola kroz čije stijenke kisik ulazi u kapilarnu vensku krv, a krvlju dolazi do svih stanica u tijelu. U stanicama nastaje ugljikov dioksid koji izdisajem izlazi iz venske krvi i prelazi u zrak u alveolama. Zrak u alveolama mora se neprestano obnavljati kako ne bi došlo do izjednačavanja tlakova plinova u krvi i u zraku, a to se ostvaruje razlikom tlakova između tlaka zraka koji se nalazi u plućima i onoga u okolini koji je stalan pa se zapravo mora mijenjati samo tlak u plućima (Keros i sur., 1999).

Za izmjenu plinova u plućima iznimno je bitan omjer alveolarne ventilacije i protoka krvi. Kad je taj omjer manji od normalnog, ventilacija nije dostatna osigurati onoliko kisika koliko je potrebno za potpunu oksigenaciju krvi koja protječe kroz alveolarne kapilare i zato se dio venske krvi u plućnim kapilarama ne oksigenira. Za takvu krv se kaže da je *prošla kroz šant*. Šant se definira kao spoj dvaju anatomskih kanala koji omogućava miješanje njihova sadržaja, konkretno u ovom slučaju dolazi do miješanja arterijske i venske krvi. Dio krvi prolazi i kroz bronhlane žile, umjesto kroz alveolarne kapilare i takva krv je također neoksigenirana te prolazi kroz šant. Dolazimo do pojma koji se naziva fiziološki šant, a to je ukupna količina krvi koja u jednoj minuti prolazi kroz šant. Što je on veći, to je veća i količina krvi koja se pri prolazu kroz pluća ne oksigenira. U slučaju kada je ventilacija nekih alveola velika, a protok krvi kroz pluća malen, u alveolama je na raspolaganju puno više kisika nego što ga krv može prenijeti iz alveola pa se za ventilaciju tih alveola kaže da je neiskorištena. Neiskorištena je i

ventilacija anatomskog mrtvog prostora u dišnim putovima. Zbroj ovih dvaju oblika neiskorištene ventilacije naziva se fiziološki mrtvi prostor. Kad je on velik, pri ventilaciji se mnogo rada troši uzalud jer velika količina ventiliranoga zraka ne dolazi u doticaj s krvlju. Učinkovitost pluća kao organa za izmjenu plinova izrazito je smanjena kod kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB) jer je u toj bolesti u nekim područjima pluća vrlo izražen fiziološki šant, a u drugima je vrlo izražen fiziološki mrtvi prostor (Guyton i Hall, 2012).

## 1.2. Kronična opstruktivska plućna bolest

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je učestala bolest koju je moguće spriječiti i liječiti, ali ne i izliječiti, a karakteriziraju je trajni respiracijski simptomi i ograničen protok zraka uzrokovan poremećajima dišnih putova ili alveola. Do poremećaja u dišnim putovima i alveolama najčešće dolazi zbog izlaganja stranim česticama ili plinovima. Kronična upala uzrokuje strukturne promjene, sužavanje malih dišnih putova i uništavanje plućnog parenhima, što dovodi do gubitka alveolarne povezanosti s malim dišnim putovima i smanjenja plućne elastičnosti. Posljedica toga je smanjenje sposobnosti dišnih putova da budu otvoreni tijekom izdisaja. Ove patološke promijene dovode do ograničenja protoka zraka te do simptoma karakterističnih za KOPB kao što su otežano disanje (dispneja), kronični kašalj i stvaranje sputuma (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2020; Decramer i sur., 2012).

KOPB je rezultat složene interakcije okolišnih i genskih čimbenika. Potrebno je istaknuti najznačajniji čimbenik rizika za razvoj bolesti, a to je aktivno, ali i pasivno pušenje duhana. Većina bolesnika s KOPB-om (oko 80 %) su pušači, no samo 15-25 % pušača razvije bolest. Jedan od rizičnih čimbenika 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 čimbenik je izloženost na radnom mjestu, npr. organskoj i anorganskoj prašini, kemijskim agensima i dimu (Eisner i sur., 2010; Salvi i Barnes, 2009; Roth, 2008). Od genskih čimbenika najpoznatiji je nasljedni nedostatak  $\alpha$ -1 antitripsina (Stoller i Aboussouan, 2005). Smatra se da taj nedostatak utječe na svega 1-2 % svih slučajeva KOPB-a (Buttar i Bernstein, 2018). Na nedostatak  $\alpha$ -1 antitripsina treba sumnjati u bolesnika s KOPB-om bez povijesti pušenja, s anamnezom ranog početka bolesti (<50 godina starosti) ili u onih s obiteljskom anamnezom nedostatka ovog enzima, a određene smjernice i Svjetska zdravstvena organizacija predlažu da se nedostatak  $\alpha$ -1 antitripsina procjenjuje i određuje kod svih pacijenata oboljelih od KOPB-a (da Costa i sur. 2019). 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).

Još uvijek nije razjašnjeno zašto se KOPB češće javlja kod starijih osoba, ali smatra se da do KOPB-a dovodi tzv. „zdravo starenje“ ili dob zapravo odražava zbroj kumulativne izloženosti štetnim česticama tijekom života (Mercado i sur., 2015). Spol također utječe na pojavu ove bolesti. Rizik za razvoj bolesti je veći kod muškaraca nego kod žena, međutim te se razlike smanjuju (de Marco i sur., 2010). Novija istraživanja ukazuju na to da je učestalost KOPB-a podjednaka u muškaraca i žena uglavnom zbog povećane uporabe duhana i izloženosti dimu, koji nastaje izgaranjem biomase, u žena (Gut-Gobert i sur., 2019).

„Zlatni standard“ za dijagnostiku KOPB-a je još uvijek spirometrija (Diaz-Guzman i Mannino, 2014). Spirometrija je test funkcije pluća kojim se mjeri količina zraka koju osoba može izdahnuti i vrijeme potrebno da to učini. Mjerenjem se dobivaju vrijednosti parametara potrebnih za postavljanje dijagnoze KOPB-a, a to su forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i Tiffeneauov indeks, omjer  $FEV_1$  i FVC-a ( $FEV_1/FVC$ ). Ako je vrijednost  $FEV_1/FVC < 0,70$  nakon primjene bronhodilatatora potvrđuje se dijagnoza KOPB-a (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2020). Medikamentozno liječenje KOPB-a ovisi o stupnjevima bolesti, a osnovni lijekovi u liječenju KOPB-a su bronhodilatatori koji dovode do širenja dišnih putova. Za teže oblike bolesti koriste se protuupalni lijekovi iz skupine inhalacijskih kortikosteroida.

Progresivni tijek KOPB-a pojačavaju egzacerbacije i komorbiditeti, ali i sistemska komponenta bolesti jer se KOPB ne smatra bolešću ograničenom samo na pluća. Sistemske manifestacije bolesti su kronična upala, oksidacijski stres, aktivacija imunskih stanica, povišene koncentracije upalnih citokina u krvi, komorbiditeti koji uključuju kardiovaskularne poremećaje, metabolički sindrom, disfunkciju mišića, osteoporozu, malnutriciju, anksioznost i depresiju te karcinom pluća. Takve manifestacije bolesti značajno utječu na težinu i kliničku sliku bolesti i smanjuju kvalitetu života bolesnika (Cavailles i sur., 2013; Agusti i Soriano, 2008; Agusti i sur., 2003).

Zato je potrebno provoditi individualnu terapiju, onu koja je prilagođena svakom pacijentu, a koja uključuje vježbanje, edukaciju, promjenu načina života, što se prvenstveno odnosi na prestanak pušenja, s ciljem rehabilitacije pluća te općenito poboljšanja fizičkog i psihičkog stanja oboljele osobe jer je KOPB ozbiljna i kompleksna bolest te se smatra uzrokom smrti za 2,9 milijuna ljudi godišnje (Lopez-Campos i sur., 2016).

### 1.2.1. Patogeneza kronične opstruktivske plućne bolesti

Patološke promjene u KOPB-u nastaju prvenstveno zbog izlaganja nizu vanjskih rizičnih čimbenika, posebice pušenju cigareta, a bitan faktor je i genska predispozicija. Cigaretini dim sadrži brojne kemijske komponente koje uključuju oksidanse, poput reaktivnih aldehida i kinona koji mogu stvarati hidroksilne radikale i vodikov peroksid. Dugotrajna izloženost cigaretinom dimu, ali i ostali rizični čimbenici, posljedično dovode do nastajanja pojačanog i neprimjerenog upalnog odgovora koji pak dovodi do oštećenja pluća, odnosno razvija se kronična upala. Neki od ostalih etiopatogenetskih čimbenika razvoja KOPB-a su oksidacijski stres, neravnoteža između proteaza i antiproteaza te propadanje alveola apoptozom (Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

Upalni odgovor dovodi do infiltracije upalnih stanica – limfocita, aktiviranih neutrofila i makrofaga koje u svom obrambenom djelovanju luče niz različitih enzima, poput elastaza i metaloproteinaza, te na taj način uništavaju plućno tkivo. Oksidansi i drugi molekularni obrasci povezani s patogenima i oštećenjem tkiva prisutni u dimu aktiviraju jezgrin čimbenik kappa B (NF- $\kappa$ B, *engl.* nuclear factor kappa B) i njegov signalni put, odnosno upalni odgovor. Upala, već spomenutim mehanizmima, dovodi do ozljede plućnog parenhima pa se ključnom patogenetskom karakteristikom KOPB-a smatra neadekvatna i nedovoljna sposobnost regeneracije tako oštećenog tkiva, odnosno neravnoteža u oštećenju i obnavljanju plućnog parenhima. Kao posljedica apoptoze alveolarnih i epitelnih stanica nastaje emfizem čime se gubi površina za izmjenu plinova, a faktori koji uopće uzrokuju apoptozu mogu biti nedostatak čimbenika rasta, oksidacijski stres ili odgovor stanice na stres.

Napretkom bolesti sve više se pojačava aktivacija i lučenje upalnih citokina i kemokina, dolazi do pretvorbe makrofaga iz tipa M1 u tip M2 koji potiče fibrozu. Fibroza posebno utječe na najuže dijelove dišnih putova, tj. posebno je izražena u malim dišnim putovima promjera manjeg od 2 milimetra. Bakterijske i virusne infekcije mogu uzrokovati egzacerbacije bolesti i pojačati upalu te oštećenje parenhima. Dolazi do otpuštanja antigena iz oštećenih epitelnih i alveolarnih stanica, a njih imunosni sustav prepoznaje kao strane. Također, značajne su strukturne promjene plućnog parenhima, pri čemu se kolagen zamjenjuje elastinom.

Osim dišnog sustava, KOPB se ogleda i u drugim organskim sustavima. Primjerice, smanjena je hematopoetska aktivnost koštane srži, oštećuje se mišićno tkivo, smanjena je mogućnost fizičke aktivnosti i oslabljena je regeneracija krvožilnog sustava. Zbog svega navedenog, KOPB se ne smatra samo respiracijskom, već i sistemskom upalnom bolešću (Tuder i Petrache, 2012; MacNee, 2005).

### 1.3. Protein Hsp70

Proteini toplinskog šoka (Hsp, *engl.* heat shock protein) otkriveni su 1974. godine u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*), a predstavljaju skupinu proteina stresa koji su eksprimirani u stanicama svih organizama (Borges i sur., 2012; Tissieres i sur., 1974). Ekspresija ovih proteina inducirana je toplinskim stresom, odnosno, koncentracija im se povećava pri povišenju temperature pa su shodno toj činjenici dobili naziv. Osim povišenom temperaturom, induciraju se različitim oblicima staničnog stresa kao što su okolišni čimbenici (teški metali, reaktivni kisikovi spojevi, ultraljubičasto i radioaktivno zračenje, citostatici i drugi lijekovi, kemikalije), patofiziološka stanja (upala, ishemija, hipoksija, virusne i bakterijske infekcije, maligne transformacije) i fiziološki čimbenici (rast i diferencijacija stanica) (Srivastava, 2008; Barišić i sur., 2003). Nazivaju se još i šaperoni jer nadziru smatanje proteina, stvaranje multiproteinskih kompleksa, razvrstavanje i prijenos proteina u određene organele te sprječavaju denaturaciju proteina.

Hsp superporodica podijeljena je u nekoliko porodica koje su dobile ime prema približnim molekulskim masama: mali Hsp proteini, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110 (Pockley, 2003).

Najviše izučeni član Hsp70 porodice je inducibilni Hsp70 protein, molekulske mase 72 kDa, čija je sinteza potaknuta u stanjima stresa. Ovaj protein ima brojne unutarstanične učinke koji uključuju sprječavanje agregacije proteina, potpomaganje pravilnog smatanja novosintetiziranih polipeptidnih lanaca kao i ponovnog smatanja oštećenih proteina, čime se potiče preživljavanje stanice usprkos stresnim uvjetima. Hsp70 utječe i na apoptozu na način da stupa u interakciju s košaperonom Bag-1 koji stupa u interakciju s anti-apoptoznim proteinom Bcl-2. Povišeni Hsp70 štiti stanice od citotoksičnosti inducirane tvarima koje potiču apoptozu, a to su, primjerice, čimbenik nekroze tumora (TNF, *engl.* tumor necrosis factor), radijacijski i kemoterapijski agensi. Monociti također mogu inducirati apoptozu pa i u tom slučaju povišeni Hsp70 ima protektivni učinak. Hsp70 se izravno veže na čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, *engl.* apoptotic protease activating factor-1) i sprječava nastajanje funkcionalnog apoptosoma te na taj način koči apoptozu, odnosno ima anti-apoptozno djelovanje. Hsp70 sudjeluje i u regulaciji imunskog odgovora tako da inhibira NF- $\kappa$ B signalni put te sprječava odgovor stanice na upalne citokine (Sevin i sur., 2015; Sharma i Masison, 2009; Giffard i sur., 2008).

Hsp70 protein uglavnom je lokaliziran unutar stanice, ali može se osloboditi iz stanice aktivnim ili pasivnim putem te tako prijeći u izvanstanični prostor. Hsp70 koji je prisutan izvan stanice naziva se izvanstanični Hsp70 (eHsp70, *engl.* extracellular Hsp70). Kada nije prisutno stanično oštećenje ili umiranje, Hsp70 oslobađa se aktivnim putem i to egzocitozom,

a pasivni put oslobađanja nastaje uslijed oštećenja stanične membrane i/ili nekroze stanica pa se može osloboditi ukupni citosolni Hsp70. Povećanje koncentracije Hsp70 u izvanstaničnom prostoru služi kao „signal opasnosti“. Naime, eHsp70 se veže na različite membranske receptore prisutne na specifičnim imunskim stanicama te tako modulira imunosne odgovore (Johnson i Fleshner, 2006; Asea i sur., 2000). Moguće je i da eHsp70 ima zaštitno djelovanje kad je prisutan u nižim koncentracijama i da tada predstavlja normalan odgovor na infekciju ili stres.

Imunomodulacijsko djelovanje svrstava Hsp70 protein u skupinu molekula koje se nazivaju molekularni obrasci oštećenja (DAMP, *engl.* damage-associated molecular pattern). Molekularni obrasci oštećenja su endogene molekule koje se pri normalnim fiziološkim uvjetima nalaze unutar stanice, ali se u uvjetima staničnog stresa ili oštećenja stanica otpuštaju u izvanstanični prostor te tamo predstavljaju „signal opasnosti“ i mogu potaknuti proces sterilne upale (bez prisutnosti patogena koji nose molekularne obrasce povezane s patogenima; PAMPs, *engl.* pathogen-associated molecular pattern). Fiziološki upalni odgovor potaknut je niskim koncentracijama DAMP molekula koje mogu povoljno djelovati na tkivni popravak, dok su u kroničnoj upali te molekule prisutne u visokim koncentracijama. Kritičan koncentracijski prag DAMP molekula koji je potreban da se potakne razvoj bolesti može ovisiti o trajanju i stupnju oštećenja. Povišena koncentracija eHsp70 prisutna je u različitim upalnim bolestima, uključujući i KOPB (Qu i sur., 2015).

#### 1.4. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRRs)

U plućnim bolestima, kao što je KOPB, značajnu ulogu ima urođeni imunosni sustav koji djeluje preko receptora koji prepoznaju molekulske strukture (PRR, *engl.* pattern recognition receptor). Ti receptori nalaze se na epitelnim i imunskim stanicama te potiču upalni odgovor nakon što se na njih vežu PAMP-ovi i DAMP-ovi (Bezemer i sur., 2012). Njihovim vezanjem na PRR receptore pokreće se signalna kaskada koja rezultira sintezom upalnih citokina, interferona (IFN) i kemokina koji aktiviraju okolne stanice te pokreću aktivaciju makrofaga i neutrofila. PRR receptori na dendritičnim stanicama i makrofagima osiguravaju daljnji neophodni signal za indukciju T stanica. Upravo u tome se očituje važnost PRR receptora kod akutnih infekcija respiracijskog trakta, kao što su pneumonija i egzacerbacije KOPB-a zbog infekcije (Opitz i sur., 2010).

Nekoliko skupina receptora pripada PRR-ovima: receptori slični Tollu (TLR, *engl.* Toll-like receptor), lektinski receptori tipa C (CLR, *engl.* C-type lectin receptor), receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl.* nucleotide-binding

oligomerization domain (NOD)-like receptor), receptori krajnjih produkata uznapredovale glikacije (RAGE, *engl.* receptor for advanced glycation end-products) i receptori slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (RIG-1R, *engl.* retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor) (Pouwels i sur., 2014; Opitz i sur., 2010).

#### 1.4.1. TLR

Receptori slični Tollu (TLR) su transmembranski proteini koji sadrže izvanstaničnu domenu sa 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). Imaju mogućnost stvaranja heterodimera s drugim receptorima i koreceptorima kako bi povećali svoju raznolikost i mogućnost vezanja različitih molekularnih struktura. Prepoznaju i PAMP-ove, koji potječu od mikroorganizama, i DAMP-ove, koji potječu iz oštećenog tkiva. PAMP-ovi i DAMP-ovi potiču signalne putove koji dovode do aktivacije transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B, aktivacijskog proteina 1 (AP-1, *engl.* activator protein-1) i čimbenika 3 regulacije interferona (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), TNF- $\alpha$  i interferon.

TLR-ovi se prema smještaju u stanici dijele na receptore na staničnoj membrani (TLR1, -2, -4, -5 i -6) te one koji se nalaze na membrani endosoma i lizosoma (TLR3, -7, -8 i -9). Nalaze se na stanicama pluća i na imunskim stanicama koje infiltriraju u pluća tijekom upale. Cigaretni dim, kao najznačajniji čimbenik rizika za KOPB, potiče upalu i sintezu citokina aktivacijom TLR-ova i djeluje na ekspresiju receptora. Zbog povećane sekrecije mukusa i njegovog otežanog uklanjanja, pluća pacijenata oboljelih od KOPB-a kolonizirana su bakterijama čije su komponente staničnih stijenki PAMP-ovi koje prepoznaju receptori TLR2 i TLR4, a oni su ujedno uključeni u imunski odgovor na čestice prisutne u onečišćenom zraku. Virusni PAMP-ovi djeluju preko receptora TLR3, -7 i -8.

Neprikladni odgovor TLR-ova na PAMP-ove može dovesti do egzacerbacija zbog preslabe ili prejake aktivacije imunskog sustava što dovodi do oštećenja vlastitog tkiva. Tijekom KOPB-a dolazi i do povećane razgradnje i izgradnje izvanstaničnog matriksa te je usporena eliminacija apoptoznih stanica iz pluća, a neke molekule, poput razgrađene hijaluronske kiseline, djeluju kao DAMP-ovi koje vežu TLR-ovi i koji potiču imunski odgovor.

TLR4 je prvi otkriveni TLR. Njegovi ligandi su lipopolisaharid (LPS, *engl.* lipopolysaccharide) koji je PAMP, neki virusi, endogene molekule poput fibrina, hema, Hsp70. Receptor se nalazi na površini stanica hematopoeze, endotelnih stanica, kardiomiocita

i stanica živčanog sustava. TLR2 receptor nalazi se na imunosnim stanicama, npr. neutrofilima, monocitima, makrofagima te dendritičnim stanicama. Prepoznaje brojne PAMP-ove, poput peptidoglikana i lipoteikoične kiseline (LTA, *engl.* lipoteichoic acid) iz stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija, lipoproteine i lipopeptide iz stanične stijenke Gram-negativnih bakterija, glikolipide iz stanične membrane parazita, različite vrste virusa. Prepoznaje i neke endogene molekule poput hijaluronske kiseline i Hsp70. Vezanjem liganda na TLR2 potiče se unutarstanična signalna kaskada koja dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (Mukherjee i sur., 2016; Molteni i sur., 2016; Bezemer i sur., 2012; Lorne i sur., 2010; Sandor i Buc, 2005).

#### 1.4.2. NLR

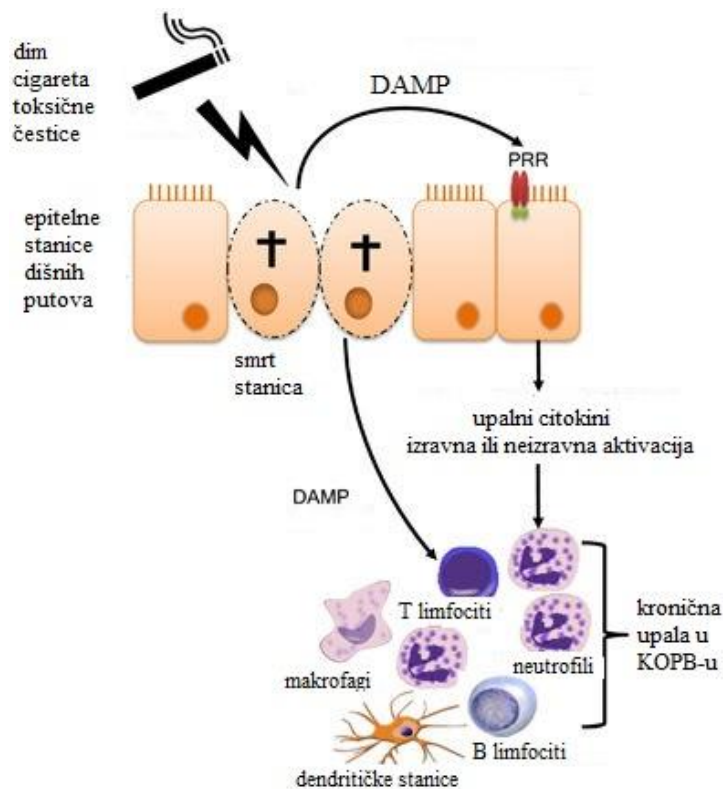
NLR-ovi su unutarstanični PRR receptori. Njihovu porodicu u ljudi čine 22 člana. Većina ih je smještena u citoplazmi. Njihovu strukturu čine: središnja oligomerizacijska domena koja veže nukleotide (NOD, *engl.* nucleotide-binding oligomerization domain) i LRR slijedovi na C-kraju koji vežu ligande. NLR receptori na N-kraju sadrže različite domene za vezanje efektorskih molekula što dovodi do aktivacije različitih signalnih putova.

Proteini koji sadrže NACHT, LRR i PYD domene (NLRP, *engl.* NACHT, LRR and PYD-containing protein) čine podskupinu NLR receptora s pirinskom domenom (PYD, *engl.* pyrin domain) na N-kraju molekule. Neki od tih NLRP proteina tvore multiproteinske komplekse koji se nazivaju inflammasomi, a od kojih je najbolje izučen NLRP3 inflammasom.

Uloga svih članova NLR porodice je otkriti potencijalno štetne podražaje u citosolu, dakle PAMP-ove i DAMP-ove, te inducirati proteolitičko kidanje i aktivaciju IL-1 $\beta$  i IL-18.

IL-1 $\beta$  je snažan, pirogeni, upalni citokin koji ima važnu ulogu u iniciranju akutnih upalnih odgovora na podražaje uzrokovane infektivnim i štetnim agensima ili pak oštećenjem stanica. Sintetizira se u inaktivnom obliku, a to je pro-IL-1 $\beta$ , prvenstveno u makrofagima, ali također i u neutrofilima, limfocitima, epitelnim stanicama dišnih putova i fibroblastima. Proteolitičkim kidanjem pro-IL-1 $\beta$  nastaje aktivni IL-1 $\beta$  koji se oslobađa u izvanstanični prostor gdje vrši svoje upalne učinke vezanjem na izvanstaničnu domenu receptora 1 za IL-1 (IL-1R1, *engl.* IL-1 receptor 1). IL-1 $\beta$  može djelovati autokrino ili parakrino, ima vrlo važnu ulogu u akutnom upalnom odgovoru na respiracijsku infekciju, no njegova prekomjerna aktivacija i otpuštanje može uzrokovati kroničnu sistemska upalu. Kod oboljelih od KOPB-a, IL-1 $\beta$  snažno potiče makrofage na otpuštanje upalnih citokina, kemokina i metaloproteinaze matriksa 9 (MMP-9, *engl.* matrix metalloproteinase 9). Koncentracija IL-1 $\beta$  je povišena u sputumu bolesnika s KOPB-om te njegova koncentracija korelira s težinom bolesti, kao i

smanjenje koncentracije antagonista IL-1 receptora i topljivog IL-1 receptora. IL-1 $\beta$  potiče leukocitozu tako što povećava otpuštanje neutrofila iz koštane srži, također potiče proliferaciju fibroblasta, otpuštanje prostaglandina i kolagenaze te sintezu fibronektina i kolagena (Pinkerton i sur., 2017; Sapey i sur., 2009; Culpitt i sur., 2003; Chung i sur., 2001). IL-18 izvorno je opisan kao IFN $\gamma$  inducirajući faktor. Također se sintetizira kao inaktivni prekursor (pro-IL-18) koji zahtijeva aktivaciju inflammasoma i kaspaze-1 kako bi postao biološki aktivan. Za razliku od IL-1 $\beta$ , IL-18 konstitutivno se eksprimira u mezenhimskim stanicama, ali nakon aktivacije primarno se nalazi u makrofagima i dendritičnim stanicama. Aktivacija IL-18 je bitna za uklanjanje patogenih limfocitima te za induciranje antivirusnog imunskog odgovora putem indukcije IFN $\gamma$ . Dokazano je da je njegova aktivnost povezana s plućnim bolestima pa tako i s KOPB-om (Pinkerton i sur., 2017; Sawada i sur., 2013; Dinarello i sur., 2013; Imaoka i sur., 2008; Nakanishi i sur., 2001; Okamura i sur., 1995).



Slika 1. Mehanizam nastanka kronične upale u KOPB-u

Preuzeto iz: Pouwels i sur. 2014.

## 1.5. Inflamasom

Inflamasomi su makromolekulski signalni kompleksi koji nastaju u stanicama kao reakcija na različite fiziološke i patološke uvjete. Iznimno su bitna komponenta urođene imunosti i potrebni su za uklanjanje patogena ili oštećenih vlastitih stanica. Građeni su od receptora, adaptacijske molekule i efektor, odnosno kaspaze-1. Adaptacijska molekula, koja se nalazi između receptora i kaspaze-1, potrebna je većini inflamasoma, 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 CARD, *engl.* caspase activation and recruitment domain).

Prema strukturi receptora koje sadrže, inflamasomi se mogu podijeliti na inflasome s receptorom sličnim oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR) i inflasome s receptorom sličnim proteinu 2 odsutnom u melanomu (ALR, *engl.* absent in melanoma 2-like receptors) (Sharma i Kanneganti, 2016).

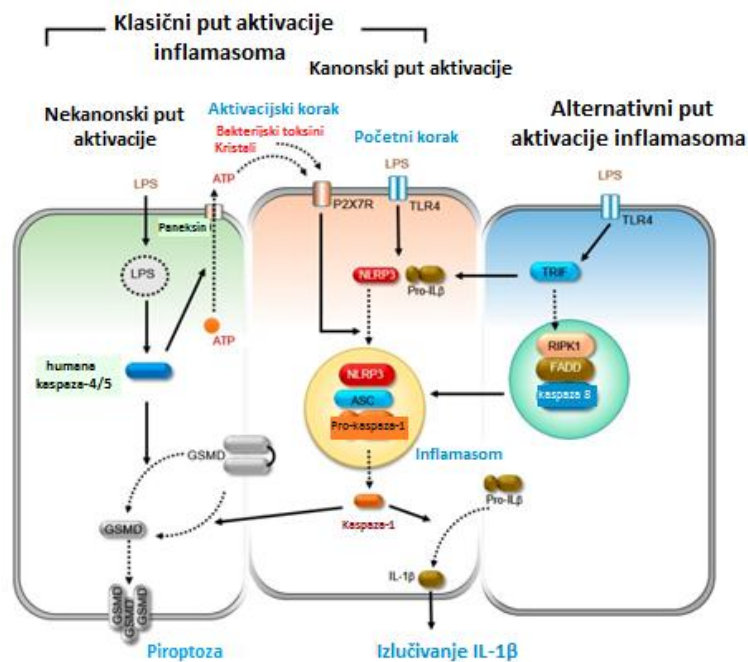
Već je spomenuto da je najbolje istražen NLR receptor NLRP3. Taj receptor sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (NLRP3, *engl.* NOD-like receptor pyrin 3) i konstitutivno je eksprimiran u niskim količinama u stanicama mijeloidne loze. Aktivacija inflamasoma je strogo reguliran proces. Razlikujemo klasični (kanonski i nekanonski) te alternativni put aktivacije. Kanonski put aktivacije NLRP3 inflamasoma uključuje 2 koraka, a to su tzv. početni (priming) korak i korak aktivacije. U početnom koraku različiti PAMP-ovi i DAMP-ovi potiču ekspresiju NLRP3 i pro-IL-1 $\beta$  što je posredovano NF- $\kappa$ B signalnim putovima. U koraku aktivacije dolazi do sklapanja NLRP3 inflamasoma, aktivacije kaspaze-1, proteolitičkog kidanja prekursora IL-1 $\beta$  i IL-18 te njihovog izlučivanja, a sve to potaknuto je drugim signalom koji može biti neki egzogeni ili endogeni ligand, odnosno opet neka PAMP ili DAMP molekula. Brojni stanični događaji, poput stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, *engl.* reactive oxygen species), promjene staničnog volumena, signaliziranja putem kalcija, lizosomski poremećaji, mitohondrijska disfunkcija također mogu djelovati kao signali za aktivaciju NLRP3 inflamasoma, a najistaknutiji među njima je izlučivanje kalija, no točan mehanizam kojim toliko različitih molekula i signalnih putova može specifično aktivirati ovaj kompleks još uvijek nije poznat. Ipak, sve ove značajke povezane su sa staničnim stresom te se pretpostavlja da bi NLRP3 mogao biti senzor oštećenja stanica. Važno je napomenuti da kanonskom aktivacijom inflamasoma dolazi do piroptoze, regulirane stanične smrti za koju je ključno kidanje proteina gasdermina D (GSDMD) aktiviranom kaspazom-1 u inflamasomu.

Nekanonski put aktivacije inflamasoma potaknut je kaspazama-4/-5 u čovjeka te kaspazom-11 u miševa. Aktivacija ovih kaspaza potaknuta je izravnim prepoznavanjem bakterijskog



lipopolisaharida (LPS) ili lipida A kada su prisutni u citoplazmi. I u ovom putu aktivacije inflammasoma dolazi do kidanja GSDMD-a kaspazama, shodno tome i do piroptoze te do povećanog otpuštanja upalnih citokina. Za razliku od kaspaze-1, ove kaspaze ne kidaju izravno pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18 već dovode do aktivacije transmembranskog kanala paneksina-1 što potiče otpuštanje adenozin-trifosata (ATP) i kalija iz stanica, a to naposljetku dovodi do aktivacije NLRP3 inflammasoma i povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$ .

Za razliku od klasičnih putova aktivacije, alternativni put aktivacije inflammasoma zahtjeva samo jedan signal i uključuje TLR4. I u ovom putu aktivacije inflammasoma potrebna je ASC, aktivira se kaspaza-1, ali razlika je također u tome što je u ovom putu potreban adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon  $\beta$  (TRIF, *engl.* TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ ) te kaspaza-8. Alternativni put aktivacije inflammasoma djeluje neovisno o izlučivanju kalija te ne uzrokuje piroptozu. Smatra se da je za pojedine vrste stanica specifičan jer je za sada otkriven samo u humanim monocitima. U ovom putu NLRP3 inflammasom aktivira se preko signalne osi koju čine sljedeće molekule: TLR4-TRIF-serin/treonin protein kinaza 1 koja stupa u interakciju s receptorom (RIPK1, *engl.* receptor-interacting serin/threonine-protein kinase 1), protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (FADD, *engl.* Fas-associated death domain) i kaspaza-8 (Lee i Kang, 2019; Swanson i sur., 2019; Xu i sur., 2018; Sharma i Kanneganti, 2016; Man i Kanneganti, 2015; de Zoete i sur., 2014).



Slika 2. Putovi aktivacije NLRP3 inflammasoma

Preuzeto iz: Lee i Kang, 2019.

### 1.5.1. Uloga NLRP3 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, a to su izvanstanični ATP, kristali urata, reaktivni kisikovi spojevi i bakterijske PAMP molekule. Velike udahnute čestice također mogu aktivirati inflamosome. Uzrokom akutnih egzacerbacija može biti i virus influence koji također može aktivirati inflamosome. Kod pacijenata s težim oblicima KOPB-a i kod pušača uočena je povećana aktivnost kaspaze-1 u odnosu na nepušače. Također, koncentracija IL-1 $\beta$  i IL-18 povećana je kod bolesnika s KOPB-om (Barnes, 2016; Brusselle i sur., 2014).

Kompleksi inflamasoma mogu se naći i 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-1 $\beta$  u izvanstaničnom prostoru. Također, makrofagi fagocitiraju komplekse te im oni služe kao DAMP signali koji potiču stvaranje novih inflamasoma (Man i Kanneganti, 2015).

### 1.6. Stanična smrt

Za održavanje homeostaze organizma, vrlo bitan stanični proces je stanična smrt. Ukoliko je ona poremećena, može doći do razvoja različitih bolesti. Stanična smrt je proces koji predstavlja konačni i nepovratni ishod za oštećene stanice ili one koje su izložene smrtonosnim signalima. Postoji nekoliko oblika staničnih smrti, od kojih je apoptoza programirana stanična smrt koja ne dovodi do razvoja upalnog procesa, a nekroza dovodi do otpuštanja unutarstaničnog sadržaja u izvanstanični prostor što potiče aktivaciju upalnih citokina i DAMP molekula te pogoršava upalno stanje. Međutim, apoptoza nije više isključivo sinonim za programiranu staničnu smrt jer su otkriveni drugi oblici iste, poput nekroptoze i piroptoze, koji ovise o različitim mehanizmima i signalnim molekulama (Lee i Kang, 2019; Vanden Berghe i sur., 2014; Duprez i sur., 2009).

#### 1.6.1. Apoptoza

Apoptoza je proces programirane stanične smrti kojim se uklanjaju stare, oštećene ili suvišne stanice organizma pri čemu se imunوسي sustav, a time i upalni odgovor, ne aktiviraju. Tijekom apoptoze dolazi do fragmentacije stanične jezgre, kondenzacije stanice i stvaranja apoptoznih tjelešaca. Proces započinje aktivacijom unutarnjeg, odnosno mitohondrijskog, ili

vanjskog signalnog puta koji je put receptora smrti. Enzimi ključni za odvijanje apoptoze su proteaze zvane kaspaze (Kennedy i sur., 2014).

Unutarnji put ili put apoptoze posredovan mitohondrijima aktiviraju različiti endogeni i egzogeni signali poput oksidacijskog stresa, nedostatak nutrijenata, hipoksija, zračenje, oštećenje DNA, smanjena razina faktora rasta. Ovim signalima potiče se permeabilizacija vanjske membrane mitohondrija i dolazi do otpuštanja citokroma c u citoplazmu koji se veže na Apaf-1. Zatim dolazi do zamjene adenzin-difosfata (ADP) s ATP-om i nastaje apoptosom koji dovodi do aktivacije kaspaze-9. Apoptosom je kompleks koji sadrži citokrom c, Apaf-1, ATP i pet do sedam prokaspaza-9 koje se u njemu aktiviraju te postaju sposobne za aktivaciju izvršnih kaspaza-3, -6 i -7 (Lee i Kang, 2019; Kennedy i sur., 2014).

Vanjski put apoptoze aktiviraju različiti ligandi nakon vezanja na membranske receptore smrti. Receptori smrti pripadaju TNF superporodici receptora, a najbolje izučeni 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 koje proteolitički kidaju i aktiviraju izvršne kaspaze, kaspaze-3 i -7. Izvršne kaspaze uzrokuju kondenzaciju stanice, fragmentaciju jezgre i DNA te smrt stanice (Lee i Kang, 2019; Tummers i Green, 2017; Kennedy i sur., 2014).

Receptor TNFR1, uz još neke receptore smrti, povezuje se s adaptacijskim i signalnim molekulama preko zajedničkih domena te dolazi do stvaranja kompleksa I smještenog uz membranu stanice. Kompleks I aktivira signalne putove koji potiču preživljavanje 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).

Apoptoza je usko reguliran proces, a glavni regulatori su proteini iz Bcl-2 porodice koji se dijele u tri skupine prema Bcl-2 homolognim domenama (BH) koje sadrže, a to su BH1, BH2, BH3 i BH4. Apoptozno djeluju oni koji imaju samo BH3 domenu, a glavni predstavnik među njima je Bid. Važno je napomenuti da su ovi proteini u zdravim stanicama koje ne ulaze u apoptozu u inaktivnom obliku, a njihovu aktivaciju potiču signali smrti. Apoptozno djeluju i proteini koji imaju tri BH domene, čiji su predstavnici Bax i Bak.

Proteini s četiri BH domene djeluju anti-apoptozno, predstavnici ove skupine su Bcl-2, Bcl<sub>xL</sub>, Mcl-1 i Bcl-w. Njihova glavna uloga je čuvati proteine s tri BH domene u inaktivnom obliku na način da se vežu na njih (Chan i Yu, 2004).

Apoptozu također reguliraju i Hsp proteini na način da ju uglavnom inhibiraju, primjerice Hsp70 i mali Hsp-ovi, a Hsp90 i Hsp60 mogu i inhibirati i poticati apoptozu, ovisno o vrsti

stanica u kojima se nalaze i o signalima koji djeluju na stanicu (Kennedy i sur., 2014; Giffard i sur., 2008).

#### 1.6.1.1. Apoptoza i KOPB

Razvoju KOPB-a doprinose poremećaj ravnoteže apoptoze i proliferacije stanica u plućima. U prilog poremećene ravnoteže apoptoze u pacijenata s KOPB-om i onih koji puše govori činjenica da su u takvih pacijenata pronađene endotelne i alveolarne epitelne stanice u apoptozi, aktivirana kaspaza-3, povećana je ekspresija proteina iz Bcl-2 obitelji (Bax i Bad), a smanjena je ekspresija čimbenika rasta koji potiču proliferaciju novih endotelnih stanica što dovodi do razvoja emfizema (Demedts i sur., 2006).

Smanjena je efikasnost alveolarnih makrofaga čija je uloga fagocitirati apoptozna tjelešca zbog čega stanice u apoptozi ulaze u sekundarnu nekrozu i potiču kroničnu upalu. Uz to, dolazi do povećanja broja aktiviranih neutrofila koji nisu sposobni fagocitirati patogene pa umiru nekrozom, izlazi sadržaj njihovih granula što dovodi do egzacerbacija. Povećava se i broj citotoksičnih T-limfocita koji mogu uzrokovati apoptozu alveolarnih epitelnih stanica (Grabiec i Hussell, 2016; Hoenderdos i Condliffe, 2013; Demedts i sur., 2006).

#### 1.6.2. Nekroptoza

Nekroza je nekontrolirani oblik stanične smrti koji se najčešće aktivira uslijed infekcije, upale ili ishemije pri čemu dolazi do vakuolizacije citoplazme, gubitka membranskog integriteta te izlaska organela u izvanstanični prostor što rezultira aktivacijom imunskog odgovora.

Nekroptoza je genski programiran i reguliran oblik nekroze. Dovodi do upalnog staničnog umiranja, a posebice je važna u septičkoj i sterilnoj upali. Dokazano je da u slučajevima kad je inhibirana apoptoza, stanice podliježu nekroptozi što je iznimno važno u virusnim infekcijama jer su brojni virusi, poput herpes virusa, virusa gripe A, poksvirusa, razvili različite mehanizme koji inhibiraju apoptozu. Nekroptozu mogu potaknuti i genotoksični stres, različiti toksini te neki lijekovi koji se koriste u liječenju karcinoma.

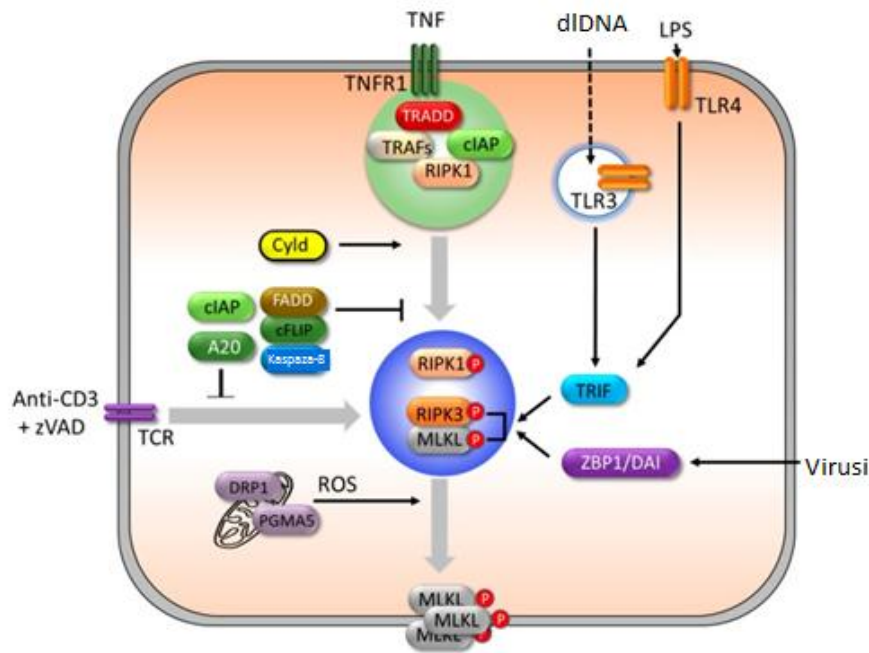
Mehanizam nekroptoze započinje vezanjem TNF- $\alpha$  za TNFR1 i tvorbom TNFR1 kompleksa I na staničnoj membrani. Taj kompleks sadrži stanični protein 1 koji inhibira apoptozu (cIAP-1, *engl.* cellular inhibitor of apoptosis protein 1), RIPK1, čimbenik 2 povezan s receptorom za TNF (TRAF2, *engl.* TNF receptor-associated factor 2) i domenu smrti povezanu s receptorom za TNF (TRADD, *engl.* TNF receptor-associated death domain). cIAP-1 potiče ubikvitinaciju RIPK1, a njegovom degradacijom RIPK1 disocira s kompleksa 1 te na nju djeluje deubikvitinirajući enzim cilindromatoza (CYD, *engl.* cylindromatosis). Interakcijom s

adaptacijskom molekulom FADD i prokaspazom-8, nastaje kompleks 2 koji dovodi do aktivacije kaspaze-8. Uloga kaspaze-8 je da proteolitičkim kidanjem inaktivira RIPK1 i RIPK3 koje stupaju u interakciju s receptorom. Kada je aktivnost kaspaze-8 inhibirana, ne dolazi do kidanja RIPK1 i RIPK3 već do njihove interakcije, fosforilacije, aktivacije i sklapanja proteinskog kompleksa nekrosoma. Fosforilirani RIPK3 dovodi do aktivacije proteina s inaktivnom kinaznom domenom koji je eksprimiran u različitim vrstama (MLKL, *engl.* mixed lineage kinase domain-like protein). Zatim MLKL tvori tetramere i translocira se na staničnu membranu, narušava njezin integritet na način da stvara pore ili stupa u interakciju s ionskim kanalima te tako izvršava nekroptozu.

Uz to, RIPK3 inducira stvaranje ROS-a u mitohondrijima koji stimuliraju kidanje stanične membrane i izlazak staničnih organela, uključujući DAMP molekule, a stvaranje ROS-a potiču i član 5 obitelji fosfoglicerat-mutaze (PGAM5, *engl.* phosphoglycerate mutase family member 5) te protein 1 koji je srodan dinaminu (Drp1, *engl.* dynamin related protein 1). Također, RIPK3, osim RIPK1, mogu aktivirati i drugi proteini koji sadrže domene nazvane RIP motivi homotipske interakcije (RHIM, *engl.* RIP homotypic interaction motif), poput TRIF i proteina 1 koji se veže na Z-DNA, a koji je poznat i kao aktivator regulacijskih faktora IFN-a koji je ovisan o DNA (ZBP1/DAI, *engl.* Z-DNA-binding protein 1/DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors). TRIF stimulira aktivacija TLR3 i TLR4, a ZBP1/DAI prepoznaje viruse. Aktiviranje T-staničnih receptora inhibitorom kaspaze naziva karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[o-metil]-fluorometilketon (zVAD, *engl.* carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone) također potiče RIPK3 ovisnu nekroptozu, dok ju molekula A20 suprimira.

Pokazano je da RIPK i MLKL imaju i druge funkcije osim u aktivaciji nekroptoze, primjerice da mogu inducirati aktivaciju inflamiasoma.

Dokazano je da se nekroptozu javlja u pacijenata oboljelih od KOPB-a. Naime, cigaretni dim povećava ekspresiju RIPK3 i uzrokuje disfunkciju mitohondrija u epitelnim stanicama pluća (Peltzer i Walczak, 2019; Lee i Kang, 2019; Zhu i sur., 2019; Choi i sur., 2019; Xu i sur., 2018; Mizumura i sur., 2016; Zhao i sur., 2015; Mizumura i sur., 2014; Vandenabeele i sur., 2010).



Slika 3. Aktivacija i regulacija nekroptoze

Preuzeto iz: Lee i Kang, 2019.

### 1.6.3. Piroptoza

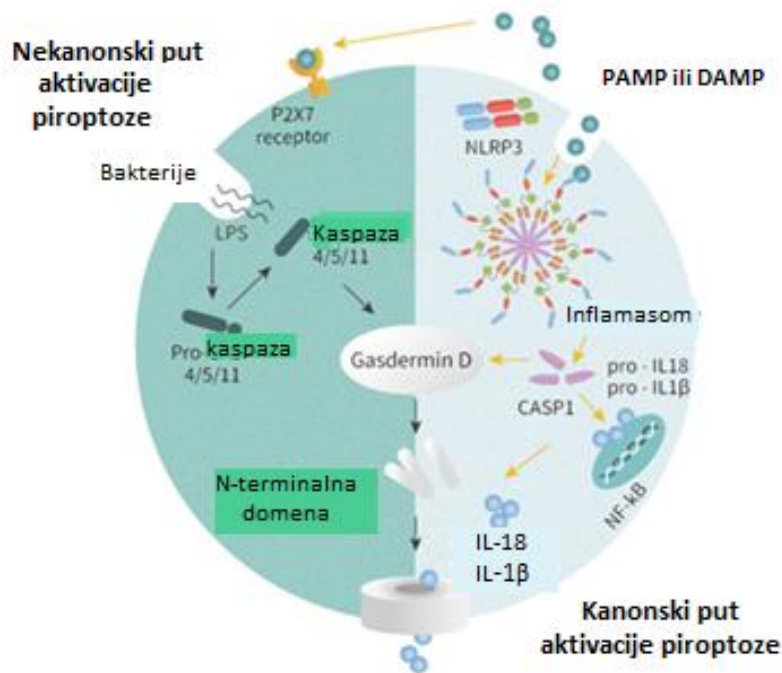
Piroptoza je drugi oblik regulirane nekroze do koje dovodi aktivacija inflammasoma. To je oblik stanične smrti koji, osim što štiti stanicu od raznih patogena, može dovesti do nastanka sepse i septičkog šoka uslijed prekomjerne aktivacije. Piroptoza dijeli neke karakteristike apoptoze i nekroze. Sličnost s apoptozom pokazuje u fragmentaciji DNA te nastajanju mjehurića sličnim apoptoznim tjelešcima, a bubrenje i liza stanice čine ju sličnom nekrozi. Tijekom piroptoze dolazi do ispuštanja unutarstaničnog sadržaja i upalnog odgovora (Aglietti i Dueber, 2017; Liu i Lieberman, 2017; Sharma i Kanneganti, 2016).

Mehanizam piroptoze uključuje stimulaciju NLR-a odgovarajućim ligandom što dovodi do autooligomerizacije središnje oligomerizacijske domene NLR-a, a preko adaptacijske molekule aktivira se kaspaza-1. Aktivna kaspaza-1 u kanonskom putu je središnji izvršitelj piroptoze, a u nekanonskom putu to je kaspaza-4. Glavni supstrat aktiviranih kaspaza je protein GSDMD koji se njihovim djelovanjem pokida na N-terminalni i C-terminalni fragment. N-terminalni fragment GSDMD-a (GSDMD-NT) ključni je medijator piroptoze koji potiče izlučivanje upalnih citokina nastalih aktivacijom inflammasoma. Nakon oligomerizacije, GSDMD-NT se veže na lipide unutarnje ovojnice stanične membrane gdje stvara pore veličine 10-16 nm. Te pore dovoljno su velike za prolaz citokina. Smatra se da C-terminalni fragment gasdermina veže i inaktivira N-terminalni fragment u citoplazmi, sve dok

se on ne veže na lipide stanične membrane. Kaspaza-1 može djelovati i na drugi način, a to je kidanje upalnih citokina pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18 čiji se zreli oblici otpuštaju iz stanice i potiču upalni odgovor, što je već spomenuto (Xia i sur, 2020; Liu i Lieberman, 2017; Vande Walle i Lamkanfi, 2016; Bergsbaken i sur., 2009; Duprez i sur., 2009).

Tijekom piroptoze iz stanica izlaze stanični proteini i citokini, kaspaza-1 i GSDMD-NT koji se ne veže na lipide vanjske ovojnice stanične membrane pa se piroptozna stanica ne širi na okolne stanice. GSDMD-NT ima dodatnu ulogu, a to je ubijanje bakterija, no točan mehanizam antibakterijskog djelovanja nije poznat (Liu i Lieberman, 2017).

Piroptozna stanica se povezuje s patogenezom KOPB-a. Uslijed deficijencije kaspaze-1 može doći do nastanka zaštitnog mehanizma protiv upale i stanične smrti, a povećana koncentracija kaspaze-1 dovodi do induciranja piroptoze i produžavanja kronične upale (Vande Walle i Lamkanfi, 2016; Bergsbaken i sur., 2009; Duprez i sur., 2009).



Slika 4. Aktivacija piroptoze

Preuzeto iz:

[https://www.genetex.com/Research/Overview/cell\\_biology/Pyroptosis\\_Inflammation](https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/Pyroptosis_Inflammation)

(pristupljeno: 29. 6. 2020.)

## 1.7. Kaspaze

Kaspaze su enzimi uključeni u proces regulacije i izvršavanja stanične smrti. To su cisteinske proteaze kojih u ljudi ima 12 poznatih vrsta pri čemu je njih 7 uključeno u apoptozu, a 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. Sadrže dvije karakteristične domene, a to su N-terminalna domena kojom se uzvodne kaspaze vežu na molekulske komplekse koji ih aktiviraju te katalitička domena 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).

### 1.7.1. Kaspaza-1

Kaspaza-1 je upalna kaspaza koja se aktivira u inflamasi. Glavna uloga kaspaze-1, koja je ujedno i prva otkrivena, je kidanje i aktivacija upalnih citokina pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18. Ovi citokini izlučuju se nakon smrti i lize stanica uzrokovane piroptozom. Kaspaza-1 uzrokuje i piroptozu kidanjem supstrata GSDMD-a (Liu i Liebermann, 2017). Također, omogućuje izlučivanje IL-1 $\alpha$  (Sollberger i sur., 2014).

Supstrati kaspaze-1 su i enzimi glikolize, čija razgradnja kod makrofaga dovodi do smrti stanice. Kaspaza-1 može uzrokovati smrt imunskih stanica, ali se može aktivirati i 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).

Kaspaza-1 može biti izlučena iz makrofaga u izvanstanični prostor. Pretpostavlja se da ondje može uzrokovati pojačanje upalne kaskade tijekom infekcije (Sun i Scott, 2016).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je heterogena, složena i učestala plućna bolest karakterizirana opstrukcijom dišnih putova i upalom. Patogeneza KOPB-a je složena, a povezana je s dugotrajnom izloženošću štetnim česticama, posebice cigaretnom dimu te uključuje kroničnu upalu, infiltraciju upalnih stanica u plućima, oštećenje tkiva te sistemske učinke. Bolest može biti opasna po život zbog čestih egzacerbacija i kormobiditeta.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati potiču li ekstrakt cigaretnog dima (CSE), eHsp70 te njihove kombinacije aktivaciju NLRP3 inflammasoma te izazivaju li piroptozu i nekroptozu pridonoseći tako širenju upale.

U ovom radu određivala se ekspresija mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , unutarstanična ekspresija GSDMD proteina, aktivacija RIPK3 i MLKL-a, koncentracija IL-1 $\beta$  te aktivnost LDH. Ispitivanja su provedena na predloženim plućnim i sisetmskim *in vitro* modelima KOPB-a, a to su stanična linija epitelnih stanica traheobronhijalnog trakta (NCI-H292), primarne humane traheobronhijalne epitelne stanice (NHBE), stanična linija monocitnih stanica diferenciranih u makrofage (THP-1) i primarni humani monociti iz periferne krvi diferencirani u makrofage (MDM, *engl.* monocyte-derived macrophages).

### 3. MATERIJALI I METODE

Provedeno *in vitro* istraživanje podijeljeno je na dva dijela:

1. istraživanje plućne komponente KOPB-a u kojem su korištene:

- stanična linija epitelnih stanica traheobronhijalnog trakta (NCI-H292 - humane bronhijalne epitelne stanice porijeklom od bolesnika s mukoepidermalnim karcinomom);
- primarne humane traheobronhijalne epitelne stanice (NHBE - normalne humane bronhijalne epitelne stanice);

2. istraživanje sistemske komponente KOPB-a u kojem su korištene:

- stanična linija monocitnih stanica diferenciranih u makrofage (THP-1 - humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom);
- primarni humani monociti iz periferne krvi diferencirani u makrofage (MDM).

#### 3.1. Kultura stanica

##### 3.1.1. Stanične linije

NCI-H292 (American Type Culture Collection, SAD) su stanice mukoepidermalnog plućnog karcinoma originalno izolirane iz metastaze u limfnom čvoru 32-godišnje bolesnice. Stanice su epitelnog tipa te adheriraju na podlogu. Konstitutivno, odnosno neovisno o uvjetima u kojima se nalaze, ekspimiraju mRNA za TLR1-10 (Hou i sur., 2006).

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

Stanice su uzgajane u bocama za uzgoj staničnih kultura (25 cm<sup>2</sup> ili 75 cm<sup>2</sup>) s odgovarajućim volumenom kompletnog RPMI medija u inkubatoru (Hera Cell, Kendro Laboratory Products, Njemačka) na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Kompletni RPMI medij sadrži RPMI-1640 s L-glutaminom i HEPES-om (Lonza Group Ltd, Švicarska ili Capricorn, UK) uz dodatak 0,6 mM piruvata (Fluka, Švicarska), 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS, *engl.* fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, USA ili Capricorn, UK) i 1 % 100 puta koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 25 µg/mL amfotericina B) (Lonza Group Ltd, Švicarska). NCI-H292 stanice kultivirane su do oko 80–90 % konfluentnosti što je kontrolirano invertnim mikroskopom

(Diavert, Leitz, Njemačka) te nakon toga presađene. THP-1 stanice koje rastu u suspenziji razrjeđuju se 1-2 puta tjedno.

THP-1 stanice su u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirane u makrofage tijekom 48 sati pomoću 20 nM forbol 12-miristat-13-acetata (PMA).

### 3.1.2. Primarne stanice

Normalne humane bronhijalne epitelne stanice (NHBE) izolirane su iz epitela dišnih putova iznad bifurkacije traheje zdravih ispitanika (Lonza Group Ltd., Švicarska). Ove primarne humane bronhijalne epitelne stanice uzgajaju se u BEGM mediju (Lonza Group Ltd., Švicarska), u bocama za uzgoj staničnih kultura prethodno obloženima 0,1 % fibronektinom (Sigma-Aldrich, SAD) i 3 mg/mL kolagenom (Inamed, SAD) te se odmah nakon postignute konfluentnosti od oko 90 % nasaduju na odgovarajuće ploče s 24 ili 96 jažica koje su također obložene na isti način kao i boce za uzgoj staničnih kultura.

Monociti su izolirani od zdravih ispitanika metodom razdvajanja magnetskim česticama obilježenim s CD14 (Miltenyi Biotec, Njemačka). Monociti porijeklom iz periferne krvi su u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirani u makrofage tijekom 7 dana pomoću 25 ng/mL čimbenika koji stimulira rast makrofagnih kolonija (M-CSF, *engl.* macrophage colony stimulating factor) u kompletnom RPMI mediju uz dodatak 1 % neesencijalnih aminokiselina (Lonza Group Ltd., Švicarska) i 1 % piruvata (Lonza Group Ltd., Švicarska) tijekom 7 dana.

### 3.2. Presađivanje stanica

NCI-H292 stanice presađuju se kad postignu oko 80-90 % konfluentnosti. Kompletni RPMI medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum sisaljkom. Stanice se isperu 2 puta s 1 ili 5 mL 0,38 mg/mL otopine EDTA (Sigma-AldrichCo., USA), ovisno o veličini boce za uzgoj stanica, kako bi se uklonili ostaci seruma koji sadrži  $\alpha$ 1-antitripsin koji bi mogao inhibirati djelovanje tripsina u sljedećem koraku. Otopina EDTA se ukloni vakuum sisaljkom i doda se 1 ili 3 mL 0,25 % otopine tripsin-EDTA (Sigma-AldrichCo., USA) kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>, na stanice se doda 3 ili 5 mL kompletnog RPMI medija koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija prenese se u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica

resuspendira u 1 mL kompletnog RPMI medija. Najprije se odredi broj stanica u suspenziji, a zatim se određeni volumen suspenzije stanica nasadi u novu bocu za uzgoj staničnih kultura u koju je prethodno stavljen određeni volumen kompletnog RPMI medija. Stanice se najčešće razrjeđuju u omjeru 1:3-1:8. Boca se nakon presađivanja spremi u inkubator na 37 °C, pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>.

THP-1 stanice razrjeđuju se s kompletnim RPMI medijem na gustoću 0,2-0,4x10<sup>6</sup> stanica/mL na način da se uzme 1-2 mL stanica i 4-5 mL novog medija za uzgoj u boci od 25 cm<sup>2</sup>, odnosno da se uzme 3-5 mL stanica i 10-12 mL novog medija za uzgoj u boci od 75 cm<sup>2</sup>. Brojanje stanica vrši se otprilike svakih 10 dana, tako da se stanice centrifugiraju (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi, medij se ukloni vakuom sisaljkom te se stanice resuspendiraju u 1 mL medija za uzgoj stanica. Nakon toga se stanice izbroje u Neubauerovoj komorici s tripanskim plavilom nakon čega im se u potpunosti promijeni medij, a volumen dodanog medija ovisi o željenoj gustoći stanica.

### 3.3. Određivanje broja stanica

Stanice resuspendirane u 1 mL medija za uzgoj stanica pomiješaju se s 0,4 % otopinom tripanskog plavila u omjeru koji ovisi o vrsti stanica te se nakon inkubacije tijekom 2 minute 10 µL otopine prenese u Neubauerovu komoricu i stanice se broje pod invertnim mikroskopom pri povećanju od 400 puta. Tripansko plavilo se koristi za razlikovanje mrtvih i živih stanica. Žive stanice ga izlučuju pomoću membranskih pumpi, tako da žive stanice ostaju nebojene. Mrtve stanice ne mogu izbaciti tripansko plavilo pa se zato unutar njih akumulira te ih vidimo kao obojene, plave stanice. Neubauerova komorica se sastoji od 9 kvadrata volumena 0,0001 mL koji su podijeljeni na manje kvadrate. Stanice se broje u četiri rubna kvadrata te se broj stanica izračunava po sljedećoj formuli:

broj stanica po mL = srednja vrijednost broja stanica u 4 rubna kvadrata x razrjeđenje / 0,0001

### 3.4. Tretiranje stanica

#### 3.4.1. Tretiranje stanica rekombinantnim humanim Hsp70 proteinom

Stanice su tretirane s 0,3, 1 ili 3 µg/mL rekombinantnog humanog Hsp70 proteina (rhHsp70) koji je sintetiziran u bakteriji *E. coli* s niskim sadržajem endotoksina, prema odredbama proizvođača (Enzo Life Sciences, SAD). U ovim uvjetima NCI-H292 i THP-1 stanice tretirane su u kompletnom RPMI mediju, a THP-1 stanice su prethodno diferencirane u

stanice slične makrofagima s 20 nM PMA tijekom 48 h. NHBE stanice od zdravih ispitanika držane su u TIPSA mediju (BEGM medij (Lonza Group Ltd., Švicarska) s 10 µg/mL transferina i 5 µg/mL inzulina (Sigma-Aldrich, SAD) te 1 % otopine antibiotika-antimikotika) preko noći te su tretirane u istom tom mediju. Monociti su stavljeni u medij bez M-CSF-a preko noći te su tretirani u RPMI mediju bez FBS-a.

#### 3.4.2. Tretiranje stanica ekstraktom cigaretnog dima

Ekstrakt cigaretnog dima (CSE, *engl.* cigarette smoke extract) pripreman je neposredno prije svakog pokusa. Dim dvije cigarete marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) kojima su odstranjeni filtri propuhan je kroz 25 mL odgovarajućeg medija bez seruma (RPMI za NCI-H292 i THP-1 stanice te monocite) upotrebom peristaltičke pumpe (Miniplus Evolution, Gilson, SAD). Svaka cigareta gorjela je oko 5 minuta. Tako pripremljeni ekstrakt cigaretnog dima označen je kao 100 % koncentrirani, a za pokuse je razrijeđen s odgovarajućim medijem bez seruma (RPMI za NCI-H292, THP-1 i monocite, TIPSA za NHBE) na željene koncentracije unutar 60 minuta od pripreme (van der Toorn i sur., 2007).

Standardizacija ekstrakta cigaretnog dima izvršena je tako da je 100 % ekstrakt razrijeđen na koncentracije od 15 %, 5 % i 2,5 %. Zatim mu je, koristeći spektrofotometar (CECIL Aquarius CE 7200), izmjerena apsorbanca na 320 nm prema odgovarajućem mediju bez seruma kao slijepoj probi. Pokus je ponovljen šest puta u tri uzastopna dana. Tijekom pripreme ekstrakta cigaretnog dima za svaki pojedini pokus provjereno je odgovara li njegova apsorbanca na 320 nm uobičajenim standardiziranim vrijednostima. Zatim je taj ekstrakt korišten za tretiranje stanica sam ili u kombinaciji s rhHsp70.

#### 3.5. Određivanje koncentracije citokina IL-1β

NCI-H292 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasađene su na ploče s 12 jažica i tretirane nakon inkubacije tijekom 24 h. THP-1 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasađene su na ploče s 12 jažica uz dodatak 20 nM PMA te su diferencirane tijekom 48 h, nakon čega je slijedilo tretiranje. NHBE (30-50000 stanica po jažici) stanice nasađene su na ploče s 24 jažice prethodno obložene kolagenom i fibronektinom. Nakon postizanja više od 95 % konfluentnosti stanicama je promijenjen medij u TIPSA medij preko noći te su zatim tretirane također u TIPSA mediju. Monociti ( $0,5 \times 10^6$  stanica po jažici) nasađeni su na ploče s 24 jažice uz dodatak 25 ng/mL M-CSF-a te su diferencirani tijekom 7 dana. Nakon toga stavljeni su u medij bez M-CSF-a preko noći i zatim tretirani. Stanice su tretirane različitim

koncentracijama rhHsp70, CSE-a i njihovim kombinacijama tijekom 24 h. Nakon toga medij iznad stanica centrifugira se na 1500 g tijekom 10 minuta pri +4 °C, a dobiveni nadsloj razdijeli se na manje volumene i pospremi na -70 °C do analize.

Koncentracije IL-1 $\beta$  određivane su u mediju iznad stanica DuoSet ELISA test paketima (R&D Systems, SAD). Mikrotitarska ploča s 96 jažica najprije se obloži sa 100  $\mu$ L razrijeđenog vezujućeg protutijela preko noći na sobnoj temperaturi. Zatim se okretanjem ploče i njenim snažnim protresivanjem ukloni sva tekućina koja se nalazi u jažicama, a potom se jažice isperu s puferom za ispiranje (0,05 % Tween-20 u PBS-u). Potrebno je tri puta ispirati mikrotitarsku ploču, tako da se u svaku jažicu doda 400  $\mu$ L pufera. Zatim se u svaku jažicu doda 300  $\mu$ L otopine reagensa za blokiranje (1 % BSA u PBS-u) te se ploča inkubira na sobnoj temperaturi minimalno jedan sat. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča ispere se tri puta.

Uzorci i standardi razrijede se u otopini reagensa za razrjeđivanje (1 % BSA u PBS-u) te se 100  $\mu$ L dodaje u svaku jažicu i inkubira dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu dodaje 100  $\mu$ L detekcijskog protutijela koje se prije toga razrijedi u otopini reagensa za razrjeđivanje te se inkubira dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Zatim se u svaku jažicu dodaje 100  $\mu$ L radne otopine streptavidin-HRP (streptavidin-HRP razrijeđen 1:40 u reagensu za razrjeđivanje) i inkubira 20 minuta na sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu doda 100  $\mu$ L otopine supstrata (1:1 mješavina tetrametilbenzidina i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), inkubira 5-10 minuta pri sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti te se u svaku jažicu doda 50  $\mu$ L otopine za zaustavljanje enzimske reakcije (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i lagano se protrese mikrotitarska ploča kako bi se svi sastojci otopine supstrata u jažici dobro pomiješali. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 450 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer).

### 3.6. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat-dehidrogenaze u mediju iznad stanica

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

Princip ove metode temelji se na oksidaciji L-laktata u piruvat u prisustvu LDH pri čemu se  $\text{NAD}^+$  reducira te se kontinuirano mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm pri 37 °C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Za ovu analizu uzima se 20  $\mu\text{L}$  medija iznad tretiranih stanica te se analiza vrši odmah nakon završene inkubacije od 2 minute na poluautomatskom analizatoru Trace 30 uz upotrebu reagensa za određivanje LDH (500  $\mu\text{L}$ ) (Dijagnostika d.o.o., Hrvatska ili Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka). Srednja vrijednost katalitičkih aktivnosti LDH netretiranih (kontrolnih) stanica proglašena se 100 %, a vrijednosti katalitičkih aktivnosti LDH tretiranih stanica izraze se kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.7. Detekcija proteina Western blot metodom

#### 3.7.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize

NCI-H292 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadene su na ploče s 12 jažica i tretirane nakon inkubacije tijekom 24 h. THP-1 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) su nasadene na ploče s 12 jažica uz dodatak 20 nM PMA te su diferencirane tijekom 48 h nakon čega je slijedilo tretiranje. NHBE (30-50000 stanica po jažici) stanice nasadene su na ploče s 24 jažice prethodno obložene kolagenom i fibronektinom. Nakon postizanja više od 95 % konfluentnosti stanicama je promijenjen medij u TIPSA medij preko noći te su zatim tretirane također u TIPSA mediju. Monociti ( $0,5 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadjeni su na ploče s 24 jažice uz dodatak 25 ng/mL M-CSF-a te su diferencirani tijekom 7 dana. Nakon toga stavljeni su u medij bez M-CSF-a preko noći i zatim tretirani. Stanice su tretirane različitim koncentracijama rhHsp70, CSE-a ili njihovim kombinacijama. Nakon toga ploče se stave na led, medij iznad stanica ukloni se vakuum sisaljkom, a adherirane stanice isperu dva puta ledeno hladnim PBS-om. U svaku jažicu na ploči s 12 jažica doda se po 200  $\mu\text{L}$ , a na ploči s 24 jažice 100  $\mu\text{L}$ , ledeno hladnog pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 1 mM natrij-ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)) i ostavi stajati na ledu 20 minuta. Zatim se stanice odvoje od podloge blagim struganjem silikonskim strugačem, a sadržaj svake jažice prenese se u epruveticu od 1,5 mL i centrifugira na 15000 g tijekom 20 minuta na +4 °C. Jedan dio dobivenog nadsloja pospremi se na -20 °C za određivanje koncentracije proteina, dok se u drugi dio nadsloja doda 6 puta koncentrirani Laemmlijev pufer za nanošenje uzoraka (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 12 % SDS, 30 % glicerol, 0,2 %

bromfenol plavilo, 12 %  $\beta$ -merkaptoetanol u destiliranoj vodi). Uzorci se prokuhaju tijekom 3 minute na 97 °C, odmah potom ohlade na ledu i pospreme na -20 °C.

### 3.7.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu

Koncentracija proteina u staničnim lizatima određena je pomoću bicinkonične kiseline (BCA). Ova metoda temelji se na stvaranju kompleksa proteina s  $\text{Cu}^{2+}$  pod alkalnim uvjetima nakon čega dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$ . Količina redukcije proporcionalna je koncentraciji proteina. BCA stvara plavo-ljubičasti kompleks s  $\text{Cu}^+$  u alkalnom okolišu čija se apsorbancija mjeri na 570 nm.

Na ploču s 96 jažica dodaje se 25  $\mu\text{L}$  uzorka i standarda proteina razrijeđenih s fiziološkom otopinom te 100  $\mu\text{L}$  radnog reagensa (dobiva se miješanjem 50 volumena BCA i 1 volumena bakar (II) sulfata). Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C izmjeri se apsorbancija na 570 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

### 3.7.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Proteini iz staničnih lizata, pripremljenih uz upotrebu pufera za liziranje stanica, razdvoje se okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, *engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Za elektroforezu proteina korišten je 4 % sabijajući gel te 10 % razdvajajući gel. Sastav 4 % sabijajućeg gela je 6,1 mL ultračiste  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mL pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 100  $\mu\text{L}$  10 % otopine SDS-a, 1,3 mL 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50  $\mu\text{L}$  10 % otopine amonij-persulfata i 10  $\mu\text{L}$  tetrametil-etilendiamina (TEMED). Za 10 % razdvajajući gel korišteno je 4,35 mL ultračiste  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100  $\mu\text{L}$  10 % otopine SDS-a, 3,0 mL 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50  $\mu\text{L}$  10 % otopine amonij-persulfata i 5  $\mu\text{L}$  TEMED-a.

Uzorci se nanese na gel u volumenu koji odgovara koncentraciji proteina od 20 ili 40  $\mu\text{g}$ . Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1 % otopina SDS-a) uz napon od 100 V tijekom 1,5 h. Kao standard za približno određivanje molekulske mase proteina korišten je standard proteina koji je na gelu davao osam obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 6 do 200 kDa (Santa Cruz Biotechnology, SAD).



#### 3.7.4. Western blot analiza

Proteini razdvojeni SDS-PAG elektroforezom prenesu se na nitroceluloznu membranu. Zatim se membrana zasiti puferom za blokiranje da bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu u daljnjim koracima analize. Nakon toga membrana se inkubira primarnim protutijelom koje specifično prepoznaje ciljani protein. Na primarna protutijela vežu se sekundarna protutijela koja prepoznaju epitop na primarnom protutijelu, a na sebi imaju vezan enzim peroksidazu iz hrena. Taj enzim u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata emitira svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela na membrani te se izlaganjem svjetlu na uređaju za fotografiranje membrana ta mjesta vide kao zatamnjene vrpce.

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

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje (5 % obrano mlijeko u prahu u puferu za ispiranje (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana je zatim inkubirana razrijeđenim primarnim protutijelom preko noći na +4 °C.

Korištena primarna protutijela:

- za detekciju ukupnog proteina MLKL korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram C-terminalnog ostatka ljudskog MLKL-a (MLKL (D2I6N) Rabbit mAb, #14993; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % govedeg serumskog albumina (BSA));
- za detekciju fosforiliranog MLKL-a korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudskog MLKL-a (Ser358), a mogu se vezati i na dvojno-fosforilirano područje aktivnog oblika MLKL-a (Thr357 i Ser358) (Phospho-MLKL (Ser358) (D6H3V) Rabbit mAb, #91689; Cell

Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);

- za detekciju ukupnog proteina RIPK3 korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram ostataka u blizini C-terminalnog kraja ljudskog RIPK3 (RIP3 (E1Z1D) Rabbit mAb, #13526; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju fosforiliranog RIPK3 korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudskog RIPK3 (Ser227) (Phospho-RIP3 (Ser227) (D6W2T) Rabbit mAb, #93654; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju gasdermina D korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram N-terminalnog ostatka ljudskog gasdermina D (Gasdermin D Antibody, #96458; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju aktina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram N-terminalnog ostatka ljudskog  $\beta$ -aktina ( $\beta$ -Actin (8H10D10) Mouse mAb: #3700; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu).

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te se inkubira sa sekundarnim protutijelom tijekom 1 h na sobnoj temperaturi.

Korištena sekundarna protutijela:

- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi ekspresije MLKL-a, pMLKL-a, RIPK3, pRIPK3) korištena su IgG protutijela iz seruma koze imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5% obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi ekspresije aktina) korištena su IgG protutijela iz seruma konja imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5% obranog mlijeka u prahu).

Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te se vizualizacija proteina postiže inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju pripravljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 mL ultračiste H<sub>2</sub>O, 5 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 µL pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 mL DMSO-a). Membrana se zatim fotografira u Amersham AI600 Imager-u (GE Healthcare, SAD).

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

#### 3.8.1. Izolacija RNA iz stanica

Stanice su tretirane na isti način kao i za određivanje LDH te je nakon uklanjanja medija iznad stanica (koristi se za određivanje LDH) na stanice adherirane na ploču dodan TriReagent (Applied Biosystems, SAD) u volumenu ovisnom o površini jažica na ploči. Na ploču s 12 jažica dodaje se 400 µL, a na ploču s 24 jažice 250 µL TriReagenta po jažici. Nakon 5 minuta sadržaj jažice premješten je u epruveticu od 1,5 mL te je zamrznut na -20 °C do nastavka izolacije.

U sljedećem koraku izolacije RNA dodaje se 200 µL kloroforma na svakih 1 mL TriReagenta. Epruvetice se snažno protresu 15 sekundi te puste da stoje na sobnoj temperaturi 10 minuta i zatim centrifugiraju 15 minuta na 12000 g i +4 °C. Nakon toga vodena faza premjesti se u čistu epruveticu od 1,5 mL te se dodaje 0,5 mL izopropanola po 1 mL TriReagenta, epruvetice se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta i centrifugira 10 minuta na 12000 g i +4 °C. Nadsloj se zatim odlije, a na talog RNA dodaje se 1 mL 75 % etanola po 1 mL TriReagenta te se uzorak vorteksira. Zatim se ponovno centrifugira 5 minuta na 7500 g i na +4 °C. Etanol se odlije, a talog RNA prosuši na zraku oko 10 minuta. RNA se zatim otopi u vodi bez RNaze te joj se odredi koncentracija mjerenjem apsorbancije na 260 nm (Nanodrop 8000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

#### 3.8.2. Sinteza cDNA

cDNA sintetizirana je iz RNA pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis test paketa (Thermo Fisher Scientific, SAD). RNA se razrijedi vodom bez RNaza tako da u reakcijskoj smjesi bude 1000 ng RNA. Za svaku reakciju dodaje se 1 µL početnica oligo dT, 1 µL početnica od nasumičnih heksanukleotida, 1 µL inhibitora RNaza, 4 µL reakcijskog pufera, 2

μL 10 mM smjese deoksinukleotid-trifosfata (dNTP) i 1 μL RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze te se zatim reakcijska smjesa dobro vorteksira. Reakcijski uvjeti su inkubacija tijekom 5 minuta na 25 °C, zatim 60 minuta na 42 °C, a reakcija se prekida zagrijavanjem na 70 °C tijekom 5 minuta. Reakcija se provodi u uređaju za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD).

### 3.8.3. Određivanje ekspresije gena

Nakon prevođenja RNA u cDNA ona se koristi kao uzorak u qPCR metodi uz primjenu sonde TaqMan. TaqMan sonda je oligonukleotid koji je na svojem 5'-kraju obilježen fluorescentnom bojom, reporterom (FAM), a na 3'-kraju prigušivačem (*engl.* quencher). Količina PCR produkta mjeri se na principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, *engl.* fluorescence energy resonance transfer) i 5'-egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze. TaqMan sonde i početnice vežu se za cDNA, a prije produljenja početnice zbog blizine fluorescentne boje i prigušivača nema fluorescencije. Kako se početnice produljuju, tako istovremeno DNA polimeraza razgrađuje TaqMan sondu zbog svoje 5'-egzonukleazne aktivnosti, a fluorescentna boja tada može fluorescirati jer se prigušivač više ne nalazi u blizini. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini nastalog PCR produkta.

qPCR napravljen je na uređaju 7500 Real Time PCR System, uz korištenje TaqMan Universal MasterMix-a te TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, SAD):

- Hs01555410\_m1 za IL-1β
- Hs00918082\_m1 za NLRP3
- Hs99999907\_m1 za β<sub>2</sub>-mikroglobulin (B2M)
- Hs99999904\_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (PPIA)

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

Određivana je ekspresija gena za *IL-1β* i *NLRP3*, a *B2M* i *PPIA* služe kao referentni geni, odnosno geni čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem različitih čimbenika te se ekspresija ostalih određivanih gena izražava prema njihovoj ekspresiji.

Relativna ekspresija gena čiju ekspresiju želimo odrediti (CILJ) računa se u odnosu na referentni gen (REF), te u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (NT) prema sljedećim

formulama, gdje Ct označava ciklus umnažanja u kojem je postignut prag detekcije signala za pojedini uzorak.

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

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

### 3.9. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SEM). Statističke analize korištene za testiranje razlike između skupina podataka su t-test ili jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, *engl.* One-way analysis of variance). *Post-hoc* analize provedene su Sidakovom metodom.  $P < 0,05$  smatra se statistički značajnom vrijednošću. Podaci su analizirani upotrebom programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

Nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292, THP-1, NHBE i MDM stanica s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5, 5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama, aktivacija NLRP3 inflamasoma i upalni odgovor ispitani su određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$  qPCR-om te određivanjem koncentracije izlučenog proteina IL-1 $\beta$ . Vijabilnost stanica ispitana je određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja ispitano je određivanjem aktivacije i ekspresije RIPK3 i MLKL-a (nekroptoza) te ekspresije proteina GSDMD-a (piroptoza) Western blot analizom, kao i već spomenutim određivanjem koncentracije IL-1 $\beta$  (piroptoza). Važno je napomenuti da su ekspresija GSDMD-a, biljega piroptoze, te aktivacija RIPK3 i MLKL, biljega nekroptoze, ispitani Western blot analizom nakon tretiranja stanica tijekom 2 i 8 h.

NCI-H292 stanice tretirane su s rhHsp70 u svim navedenim koncentracijama, 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama, a NHBE stanice tretirane su s rhHsp70 u koncentracijama 0,3 i 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama.

THP-1 stanice tretirane su s rhHsp70 u svim navedenim koncentracijama, 2,5 i 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama, dok su MDM stanice tretirane s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama.

#### 4.1.1. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ u NCI-H292 i NHBE stanicama

Rezultati mjerenja ekspresije gena za NLRP3 u NCI-H292 stanicama (slika 5.) nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70 pokazali su statistički značajnu promjenu u odnosu na netretirane stanice u smislu povećanja ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ . Statistički značajna promjena u odnosu na netretirane stanice uočena je i nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 stanica s 2,5 i 15 %-tnim CSE-om također u smislu povećanja ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u ovim stanicama. Nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 stanica svim primijenjenim kombinacijama rhHsp70 i CSE-a uočena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice, dakle i u ovim slučajevima povećala se ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u usporedbi s netretiranim stanicama. Sva kombinirana tretiranja NCI-H292 stanica uzrokovala su statistički značajnu razliku u odnosu na tretiranja samo sa CSE-om, odnosno dovela su do smanjene ekspresije gena za NLRP3. Statistički značajna razlika u odnosu na stanice tretirane samo s 2,5 %-tnim CSE-om uočena je kod kombiniranog 24-satnog tretiranja koje uključuje 2,5 %-tni CSE i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, odnosno u tim NCI-H292

stanicama došlo je do smanjene ekspresije gena za IL-1 $\beta$ . Za sva kombinirana tretiranja koja uključuju 15 %-tni CSE i sve primijenjene koncentracije rhHsp70 uočena je statistički značajna razlika u odnosu na tretiranje samo s 15 %-tnim CSE-om, to jest, kombinirana tretiranja uzrokovala su smanjenje razine ekspresije za IL-1 $\beta$  u NCI-H292 stanicama.

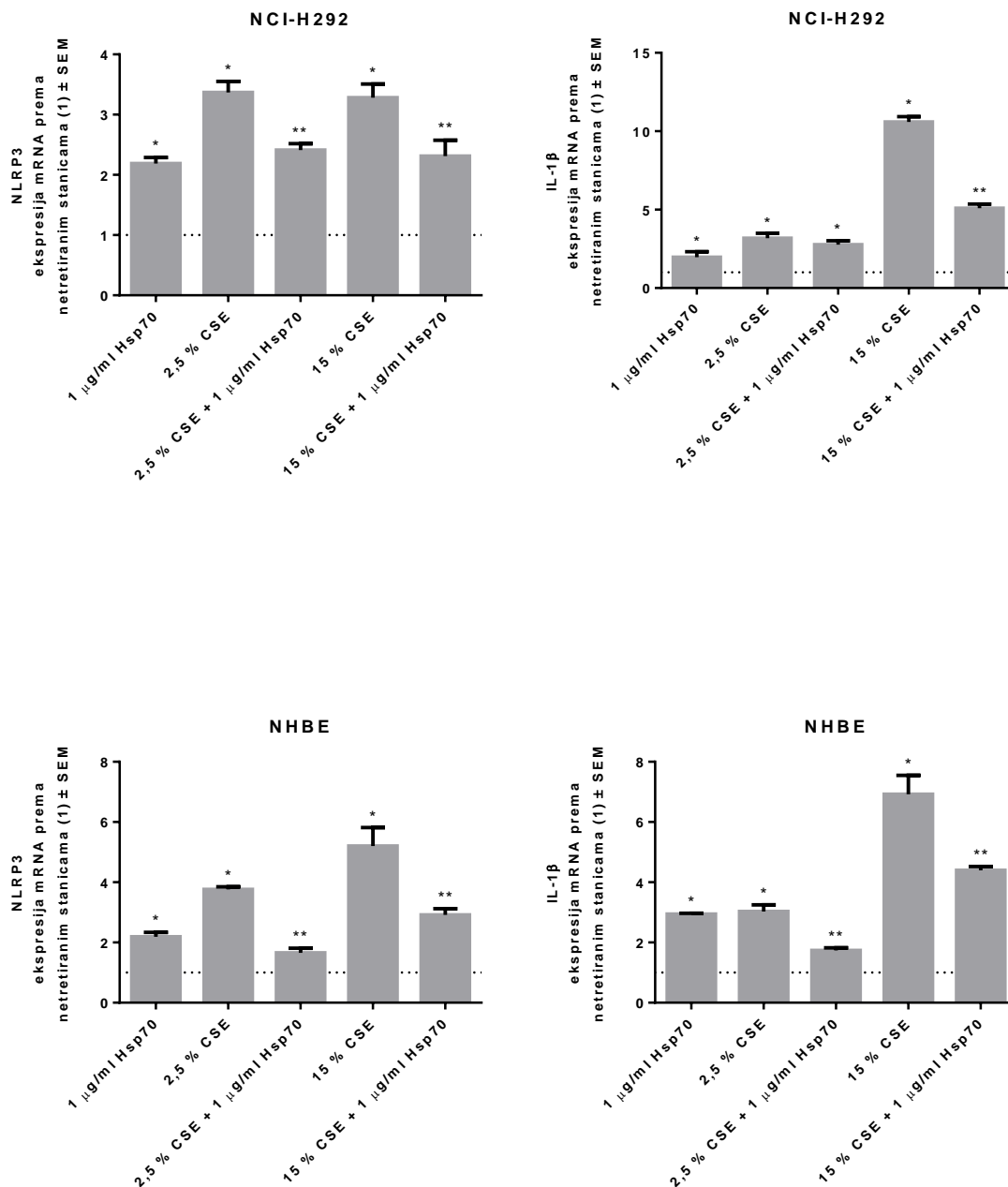
Što se tiče NHBE stanica, rhHsp70 u primijenjenim koncentracijama od 0,3 i 1  $\mu$ g/mL nakon 24-satnog tretiranja doveo je do statistički značajnih promjena u odnosu na netretirane stanice, tj. uzrokovao je povećanje ekspresije gena i za NLRP3 i za IL-1 $\beta$ , a isto je uočeno i nakon 24-satnog tretiranja s 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te za sve primijenjene kombinacije rhHsp70 i CSE-a, također u usporedbi s netretiranim stanicama (slika 5.). Kombinirana tretiranja koja uključuju rhHsp70 i CSE dovela su do statistički značajne razlike u odnosu na tretiranja samo sa CSE-om, odnosno u tim slučajevima uočena je niža razina ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u NHBE stanicama.

#### 4.1.2. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ u THP-1 i MDM stanicama

U THP-1 stanicama uočena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nakon 24-satnog tretiranja s rhHsp70 u svim primijenjenim koncentracijama, a to su 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/mL, kao i nakon tretiranja 2,5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama. U svim navedenim slučajevima povećala se ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u usporedbi sa stanicama koje nisu tretirane (slika 6.). Tretiranje THP-1 stanica 5 %-tnim CSE-om nakon 24 sata nije dovelo do statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, a isto je uočeno i za kombinacije 5 %-tnog CSE-a i rhHsp70 u svim primijenjenim koncentracijama što znači da u tim slučajevima nije došlo do povećanja ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ . Statistički značajne razlike nisu uočene ni za kombinirana tretiranja rhHsp70 i CSE-a u odnosu na tretiranja samo sa CSE-om.

Nakon 24-satnog tretiranja MDM stanica s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3  $\mu$ g/mL, 2,5 i 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama, uočena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice, odnosno povećala se ekspresija mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$  (slika 6.). Sva kombinirana tretiranja MDM stanica koja uključuju 2,5 %-tni CSE i 1 ili 3  $\mu$ g/mL rhHsp70, odnosno 5 %-tni CSE i 1 ili 3  $\mu$ g/mL rhHsp70 dovela su do statistički značajnih razlika u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo sa CSE-om, to jest u tim slučajevima povećala se ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ .

Važno je napomenuti da priloženi grafovi za ekspresiju gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  za sve stanice prikazuju tretiranja s rhHsp70 samo u koncentraciji od 1  $\mu$ g/mL.



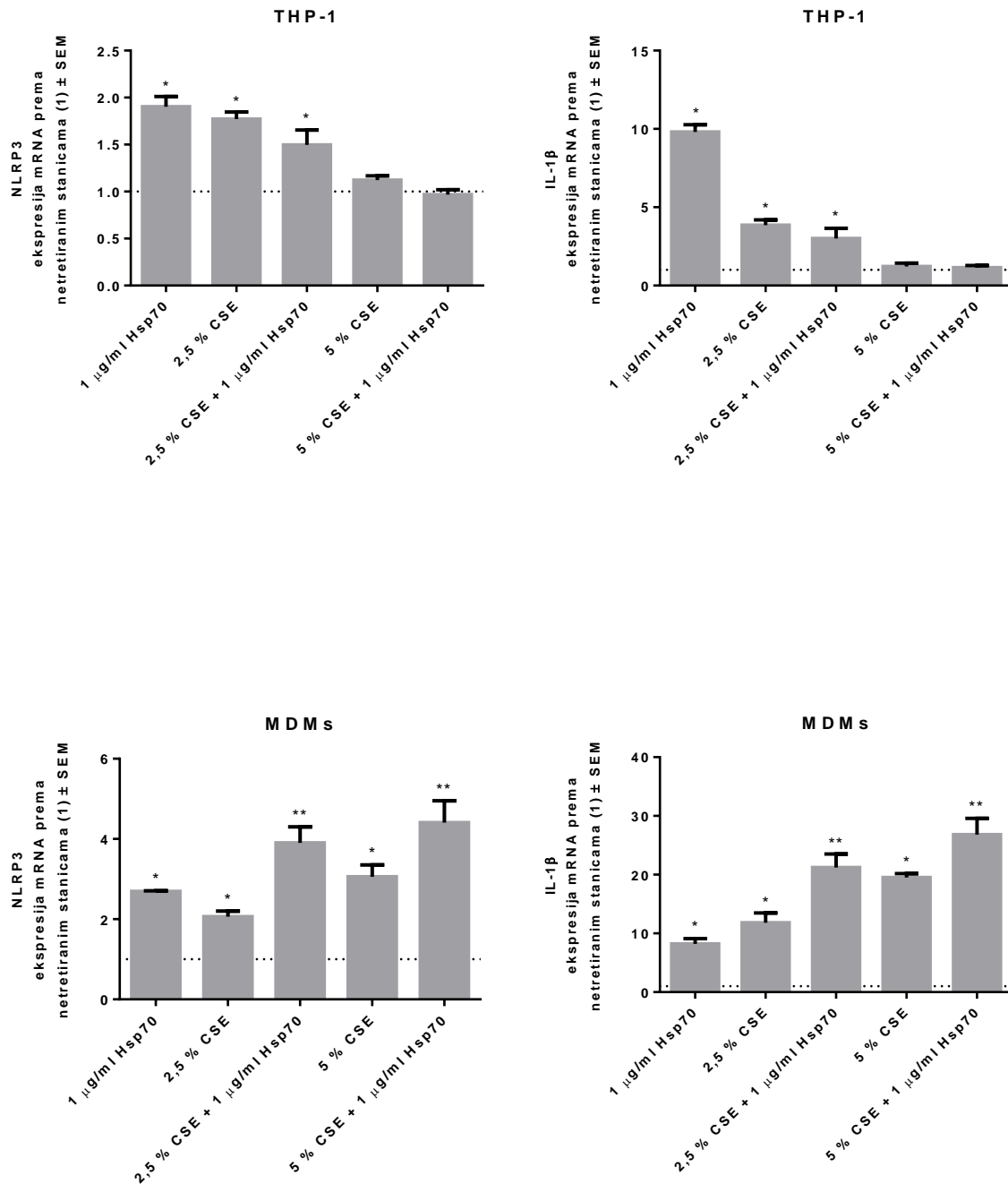
Slika 5. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1β u NCI-H292 i NHBE stanicama tretiranim s 1 μg/mL rhHsp70, različitim koncentracijama CSE-a (2,5 ili 15 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h.

Rezultati su prikazani kao medijan ± SEM tri neovisna eksperimenta (n = 3). Iscrtkana linija predstavlja ekspresiju mRNA u kontrolnim (netretiranim) stanicama čija je relativna ekspresija postavljena kao 1.

\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice

\*\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice i CSE





Slika 6. Ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u THP-1 i MDM stanicama tretiranim s 1  $\mu$ g/mL rhHsp70, različitim koncentracijama CSE-a (2,5 ili 5 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h.

Rezultati su prikazani kao medijan  $\pm$  SEM tri neovisna eksperimenta (n = 3). Iscrtkana linija predstavlja ekspresiju mRNA u kontrolnim (netretiranim) stanicama čija je relativna ekspresija postavljena kao 1.

\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice

\*\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice i CSE

#### 4.1.3. Određivanje koncentracije IL-1 $\beta$ izlučenog iz NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanica

Kako bi se potvrdilo da CSE i rhHsp70 te njihove kombinacije potiču aktivaciju NLRP3 inflammasoma, u ovom radu mjerila se koncentracija IL-1 $\beta$  u nadslojima iznad NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanica. Dobiveni rezultati su vrlo dobro povezani s rezultatima ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , a prikazani su na slici 7.

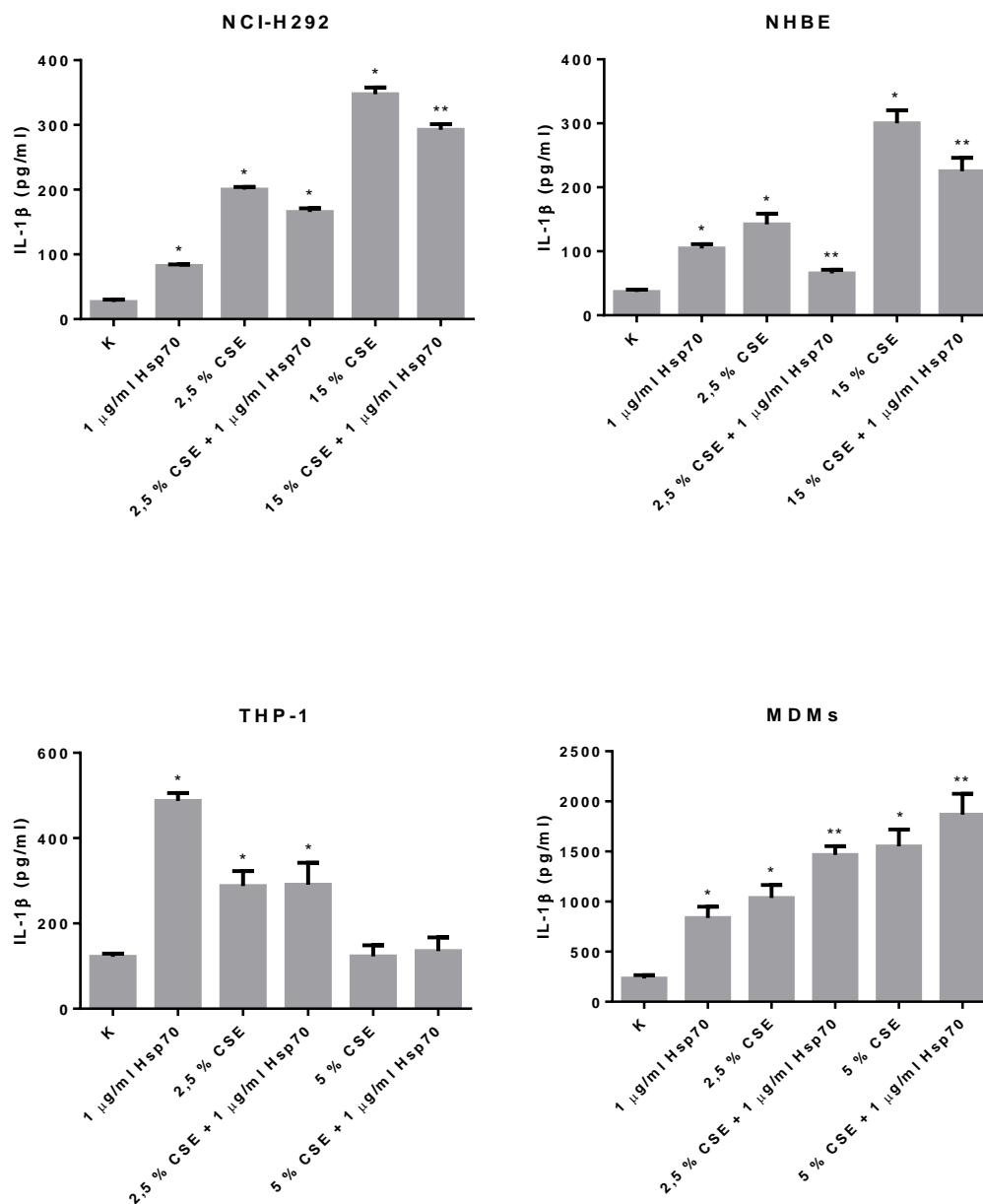
Nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 stanica svim primijenjenim koncentracijama rhHsp70, a to su 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama uočena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice, odnosno došlo je do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$ . Statistički značajna razlika uočena je i nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 stanica kombinacijom 2,5 %-tnog CSE-a i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70 u odnosu na tretiranje samo s 2,5 %-tnim CSE-om. Naime, u tom slučaju došlo je do smanjenog izlučivanja IL-1 $\beta$ . Kombinirana tretiranja NCI-H292 stanica koja uključuju 15 %-tni CSE sa svim primijenjenim koncentracijama rhHsp70 dovela su do statistički značajne razlike u odnosu na tretiranje samo sa 15 %-tnim CSE-om, odnosno došlo je do smanjenog izlučivanja IL-1 $\beta$ .

Statistički značajna razlika uočena je nakon 24-satnog tretiranja NHBE stanica s rhHsp70 u koncentracijama 0,3 i 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama u odnosu na netretirane stanice, odnosno sva tretiranja dovela su do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$ . Kombinirana tretiranja NHBE stanica dovela su do statistički značajne razlike u odnosu na tretiranja samo sa CSE-om, bilo 2,5 ili 15 %-tnim, to jest, imala su inhibicijske učinke na izlučivanje IL-1 $\beta$ .

Tretiranja THP-1 stanica s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 2,5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama nakon 24-sata dovela su do statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, odnosno dovela su do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$ . Nije uočena statistički značajna razlika u usporedbi s netretiranim stanicama nakon 24-satnog tretiranja THP-1 stanica 5 %-tnim CSE-om, bilo da je korišten sam ili u kombinaciji s rhHsp70 u svim primijenjenim koncentracijama. Također, nije uočena statistički značajna razlika prilikom usporedbe kombiniranih tretiranja THP-1 stanica i onih tretiranih samo sa CSE-om.

Statistički značajna razlika uočena je nakon 24-satnog tretiranja MDM stanica s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama u odnosu na netretirane stanice, odnosno došlo je do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$ . Statistički značajna razlika uočena je i za kombinirana tretiranja MDM stanica, a u usporedbi s pojedinačnim tretiranjima koja uključuju 2,5 ili 5 %-tni CSE. U tim slučajevima, kombinirana tretiranja MDM stanica imala su stimulacijski učinak, to jest, izazvala su povećano izlučivanje IL-1 $\beta$ .

Zanimljivo je da bazalna sekrecija IL-1 $\beta$  ovisi o staničnoj vrsti te je bila najniža u NCI-H292 stanicama ( $26,5 \pm 3,8$  pg/mL), a najviša u MDM stanicama ( $231,5 \pm 34,8$  pg/mL). Važno je napomenuti da priloženi grafovi prikazuju tretiranja s rhHsp70 samo u koncentraciji od 1  $\mu$ g/mL.



Slika 7. Koncentracija IL-1 $\beta$  u nadslojima iznad NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanica nakon tretiranja s 1  $\mu$ g/mL rhHsp70, različitim koncentracijama CSE-a (2,5, 5 ili 15 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h.

Rezultati su prikazani kao medijan  $\pm$  SEM tri neovisna eksperimenta (n = 3).

\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice

\*\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice i CSE

#### 4.1.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a, rhHsp70 te njihovih kombinacija na NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanice

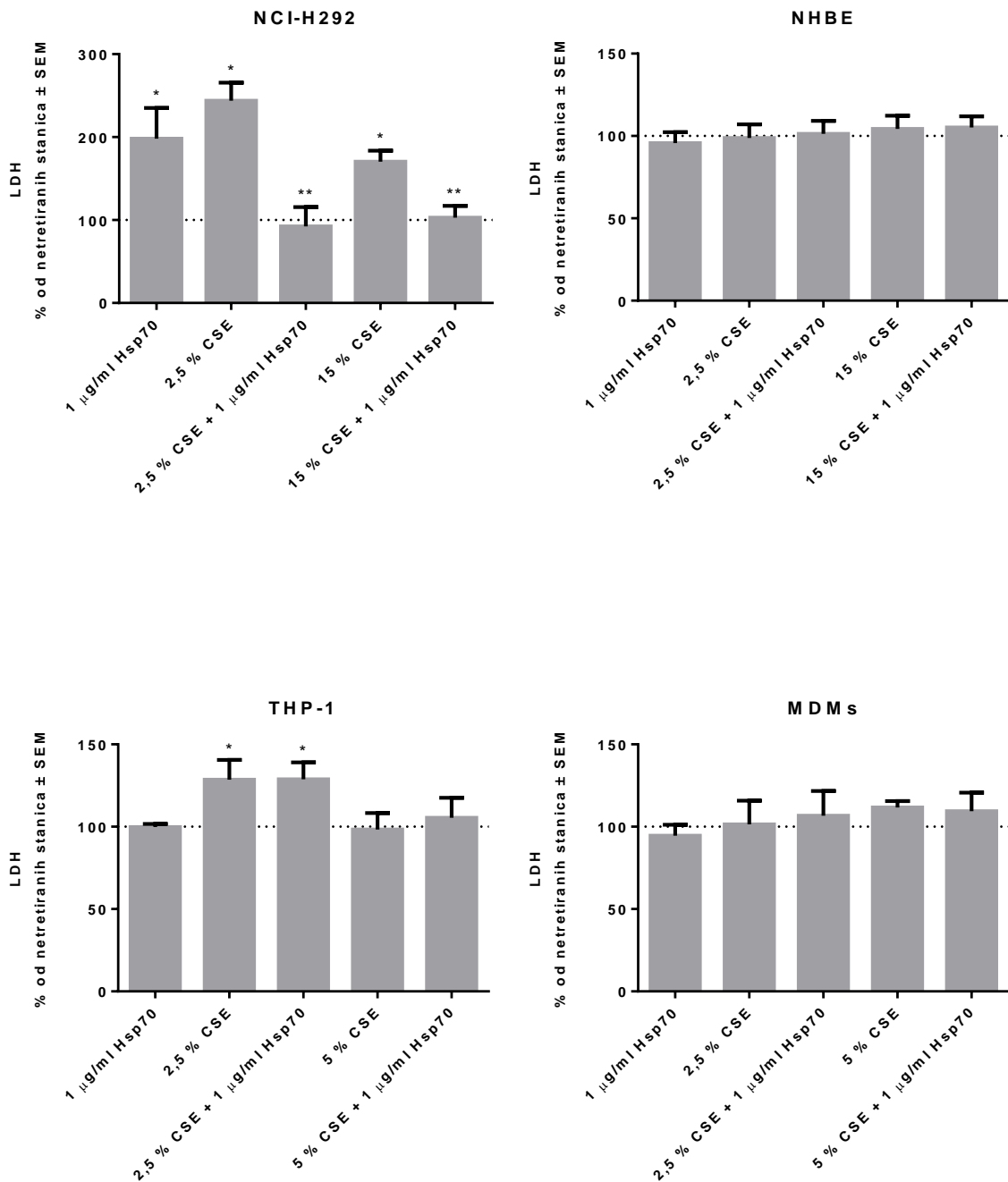
Mogući citotoksični učinci CSE-a ili rhHsp70 te njihovih kombinacija određeni su mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH oslobođene u medij iznad stanica nakon 24-satnog tretiranja. Ovaj jednostavan, ali koristan test smatra se zaštitnim znakom litičke stanične smrti i odražava integritet stanične membrane, a rezultati su prikazani na slici 8.

Statistički značajna razlika uočena je nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 stanica s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama u odnosu na netretirane stanice, s time da su imali citotoksični učinak u pojedinačnim tretiranjima, a kada su primijenjeni u kombinacijama, nisu primijećeni citotoksični učinci. Sva kombinirana tretiranja NCI-H292 stanica dovela su do statistički značajne razlike u odnosu na samostalna tretiranja sa CSE-om, to jest, dovela su do smanjenog izlučivanja LDH u medij iznad stanica.

Nisu uočene statistički značajne razlike nakon 24-satnog tretiranja NHBE stanica s rhHsp70 u koncentracijama 0,3 i 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama u odnosu na netretirane stanice, kao niti u usporedbi kombiniranih tretiranja s pojedinačnim tretiranjima koja uključuju CSE, što znači da sam CSE i rhHsp70, kao i njihove kombinacije, nisu bili citotoksični za NHBE stanice.

Što se tiče THP-1 stanica, nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama u odnosu na netretirane stanice, što znači da se u ovim slučajevima nije smanjila stanična vijabilnost. Statistički značajna razlika uočena je samo za tretiranja THP-1 stanica s 2,5 %-tnim CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 u svim primijenjenim koncentracijama u odnosu na netretirane stanice, to jest, smanjila se stanična vijabilnost.

Nakon 24-satnog tretiranja MDM stanica s rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5 i 5 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama, nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice, kao niti prilikom usporedbe kombiniranih i pojedinačnih tretiranja sa CSE-om. To znači da CSE i rhHsp70, kao ni njihove kombinacije, nisu bili citotoksični za MDM stanice, odnosno nisu smanjili integritet stanične membrane pa nije uočena povećana aktivnost LDH u nadsloju iznad ovih stanica.



Slika 8. Aktivnost LDH u nadslojima iznad NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanica nakon tretiranja s 1 µg/mL rhHsp70, različitim koncentracijama CSE-a (2,5, 5 ili 15 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h.

Rezultati su prikazani kao medijan ± SEM tri neovisna eksperimenta (n = 3). Iscrtkana linija predstavlja aktivnost LDH u nadsloju iznad kontrolnih (netretiranih) stanica čija je relativna aktivnost postavljena kao 100 %.

\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice

\*\* statistički značajno (P<0.05) u odnosu na CSE

#### 4.1.5. Western blot analiza ekspresije GSDMD-a te aktivacije RIPK3 i MLKL-a u MDM, THP-1, NCI-H292 i NHBE stanicama

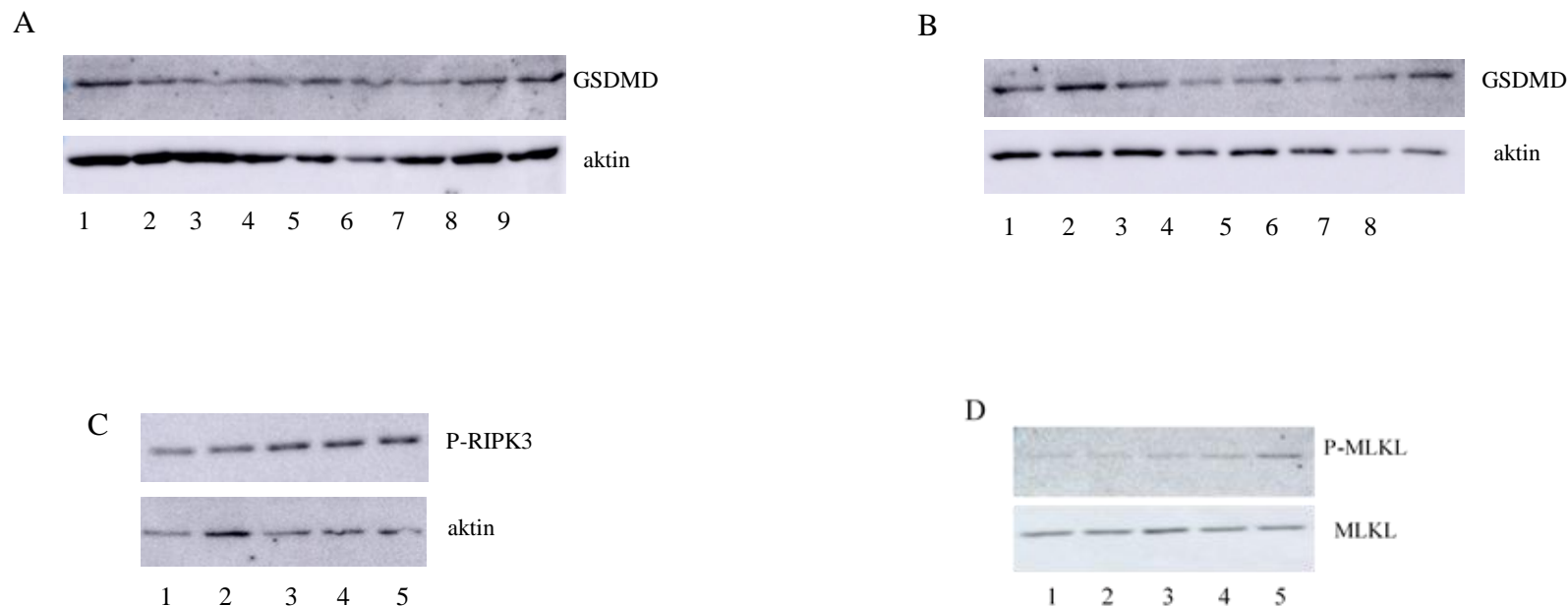
Ekspresija gasdermina-D (GSDMD), markera piroptoze, te aktivacija RIPK3 i MLKL, markera nekroptoze, ispitani su Western blot analizom nakon tretiranja različitim koncentracijama rhHsp70 (0,3, 1 ili 3  $\mu\text{g/mL}$ ), CSE (2,5, 5 ili 15 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 2 i 8 h, a rezultati su prikazani na slici 9. Primarne stanice, NHBE i MDM, tretirane su samo s rhHsp70 ili CSE-om, ali ne i njihovim kombinacijama, a THP-1 i NCI-H292 stanične linije podvrgnute su i kombiniranim tretiranjima. Rezultati Western blot analiza ekspresije GSDMD-a te aktivacije RIPK3 i MLKL-a u THP-1, NCI-H292 i NHBE stanicama tretiranim različitim koncentracijama rhHsp70, CSE-a ili njihovim kombinacijama tijekom 8 h prikazani su na slici 9.

Ekspresija GSDMD-a (omjer GSDMD/aktin) smanjena je u THP-1 stanicama nakon 8-satnog tretiranja s 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 2,5 i 5 %-tnim CSE-om u usporedbi s netretiranim stanicama.

U NCI-H292 stanicama također je smanjena ekspresija GSDMD-a nakon 8-satnog tretiranja s 3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 2,5 %-tnim CSE-om te nakon kombiniranog tretiranja koje uključuje 0,3  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70 i 2,5 %-tni CSE, a sve u usporedbi s netretiranim stanicama.

U NHBE stanicama nije primijećena promjena razine ekspresije GSDMD-a nakon tretiranja s rhHsp70 i CSE-om u usporedbi s netretiranim stanicama.

Aktivirani, odnosno fosforilirani oblici RIPK3 i MLKL-a detektirani su u NHBE stanicama. Snažna aktivacija RIPK3 i MLKL-a u NHBE stanicama dokazana je nakon 8-satnog tretiranja s 1  $\mu\text{g/mL}$  rhHsp70, 2,5 i 15 %-tnim CSE-om.



Slika 9. Western blot analiza ekspresije GSDMD-a (A, B) te aktivacije RIPK3 (C) i MLKL-a (D) u THP-1 (A), NCI-H292 (B) i NHBE (C, D) stanicama tretiranim različitim koncentracijama rhHsp70 (0,3, 1 ili 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CSE-a (2,5, 5 ili 15 %) ili njihovim kombinacijama tijekom 8 h. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi tri neovisna eksperimenta.

A: (1) kontrolne stanice (netretirane); (2) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (3) 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 2,5 % CSE + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (6) 2,5 % CSE + 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (7) 5 % CSE; (8) 5 % CSE + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (9) 5 % CSE + 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70

B: (1) kontrolne stanice (netretirane); (2) 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (3) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (4) 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (5) 2,5 % CSE; (6) 2,5 % CSE + 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (7) 2,5 % CSE + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (8) 2,5 % CSE + 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70

C, D: (1) kontrolne stanice (netretirane); (2) 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (3) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE

## 4.2. Rasprava

KOPB je kompleksna bolest, a rezultat je složene interakcije okolišnih i genskih čimbenika. Najistaknutiji čimbenik za nastanak KOPB-a je pušenje. Ova bolest ima plućne i sistemske manifestacije. Plućne manifestacije uključuju progresivno ograničenje protoka zraka, kroničnu upalu u dišnim putovima i plućima koja nastaje kao odgovor na štetne čestice ili plinove, a može dovesti do razaranja plućnog parenhima (emfizema) i kroničnog bronhitisa. Sistemska komponenta KOPB-a karakterizirana je kroničnom upalom, oksidacijskim stresom, aktivacijom imunskih stanica i povišenom koncentracijom upalnih citokina u krvi. U upalni odgovor uključene su različite stanice imunskog sustava, a posebno je potrebno istaknuti makrofage u plućnom tkivu koji potječu od monocita iz krvi. Od ostalih stanica valja izdvojiti epitelne stanice i fibroblaste, a sve one luče medijatore upale (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2020; Dong i sur., 2013; Agusti i sur., 2008; Rufino i sur., 2006).

U ovom diplomskom radu provedeno je *in vitro* istraživanje u kojem je korišteno nekoliko staničnih modela plućne i sistemske komponente KOPB-a kojima se nastojalo obuhvatiti cjelokupnu kompleksnost ove bolesti. Za ispitivanje plućne komponente KOPB-a korištena je stanična linija epitelne stanice traheobronhijalnog trakta (NCI-H292), a to su humane bronhijalne epitelne stanice porijeklom od bolesnika s mukoepidermalnim karcinomom te primarne humane traheobronhijalne epitelne stanice (NHBE), odnosno normalne humane bronhijalne epitelne stanice. Za ispitivanje sistemske komponente KOPB-a korištena je stanična linija monocitnih stanica diferenciranih u makrofage (THP-1), a to su humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom te primarni humani monociti iz periferne krvi također diferencirani u makrofage (MDM). U radu se ispitalo potiču li CSE, eHsp70 te njihove kombinacije aktivaciju NLRP3 inflamazoma te izazivaju li piroptozu i nekroptozu pridonoseći tako širenju upale na način da se određivala ekspresija mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , unutarstanična ekspresija GSDMD proteina, aktivacija RIPK3 i MLKL-a, koncentracija IL-1 $\beta$  te aktivnost LDH u supernatantu navedenih staničnih linija i primarnih stanica. Oponašanje imunomodulacijskog djelovanja izvanstaničnog Hsp70 postignuto je korištenjem rekombinantnog humanog Hsp70 proteina.

Dokazano je da je koncentracija eHsp70 povišena u različitim upalnim bolestima, uključujući i KOPB, a on djeluje kao DAMP molekula te njegovi učinci uključuju različite PRR-ove kao što su TLR2 i TLR4 (Qu i sur., 2015; Hacker i sur., 2009). U nekoliko istraživanja ispitivao se utjecaj rhHsp70 i pronađeno je da stimulira upalni odgovor u različitim stanicama, uključujući humane bronhijalne epitelne stanice i makrofage (Giuliano i sur., 2011; Mathur i



sur., 2011; Wheeler i sur., 2009; Chase i sur., 2007). S druge strane, pušenje, odnosno cigaretni dim, smatra se najvažnijim uzročnikom razvoja KOPB-a te je dokazan njegov toksični učinak na različite tipove stanica pluća i imunskog sustava. Udahnuti cigaretni dim potiče aktivaciju rezidentnih makrofaga u plućima koji pak sintetiziraju kemokine koji potiču prijenos monocita iz krvi u pluća gdje se diferenciraju u makrofage (MDM). Aktivirani plućni makrofagi sintetiziraju i upalne medijatore, poput citokina i ROS-a, koji parakrinim djelovanjem mogu aktivirati i druge stanice dišnog sustava, primjerice epitelne stanice, a kao rezultat nastaje plućna upala koja se može proširiti i ispoljiti systemske upalne učinke (Pauly i sur., 2010).

U ovom radu istraživali su se učinci CSE-a i rhHsp70 te njihovih kombinacija na aktivaciju NLRP3 inflammasoma i povezanih načina staničnog umiranja. Dokazano je da je ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  u NCI-H292, NHBE, THP-1 i MDM stanicama značajno povećana nakon primijenjenih tretiranja sa CSE-om i rhHsp70. Kombinirana tretiranja u nekim slučajevima bila su stimulacijska, primjerice u MDM stanicama, što ukazuje na mogući sinergistički učinak, a inhibicijski učinak imala su na NCI-H292 i NHBE stanice što pak ukazuje na mogući antagonistički učinak. U nekim slučajevima, primjerice u THP-1 stanicama, kombinirana tretiranja nisu imala učinak u odnosu na pojedinačna tretiranja.

Za dokazivanje aktivacije NLRP3 inflammasoma, u ovom radu mjerila se i koncentracija IL-1 $\beta$  u nadslojima iznad stanica tretiranih sa CSE-om i rhHsp70 te njihovim kombinacijama, a dobiveni rezultati su vrlo dobro povezani s rezultatima ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , odnosno, sličan obrazac uočen je i za izlučivanje ovog upalnog citokina. Važno je napomenuti da je koncentracija izlučenog IL-1 $\beta$  bila najveća za MDM stanice što je u skladu s istraživanjem Trana i sur. u kojem je dokazano da su monociti glavni izvor IL-1 $\beta$  u punoj krvi (Tran i sur., 2019). Zou i sur. određivali su koncentraciju IL-1 $\beta$  u krvi pacijenata s KOPB-om i dokazali su da je ona znatno viša u odnosu na zdrave osobe, posebice kod pacijenata s akutnim egzacerbacijama, a povećanu koncentraciju IL-1 $\beta$  u pacijenata oboljelih od KOPB-a dokazali su i Hammad i sur. (Zou i sur., 2017; Hammad i sur., 2015).

Aktivaciju NLRP3 inflammasoma kod pacijenata s KOPB-om istraživali su Fu i sur. na način da su mjerili razinu genske ekspresije NLRP3, kaspaze-1 i IL-1 $\beta$  te su utvrdili povećanu ekspresiju navedenih molekula, posebice u pacijenata s akutnim egzacerbacijama. Sobradillo i sur. također su istraživali aktivaciju NLRP3 inflammasoma potaknutu duhanskim dimom u pacijenata s KOPB-om te su dobili rezultate povećane ekspresije kaspaze-1 i NLRP3 te povećanu koncentraciju IL-1 $\beta$  u plućima ovih pacijenata te su zaključili da dolazi do aktivacije NLRP3 inflammasoma (Fu i sur., 2018; Sobradillo i sur., 2013).

Stanična smrt je, uz upalu, vrlo važan aspekt razumijevanja mehanizama bolesti. U ovom radu ispitivali su se mogući citotoksični učinci CSE-a i rhHsp70 te njihovih kombinacija na način da se mjerila katalitička aktivnost LDH oslobođene u medij iznad stanica. Ovim testom određuje se integritet stanične membrane i litička stanična smrt koja je dokazana u staničnim linijama (NCI-H292 i THP-1), ali ne i u primarnim stanicama (NHBE i MDM). Phillips i sur. dokazali su izravni učinak koncentracije CSE-a na preživljavanje NCI-H292 stanica, odnosno viša koncentracija CSE-a dovela je do značajnijeg smanjenja vijabilnosti stanica u usporedbi s nižim koncentracijama CSE-a primijenjenim u istom vremenskom periodu što nije u skladu s istraživanjem provedenim u ovom diplomskom radu (Phillips i sur., 2005). Citotoksično djelovanje CSE-a na THP-1 stanice istraživali su i Brunssen i sur. te su utvrdili da je preživljavanje ovih stanica smanjeno nakon njihovog tretiranja tijekom 24 sata (Brunssen i sur., 2017). Rezultati navedenog istraživanja u skladu su s istraživanjem provedenom na THP-1 stanicama u ovom diplomskom radu.

U ovom diplomskom radu istraživao se i način staničnog umiranja, odnosno dolazi li do aktivacije nekroptoze i/ili piroptoze koje mogu biti povezane s aktivacijom NLRP3 inflammasoma, na način da se određivala aktivacija RIPK3 i MLKL-a te ekspresija proteina GSDMD-a kao obilježja nekroptoze, odnosno piroptoze. Nije dokazana promjena u ekspresiji GSDMD-a ili aktivacija RIPK3 i MLKL-a u MDM stanicama. Ekspresija GSDMD-a smanjena je u NCI-H292 i THP-1 stanicama, ali nije detektiran GSDMD-NT. Prema proizvođaču, korišteno antitijelo može prepoznati i GSDMD i GSDMD-NT, ali ipak ne može se sa sigurnošću tvrditi da je promatrana pojava povezana s nedostacima antitijela, da su primijenjena tretiranja doista smanjila GSDMD ekspresiju ili pak da se GSDMD-NT izlučio iz stanica pa nije mogao biti detektiran u staničnim lizatima. U NHBE stanicama nije primijećena značajna promjena u ekspresiji GSDMD-a, ali su detektirani aktivirani, odnosno fosforilirani oblici RIPK3 i MLKL-a što ukazuje na nekroptozu, ali dokazano je da navedene molekule, osim što potiču ovaj oblik stanične smrti, imaju i neka druga djelovanja te da također mogu aktivirati NLRP3 inflammasom pa se može pretpostaviti da je fosforilacija RIPK3 i MLKL-a u NHBE stanicama povezana s alternativnim putem aktivacije NLRP3 inflammasoma koji nije popraćen piroptozom i kidanjem proteina GSDMD-a (Swanson i sur., 2019; Yang i sur., 2019).

## 5. ZAKLJUČCI

### NCI-H292 stanice

- Pojedinačna tretiranja s rhHsp70, CSE-om te njihovim kombinacijama dovode do povećane ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$  što ukazuje na aktivaciju NLRP3 inflammasoma i upalu.
- Kombinirana tretiranja dovode do smanjene ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do smanjenog izlučivanja IL-1 $\beta$  u usporedbi s pojedinačnim tretiranjima sa CSE-om što upućuje na inhibicijske učinke, odnosno potiskivanje upalnog procesa.
- CSE i rhHsp70 djeluju citotoksično na NCI-H292 stanice u svim primijenjenim koncentracijama, ali u kombinacijama ne ispoljavaju takve učinke što ukazuje na zaštitno djelovanje kombinacija ovih agenasa.
- Ekspresija GSDMD-a smanjena je u odnosu na kontrolne stanice, ali nije detektiran GSDMD-NT fragment što upućuje na moguće potiskivanje njegove ekspresije ili na izlučivanje GSDMD-a iz stanica.

### THP-1 stanice

- rhHsp70, 2,5 %-tni CSE kao i njihove kombinacije dovode do povećane ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$  što ukazuje na aktivaciju NLRP3 inflammasoma i upalu.
- 5 %-tni CSE, samostalno i u kombinacijama s rhHsp70, nema utjecaja na THP-1 stanice što znači da ova tretiranja ne induciraju aktivaciju inflammasoma i upalni odgovor te ne smanjuju vijabilnost ovih stanica.
- Samo 2,5 %-tni CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 djeluju citotoksično na ove stanice, odnosno smanjuju staničnu vijabilnost.
- Smanjena je ekspresija GSDMD-a u usporedbi s kontrolnim stanicama, ali nije detektiran GSDMD-NT fragment što upućuje na moguće potiskivanje njegove ekspresije ili na izlučivanje GSDMD-a iz stanica.

### NHBE stanice

- Sve primijenjene koncentracije rhHsp70 i CSE-a te njihove kombinacije dovode do povećane ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$  što upućuje na aktivaciju inflammasoma i upalu.

- Kombinirana tretiranja dovode do smanjene ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do smanjenog izlučivanja IL-1 $\beta$  u usporedbi s pojedinačnim tretiranjima sa CSE-om što upućuje na inhibicijske učinke, odnosno potiskivanje upalnog procesa.
- rhHsp70 i CSE, kao ni njihove kombinacije, nemaju citotoksičan učinak na NHBE stanice.
- Primijenjena tretiranja dovela su do fosforilacije, odnosno aktivacije RIPK3 i MLKL-a, što upućuje na nekroptozu i moguću aktivaciju inflammasoma u kojoj sudjeluju ove molekule pa se pretpostavlja da je njihova fosforilacija povezana s alternativnim putem aktivacije NLRP3 inflammasoma koji se događa bez piroptoze.

#### MDM stanice

- Sva primijenjena tretiranja s rhHsp70, CSE-om te njihovim kombinacijama dovode do povećane ekspresije gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$  što upućuje na aktivaciju inflammasoma i upalu.
- Kombinirana tretiranja povećavaju ekspresiju gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$  te dovode do povećanog izlučivanja IL-1 $\beta$  u usporedbi s pojedinačnim tretiranjima sa CSE-om što upućuje na stimulacijske učinke ovih agenasa.
- CSE, rhHsp70 i njihove kombinacije nisu djelovali citotoksično na MDM stanice, nisu doveli do promjene u ekspresiji GSDMD-a ili do aktivacije RIPK3 i MLKL-a što upućuje na to da u ovim stanicama nije došlo do piroptoze ili nekroptoze.

#### ZAVRŠNI ZAKLJUČCI:

- Izvanstanični Hsp70 i cigaretni dim dovode do aktivacije NLRP3 inflammasoma što je u nekim slučajevima praćeno indukcijom nekroptoze ili piroptoze u pojedinim vrstama stanica.
- Povećane koncentracije izvanstaničnog Hsp70 u pušača sa ili bez KOPB-a mogu promijeniti imunosni odgovor izazvan cigaretnim dimom.
- Pretpostavlja se da bi alternativni put aktivacije inflammasoma mogao biti uključen u mnoga sterilna upalna stanja, primjerice kod stabilne faze KOPB-a.

## 6. LITERATURA

Aglietti RA, Dueber EC. Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends in Immunology*, 2017, 38, 261-271.

Agusti À, Soriano JB. COPD as a systemic disease *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2008, 5, 133–138.

Agusti AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2003, 21, 347–360.

Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK. HSP70 peptide bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5, 425–431.

Barišić K, Galović Rengel R, Žanić Grubišić T. Stresni proteini i njihov klinički značaj *Biochem Medica*, 2003, 3, 101–107.

Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138, 16-27.

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7, 99-109.

Bezemer GFG, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G. Dual Role of Toll-Like Receptors in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*, 2012, 64, 337-358.

Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol*. 2012;3:95. doi:10.3389/fimmu.2012.00095

Brunssen C, Giebe S, Hofmann A, Brux M, Morawietz H. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative, and Pro-Inflamamatory of Aqueous Cigarette Smoke Extract on Human Monocytes: A Potential Model System for Assessment of Next-Generation Tobacco and Nicotine Products. *Applied in Vitro Toxicology*, 2017, 3(1), 121-130.

Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, Kuchmiy A, Lamkanfi M. Inflammasomes in Respiratory Disease. *CHEST*, 2014, 145, 1211-1133.

Buttar BS, Bernstein M. The Importance of Early Identification of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Cureus*. 2018;10(10):e3494. doi:10.7759/cureus.3494

Cavailles A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S, Meurice J-C, Morel H, Person-Tacnet C, Leroyer C, Diot P. Comorbidities of COPD. *Eur Respir Rev*, 2013, 22, 454–475.

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.

Chase MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K. Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol*, 2007, 179, 6318–6324.

Choi ME, Price DR., Ryter SW, Choi A. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight*. 2019; 4(15), e128834, doi:10.1172/jci.insight.128834

Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 2001; 34:50s-59s.

Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, de Matos C, Russel RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167, 24-31.

da Costa CH, Noronha Filho AJ, Marques E Silva RMF, da Cruz TF, de Oliveira Monteiro V, Pio M, Rufino RL. Alpha 1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease patients: is systematic screening necessary?. *BMC*, 2019, doi:[10.1186/s13104-018-4043-9](https://doi.org/10.1186/s13104-018-4043-9)

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.

de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(12):a016287. doi:10.1101/cshperspect.a016287

Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012;379(9823):1341-1351. doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9

Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*, 2006, 7, 53.

Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 2014, 35, 7–16.

Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. 2013. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol*. 4, 289.

Dong J, Guo L, Liao Z, Zhang M, Zhang M, Wang T, Chen L, Xu D, Feng Y, Wen F. Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17, 885–893.

Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, 2009, 11(13), 1050-1062.

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.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: Oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J COPD*, 2011, 6, 413–421.

Fu JJ, Mao B, Wang SJ, Xiao W, Li GH, Wu LH. The activation of NLRP3 inflammasome

pathway in COPD is limited in local airways. *European Respiratory Journal*, 2018, 52: PA4981; doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA4981

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.

Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J*, 2011, 4, 49–60.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)., 2020. GOLD 2020 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2020.

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.

Gut-Gobert C, Cavallès A, Dixmier A, Guillot S, Jouneau S, Leroyer C, Marchand-Adam S, Marquette D, Meurice JC, Desvigne N, Morel H, Person-Tacnet C, Raheison C. Women and COPD: do we need more evidence?. *European Respiratory Review*, 2019, 28: 180055; doi: 10.1183/16000617.0055-2018

Guyton AC, Hall JE. Fizikalna načela izmjene plinova; difuzija kisika i ugljikova dioksida kroz respiracijsku membranu. U: *Medicinska fiziologija*. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 492-494.

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, et al. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 $\alpha$  in chronic obstructive pulmonary disease: Markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab*. 2009;55(1–2):31–40.

Hammad DR, Elgazzar AG, Essawy TS, El Sameie SAA. Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 2015, 347-352.



Hoenderdos K, Condliffe A. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48, 531-539.

Hou YF, Zhou YC, Zheng XX, Wang HY, Fu YL, Fang ZM, He SH. Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine. *Mol Immunol*, 2006, 43, 1982–1992.

Hulina A. (2018). Uloga izvanstaničnog proteina Hsp70 i njegovih receptora u kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti. (Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet).

Preuzeto s: <https://dr.nsk.hr/islandora/object/pharma%3A880> (24. 6. 2020.)

Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur. Respir.*, 2008, J. 31, 287–297.

Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*, 2006, 79, 425–434.

Kennedy D, Jäger R, Mosser DD, Samali A. Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins. *IUBMB Life*, 2014, 66, 327-338.

Keros P, Pećina M, Ivančić-Košuta M. Dišni sustav. U: Temelji anatomije čovjeka. Zagreb, Naklada Naprijed d.d., 1999, str. 81-82.

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.

Lee KH, Kang TB. The Molecular Links between Cell Death and Inflammasome. *Cells*, 2019, 8(9), 1057. <https://doi.org/10.3390/cells8091057>

Liu X, Liebermann J. A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. *Adv Immunol*, 2017, 135, 81-117.

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

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.

MacNee W. Oxidants and COPD. *Curr Drug Target -Inflammation Allergy*, 2005, 4, 627–641.

Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*, 2015, 265, 6-21.

Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J*, 2011, 75, 2445–2452.

Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax*, 2015, 70(5), 482-9.

Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AMK. Mitophagy- dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(9), 3987-4003.

Mizumura K, Maruoka S, Gon Y, Choi AM, Hashimoto S. The role of necroptosis in pulmonary diseases. *Respir Investig*. 2016; 54(6):407-412. doi:10.1016/j.resinv.2016.03.008

Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 7, 1-9.

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.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001, 12, 53–72.

Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature*. 1995;378:88–91.

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.

Pauly JL, Smith LA, Rickert MH, Hutson A, Paszkiewicz GM. Review: Is lung inflammation associated with microbes and microbial toxins in cigarette tobacco smoke? *Immunol Res*. 2010;46(1–3):127–36.

Peltzer N, Walczak H. Cell Death and Inflammation - A Vital but Dangerous Liaison. *Trends Immunol*, 2019;40(5):387-402. doi:10.1016/j.it.2019.03.006

Phillips J, Klauss B, Richter A, Massey ED. Exposure of Bronchial Epithelial Cells to Whole Cigarette Smoke: Assessment of Cellular Responses. *Alternatives to Laboratory Animals*, 2005, 33, 239-248.

Pinkerton JW, Kim RY, Robertson AAB, Hirota JA, Wood LG, Knight DA, Cooper MA, O'Neill LAJ, Horvat JC, Hansbro PM. Inflammasomes in the lung. *Molecular Immunology*, 2017, 86, 44-55.

Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 2003, 362, 469–476.

Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NHT, Vandenabeele P, Krysko DV, Nawijn MC, van Oosterhout AJM. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD.

*Mucosal Immunol*, 2014, 7, 215–226.

Pyroptosis.

[https://www.genetex.com/Research/Overview/cell\\_biology/Pyroptosis\\_Inflammation](https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/Pyroptosis_Inflammation),

pristupljeno: 29. 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.

Roth M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12, 375–380.

Rufino R, Lapa J, Silva E. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol*, 2006, 3, 241–248.

Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*, 2009; 374(9691):733-743. doi:10.1016/S0140-6736(09)61303-9

Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biologica*, 2005, 51, 148-156.

Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonist sin stable COPD. *J Clin Immunol*, 2009, 29, 508-516.

Sawada M, Kawayama T, Imaoka H, et al. IL-18 induces airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation via CD4+ T cell and IL-13. *PLoS One*, 2013;8(1):e54623. doi:10.1371/journal.pone.0054623

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.

Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, 2016, 213, 617-629.

Sharma D, Masison DC. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept Lett*, 2009;16(6):571–581.

Sobradillo P, Faner R, Noguera A, Gómez C, Cruz T, González N, Ballester E, Soler N, Aróstegui JI, Rodríguez-Roisin R, Yagüe J, Juan M, Agustí A. The NLRP3 inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 2013, 42: P631

Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immun*, 2014, 20, 115-125.

Srivastava P. New jobs for ancient chaperones. *Sci Am*, 2008, 1, 50–55.

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.

Stoller JK, Aboussouan LS.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005, 365, 2225-2236.

Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*, 2016, 100, 961-967.

Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477–89. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

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.

Tissieres A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 1974, 84, 389-398.

Tran TAT, Grievink HW, Lipinska K, Kluft C, Burggraaf J, Moerland M, et al. Whole blood assay as a model for in vitro evaluation of inflammasome activation and subsequent caspase-mediated interleukin-1 beta release. *PLoS One*, 2019;14(4):1–16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214999>

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

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

Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*, 2017, 277, 76-89.

van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJL, Gans ROB, Koëter GH, van Oosterhout AJM, Kauffman HF. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, L1211-8.

Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Current Biology*, 2016, 26(13), 568-572.

Vanden Berghe T, Linkerman A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(2), 135-147.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11, 700-714.

Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates

neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res*, 2009, 10, 31.

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.

Xia S, Hollingsworth LR 4th, Wu H. Mechanism and Regulation of Gasdermin-Mediated Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020;12(3):a036400.

doi:10.1101/cshperspect.a036400

Xu F, Luo M, He L, et al. Necroptosis Contributes to Urban Particulate Matter-Induced Airway Epithelial Injury. *Cell Physiol Biochem*, 2018;46(2):699-712. doi:10.1159/000488726

Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 476, 28-37.

Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 476, 28-37.

Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis*, 2019;10(2). <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8>

Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkerman A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(11), 1975.

Zhu F., Zhang W., Yang T., He S.D. Complex roles of necroptosis in cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019;20(5):399-413. doi:10.1631/jzus.B1900160

Zou Y, Chen X, Liu J, et al. Serum IL-1 $\beta$  and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*, 2017, 12:1247–1254, doi:10.2147/COPD.S131877.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) složena je bolest čija patogeneza uključuje kroničnu upalu, a povezana je s dugotrajnom izloženošću štetnim česticama, posebice cigaretnom dimu. U krvi bolesnika s KOPB-om izmjerene su povišene koncentracije izvanstaničnog Hsp70 (eHsp70) koji djeluje imunomodulacijski.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati potiču li ekstrakt cigaretnog dima (CSE), eHsp70 te njihove kombinacije aktivaciju NLRP3 inflammasoma te izazivaju li piroptozu i nekroptozu. Oponašanje imunomodulacijskog djelovanja eHsp70 postignuto je korištenjem rekombinantnog humanog Hsp70 proteina (rhHsp70). Provodila su se tretiranja *in vitro* modela KOPB-a, a to su NCI-H292, THP-1, NHBE i MDM stanice, s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5, 5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata. Aktivacija NLRP3 inflammasoma i upalni odgovor ispitani su određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$  qPCR-om te određivanjem koncentracije izlučenog IL-1 $\beta$ . Vijabilnost stanica ispitana je određivanjem aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja ispitano je određivanjem aktivacije i ekspresije RIPK3 i MLKL-a (nekroptoza) te ekspresije GSDMD-a (piroptoza) Western blot analizom nakon tretiranja tijekom 2 i 8 h te određivanjem koncentracije IL-1 $\beta$  (piroptoza).

Dokazano je da je ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , kao i izlučivanje IL-1 $\beta$ , u svim stanicama značajno povećana nakon primijenjenih pojedinačnih tretiranja, što upućuje na aktivaciju inflammasoma i upalu. Kombinirana tretiranja bila su stimulacijska u MDM stanicama, inhibicijski učinak imala su na NCI-H292 i NHBE stanice, a u THP-1 stanicama nisu imala učinak u odnosu na pojedinačna tretiranja. Litička stanična smrt dokazana je u staničnim linijama (NCI-H292 i THP-1), ali ne i u primarnim stanicama (NHBE i MDM). Promjena u ekspresiji GSDMD-a ili aktivacija RIPK3 i MLKL-a nije dokazana u MDM stanicama. Ekspresija GSDMD-a smanjena je u NCI-H292 i THP-1 stanicama, ali nije detektiran GSDMD-NT. U NHBE stanicama detektirani su aktivirani, odnosno fosforilirani oblici RIPK3 i MLKL-a što ukazuje na nekroptozu ili alternativni put aktivacije NLRP3 inflammasoma za koji se pretpostavlja da bi mogao biti uključen u mnoga sterilna upalna stanja, primjerice kod stabilne faze KOPB-a.



Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disease whose pathogenesis includes chronic inflammation and is associated with prolonged exposure to harmful particles, especially cigarette smoke. Elevated concentrations of extracellular Hsp70 (eHsp70), which has an immunomodulatory effect, were measured in the blood of patients with COPD.

The aim of this study was to examine whether cigarette smoke extract (CSE), eHsp70 and their combinations stimulate the activation of NLRP3 inflammasome and whether they cause pyroptosis and necroptosis, thus contributing to the propagation of inflammation. rhHsp70 protein was used to mimic immunomodulatory action of eHsp70. *In vitro* models of COPD, and those are NCI-H292, THP-1, NHBE, and MDM cells, were treated for 24 hours with rhHsp70 at concentrations of 0.3, 1, and 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5, 5 and 15 % CSE and their combinations. Activation of NLRP3 inflammasome and inflammatory response were examined by determining mRNA expression for NLRP3 and IL-1 $\beta$  by quantitative PCR, and by determining the concentration of secreted IL-1 $\beta$ . Cell viability was determined by measuring LDH activity in the media above the cells and their mode of dying was explored by determining the activation and expression of RIPK3 and MLKL (necroptosis) and GSDMD expression (pyroptosis) by Western blot analysis after treatment during 2 and 8 h, as well as the already mentioned IL-1 $\beta$  concentration (pyroptosis).

It has been shown that gene expression for NLRP3 and IL-1 $\beta$ , as well as IL-1 $\beta$  secretion, were significantly increased in all cells after individual treatments, indicating inflammasome activation and inflammation. Combination treatments were stimulatory in MDM cells, had an inhibitory effect on NCI-H292 and NHBE cells, and had no effect on THP-1 cells in comparison to individual treatments. Lytic cell death has been observed in cell lines (NCI-H292 and THP-1) but not in primary cells (NHBE and MDM). A change in GSDMD expression or activation of RIPK3 and MLKL has not been demonstrated in MDM cells. GSDMD expression was reduced in NCI-H292 and THP-1 cells, but GSDMD-NT was not detected. Activated or phosphorylated forms of RIPK3 and MLKL were detected in NHBE cells, indicating necroptosis or an alternative activation of NLRP3 inflammasome that is thought to be involved in many sterile inflammatory conditions, such as the stable phase of COPD.

## 8. PRILOZI

### 8.1. Popis kratica

ADP	adenozin-difosfat
ALR	receptor sličan proteinu 2 odsutnom u melanomu ( <i>engl.</i> absentin melanoma 2-like receptors)
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance ( <i>engl.</i> One Way Analysis of Variance)
AP-1	aktivacijski protein 1 ( <i>engl.</i> activator protein 1)
Apaf-1	čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze ( <i>engl.</i> apoptotic protease activating factor-1)
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
B2M	$\beta$ 2-mikroglobulin
BCA	bicinkonična kiselina
BEGM	medij za rast bronhijalnih epitelnih stanica ( <i>engl.</i> Bronchial Epithelial Cell Growth Medium)
BH	Bcl-2 homologna domena
BSA	goveđi serumski albumin ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
CARD	domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza ( <i>engl.</i> caspase activation and recruitment domain)
CD14	biljeg diferencijacije 14 ( <i>engl.</i> cluster of differentiation 14)
cDNA	komplementarna DNA ( <i>engl.</i> complementary DNA)
cIAP-1	stanični protein 1 koji inhibira apoptozu ( <i>engl.</i> cellular inhibitor of apoptosis protein 1)
CLR	lektinski receptor tipa C ( <i>engl.</i> C-type lectin receptor)
CSE	ekstrakt cigaretnog dima ( <i>engl.</i> cigarette smoke extract)
Ct	ciklus umnažanja u qPCR-u u kojem je postignut prag detekcije signala

CYD	cilindromatoza ( <i>engl.</i> cylindromatosis)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja ( <i>engl.</i> damage-associated molecular pattern)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt ( <i>engl.</i> death inducing signaling complex)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleozid-trifostat
Drp1	protein 1 koji je srodan dinaminu ( <i>engl.</i> dynamin related protein 1)
EDTA	etilendiamin-tetraoctena kiselina
eHsp70	izvanstanični Hsp70 ( <i>engl.</i> extracellular Hsp70)
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om ( <i>engl.</i> Fas-associated death domain)
FBS	fetalni goveđi serum ( <i>engl.</i> fetal bovine serum)
FEV <sub>1</sub>	forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi ( <i>engl.</i> forced expired volume in 1 second)
FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom ( <i>engl.</i> fluorescence energy resonance transfer)
FVC	forsirani vitalni kapacitet ( <i>engl.</i> forced vital capacity)
GOLD	Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest ( <i>engl.</i> Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
GSDMD	gasdermin D
GSDMD-NT	N-terminalni fragment gasdermina D
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina
HRP	peroksidaza iz hrena ( <i>engl.</i> horseradish peroxidase)
Hsp	protein toplinskog šoka ( <i>engl.</i> heat shock protein)
IFN	interferon
IFNR1	tip 1 receptora za interferon
IgG	imunoglobulin G

IL	interleukin
IL-1R1	receptor 1 za IL-1 ( <i>engl.</i> interleukin-1 receptor 1)
IRF3	čimbenik 3 regulacije interferona ( <i>engl.</i> interferon regulatory factor 3)
kDa	kilodalton
KOPB	kronična opstruktivska plućna bolest
LDH	laktat-dehidrogenaza
Leu	leucin
LPS	lipopolisaharid ( <i>engl.</i> lipopolysaccharide)
LRR	područja bogata leucinom ( <i>engl.</i> leucine-rich repeat)
LTA	lipoteikoična kiselina ( <i>engl.</i> lipoteichoic acid)
M-CSF	faktor koji stimulira koloniju makrofaga ( <i>engl.</i> macrophage colony-stimulating factor)
MDM	primarni humani monociti iz periferne krvi diferencirani u makrofage ( <i>engl.</i> monocyte-derived macrophages)
MLKL	protein s inaktivnom kinaznom domenom koja je eksprimirana u različitim vrstama ( <i>engl.</i> mixed lineage kinase domain-like protein)
MMP	metaloproteinaza matriksa ( <i>engl.</i> matrix metalloproteinase)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> messenger ribonucleic acid)
NaCl	natrij-klorid
NADH	nikotinamidadenin-dinukleotid
NCI-H292	humane bronhijalne epitelne stanice porijeklom od bolesnika s mukoepidermalnim karcinomom
NF- $\kappa$ B	jezgrin čimbenik kappa B ( <i>engl.</i> nuclear factor kappa B)
NHBE	normalne humane bronhijalne epitelne stanice
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide ( <i>engl.</i> nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 ( <i>engl.</i> NOD-like

	receptor pirin 3)
NOD	oligomerizacijska domena koja veže nukleotide ( <i>engl.</i> nucleotide-binding oligomerization domain)
NT	netretirane stanice
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima ( <i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern)
PBS	otopina soli puferirana fosfatom ( <i>engl.</i> phosphate buffer saline)
PCR	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PGAM5	član 5 obitelji fosfoglicerat-mutaze ( <i>engl.</i> phosphoglycerate mutase family member 5)
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat ( <i>engl.</i> phorbol-12-myristate-13-acetate)
PPIA	peptidil-prolil-izomeraza A
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture ( <i>engl.</i> pattern recognition receptor)
PYD	pirinska domena ( <i>engl.</i> pyrin domain)
qPCR	kvantitativni PCR ( <i>engl.</i> quantitative PCR)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70
RAGE	receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije ( <i>engl.</i> receptor for advanced glycation end-products)
RHIM	RIP motivi homotipske interakcije ( <i>engl.</i> RIP homotypic interaction motif)
RIG-1R	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina ( <i>engl.</i> retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor)
RIPK	serin/treonin protein-kinaza koja stupa u interakciju s receptorom ( <i>engl.</i> receptor-interacting serin/threonine protein-kinase)
RNA	ribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> ribonucleic acid)
ROS	reaktivne kisikove vrste ( <i>engl.</i> reactive oxygen species)
SDS	natrij-dodecil sulfat
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima ( <i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SEM	standardna pogreška ( <i>engl.</i> standard error of mean)
Ser	serin
TEMED	tetrametiletilen-diamin
THP-1	humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom
Thr	treonin
TIPSA	medij koji sadrži transferin, inzulin, penicilin, streptomycin i amfotericin B
TIR	citoplazmatska domena homologna Tollu i receptoru za interleukin-1 ( <i>engl.</i> Toll/interleukin 1 receptor homology domain)
TLR	receptor sličan Tollu ( <i>engl.</i> Toll-like receptor)
TNF	čimbenik nekroze tumora ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor)
TNFR1	receptor 1 za čimbenik nekroze tumora
TRADD	domena smrti povezana s receptorom za TNF ( <i>engl.</i> TNF receptor-associated death domain)
TRAF	čimbenik povezan s receptorom za TNF ( <i>engl.</i> TNF receptor-associated factor)
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon $\beta$ ( <i>engl.</i> TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ )
Val	valin
ZBP1/DAI	protein 1 koji se veže na Z-DNA/aktivator regulacijskih faktora IFN-a koji je ovisan o DNA ( <i>engl.</i> Z-DNA-binding protein 1/DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors)
zVAD	karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[o-metil]-fluorometilketon ( <i>engl.</i> carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone)

## 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## 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

### Utjecaj izvanstaničnog proteina Hsp70 i cigaretnog dima na aktivaciju inflamasona, nekroptoze i piroptoze u staničnim modelima kronične opstruktivske plućne bolesti

Marija Fabijanec

#### SAŽETAK

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) složena je bolest čija patogeneza uključuje kroničnu upalu, a povezana je s dugotrajnom izloženošću štetnim česticama, posebice cigaretnom dimu. U krvi bolesnika s KOPB-om izmjerene su povišene koncentracije izvanstaničnog Hsp70 (eHsp70) koji djeluje imunomodulacijski. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati potiču li ekstrakt cigaretnog dima (CSE), eHsp70 te njihove kombinacije aktivaciju NLRP3 inflamasona te izazivaju li piroptozu i nekroptozu. Oponašanje imunomodulacijskog djelovanja eHsp70 postignuto je korištenjem rekombinantnog humanog Hsp70 proteina (rhHsp70). Provodila su se tretiranja *in vitro* modela KOPB-a, a to su NCI-H292, THP-1, NHBE i MDM stanice, s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5, 5 i 15 %-tnim CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata. Aktivacija NLRP3 inflamasona i upalni odgovor ispitani su određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3 i IL-1 $\beta$  qPCR-om te određivanjem koncentracije izlučenog IL-1 $\beta$ . Vijabilnost stanica ispitana je određivanjem aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja ispitano je određivanjem aktivacije i ekspresije RIPK3 i MLKL-a (nekroptoza) te ekspresije GSDMD-a (piroptoza) Western blot analizom nakon tretiranja tijekom 2 i 8 h te određivanjem koncentracije IL-1 $\beta$  (piroptoza). Dokazano je da je ekspresija gena za NLRP3 i IL-1 $\beta$ , kao i izlučivanje IL-1 $\beta$ , u svim stanicama značajno povećana nakon primijenjenih pojedinačnih tretiranja, što upućuje na aktivaciju inflamasona i upalu. Kombinirana tretiranja bila su stimulacijska u MDM stanicama, inhibicijski učinak imala su na NCI-H292 i NHBE stanice, a u THP-1 stanicama nisu imala učinak u odnosu na pojedinačna tretiranja. Litička stanična smrt dokazana je u staničnim linijama (NCI-H292 i THP-1), ali ne i u primarnim stanicama (NHBE i MDM). Promjena u ekspresiji GSDMD-a ili aktivacija RIPK3 i MLKL-a nije dokazana u MDM stanicama. Ekspresija GSDMD-a smanjena je u NCI-H292 i THP-1 stanicama, ali nije detektiran GSDMD-NT. U NHBE stanicama detektirani su aktivirani, odnosno fosforilirani oblici RIPK3 i MLKL-a što ukazuje na nekroptozu ili alternativni put aktivacije NLRP3 inflamasona za koji se pretpostavlja da bi mogao biti uključen u mnoga sterilna upalna stanja, primjerice kod stabilne faze KOPB-a.

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

Rad sadrži: 64 stranica, 9 grafičkih prikaza i 106 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: KOPB, eHsp70, ekstrakt cigaretnog dima, inflamason, nekroptoza, piroptoza

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-Rojecky**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 2020.



## 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

### Effect of extracellular protein Hsp70 and cigarette smoke on the inflammasome, necroptosis and pyroptosis activation in cellular models of chronic obstructive pulmonary disease

Marija Fabijanec

#### SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disease whose pathogenesis includes chronic inflammation and is associated with prolonged exposure to harmful particles, especially cigarette smoke. Elevated concentrations of extracellular Hsp70 (eHsp70), which has an immunomodulatory effect, were measured in the blood of patients with COPD. The aim of this study was to examine whether cigarette smoke extract (CSE), eHsp70 and their combinations stimulate the activation of NLRP3 inflammasome and whether they cause pyroptosis and necroptosis, thus contributing to the propagation of inflammation. rhHsp70 protein was used to mimic immunomodulatory action of eHsp70. *In vitro* models of COPD, and those are NCI-H292, THP-1, NHBE, and MDM cells, were treated for 24 hours with rhHsp70 at concentrations of 0.3, 1, and 3  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5, 5 and 15 % CSE and their combinations. Activation of NLRP3 inflammasome and inflammatory response were examined by determining mRNA expression for NLRP3 and IL-1 $\beta$  by quantitative PCR, and by determining the concentration of secreted IL-1 $\beta$ . Cell viability was determined by measuring LDH activity in the media above the cells and their mode of dying was explored by determining the activation and expression of RIPK3 and MLKL (necroptosis) and GSDMD expression (pyroptosis) by Western blot analysis after 2 and 8 h treatments, as well as the already mentioned IL-1 $\beta$  concentration (pyroptosis). It has been shown that gene expression for NLRP3 and IL-1 $\beta$ , as well as IL-1 $\beta$  secretion, were significantly increased in all cells after individual treatments, indicating inflammasome activation and inflammation. Combination treatments were stimulatory in MDM cells, had an inhibitory effect on NCI-H292 and NHBE cells, and had no effect on THP-1 cells in comparison to individual treatments. Lytic cell death has been observed in cell lines (NCI-H292 and THP-1) but not in primary cells (NHBE and MDM). A change in GSDMD expression or activation of RIPK3 and MLKL has not been demonstrated in MDM cells. GSDMD expression was reduced in NCI-H292 and THP-1 cells, but GSDMD-NT was not detected. Activated or phosphorylated forms of RIPK3 and MLKL were detected in NHBE cells, indicating necroptosis or an alternative activation of NLRP3 inflammasome that is thought to be involved in many sterile inflammatory conditions, such as the stable phase of COPD.

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

Thesis includes: 64 pages, 9 figures and 106 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COPD, eHsp70, cigarette smoke extract, inflammasome, necroptosis, pyroptosis

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: 2020.

