Određivanje upalnih citokina izlučenih iz THP-1 i NCI-H292 stanica nakon tretiranja izvanstaničnim Hsp70 proteinom

Dojder, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:535265

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ana Dojder

Određivanje upalnih citokina izlučenih iz THP-1 i NCI-H292 stanica nakon tretiranja izvanstaničnim Hsp70 proteinom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

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

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

SAŽETAK:

1. UVOD.....1
   1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB).....1
   1.2. Protein Hsp70 i njegova uloga u imunosnom odgovoru.....2
   1.3. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRRs).....3
   1.4. Receptori slični Toll receptoru (TLR).....4
   1.5. Agonisti TLR receptora: LPS i LTA.....6
   1.6. Signalni put ovisan o MyD88 proteinu.....7
   1.7. Signalni put ovisan o TRIF proteinu.....8
   1.8. Citokini koji se oslobađaju kod KOPB-a.....9
      1.8.1. IL-1α i IL-1β.....10
      1.8.2. IL-6.....11
      1.8.3. IL-8.....11
      1.8.4. TNF-α.....12
   1.9. ELISA.....12
      1.9.1. Princip sendvič ELISA-e.....13
      1.9.2. ELISA kao metoda određivanja citokina.....14
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....15
3. MATERIJALI I METODE.....16
   3.1. Materijali.....16
      3.1.1. Kemikalije.....16
      3.1.2. Protutijela.....17
      3.1.3. Standardi.....18
      3.1.4. Stanične linije.....19
      3.1.5. Aparat za detekciju.....19
   3.2. Metode.....20
      3.2.1. Uzgoj stanica.....20
      3.2.2. Presađivanje stanica.....20
         3.2.2.1. Priprema NCI-H292 stanica.....20
         3.2.2.2. Priprema THP-1 stanica.....20
      3.2.3. Određivanje broja stanica.....21
      3.2.4. Tretiranje stanica.....21
      3.2.5. Sendvič ELISA.....21
         3.2.5.1. Priprema mikrotitarskih pločica.....21

3.2.5.2. Provedba analize.....22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....24
4.1. Rezultati.....24
4.1.1. NCI-H292 stanice.....24
4.1.2. THP-1 stanice.....31
4.2. Rasprava.....38
5. ZAKLJUČCI.....40
6. LITERATURA.....41
7. SAŽETAK/ SUMMARY.....45
8. PRILOZI.....47
8.1. Kratice.....47
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....50

1. UVOD

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB)

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je učestala bolest karakterizirana perzistentnim respiracijskim simptomima i ograničenim protokom zraka. Navedeni simptomi prouzročeni su abnormalnostima dišnih putova i/ili alveolarnim promjenama do kojih dolazi zbog izloženosti stranim česticama ili plinovima. Kronično ograničenje dišnih putova karakterizirano je kombinacijom bolesti malih dišnih putova (primjerice, opstruktivni bronhiolitis) i parenhimskim razaranjem (emfizem). Kronična upala uzrokuje strukturne promjene, sužavanje malih dišnih putova i uništavanje plućnog parenhima što dovodi do gubitka alveolarne povezanosti sa malim dišnim putovima i smanjenja plućne elastičnosti. Posljedica toga je smanjenje sposobnosti dišnih putova da budu otvoreni tijekom izdisaja (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2017.).

Učestalost pojave KOPB-a i smrtnosti razlikuje se u različitim državama, kao i među različitim skupinama unutar država. Uzrokom KOPB-a smatra se kombinacija dugoročne izloženosti štetnim česticama i plinovima te različitih osobina pojedinaca, kao što su genetika, preosjetljivost dišnih putova i slabiji razvoj pluća tijekom djetinjstva (Lange i sur., 2015.; Stern i sur., 2007.; Tashkin i sur., 1992.). Štetne čestice i plinovi dio su onečišćenog gradskog zraka, a mogu nastati i gorenjem biomasa na otvorenom plamenu (primjerice, peći na ugljen). Posebno rizičnim čimbenikom smatra se pušenje duhana koje uključuje i pasivno pušenje. Osobe mogu biti izložene i štetnim česticama na nekim radnim mjestima kao što su različite industrijske tvornice (Vlegi i sur., 2007.). Genetska osnova ima veliku ulogu u patogenezi ove bolesti. Najbolje je opisan utjecaj deficijencije alfa-1 antitripsina (AATD), inhibitora serinskih proteaza u krvi (Stoller i sur., 2005.). Osim svih navedenih rizičnih čimbenika, često se naglašava da su također bitni dob i spol. Naime, uočeno je da se KOPB češće javlja kod starijih osoba, ali nije razjašnjeno da li tzv. „zdravo starenje“ dovodi do KOPB-a ili dob zapravo odražava zbroj kumulativne izloženosti štetnim česticama tijekom života (Mercado i sur., 2015.). Većina prijašnjih istraživanja pokazivala su da češće obolijevaju muškarci, ali noviji podaci iz razvijenijih zemalja ukazuju na to da je učestalost KOPB-a jednaka kod muškaraca i žena, jer žene danas puše više nego prije (Landis i sur., 2014.).

1.2. Protein Hsp70 i njegova uloga u imunosnom odgovoru

Proteini toplinskog šoka (Hsp, *engl.* heat shock protein) predstavljaju skupinu proteina stresa koji su eksprimirani u stanicama svih organizama (Borges i sur., 2012.). Otkriveni su 1974. godine u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) (Tissieres i sur., 1974.). Naziv Hsp potječe od činjenice da se njihova koncentracija povećava pri povišenju temperature. Hsp superporodica podijeljena je u nekoliko porodica koje su dobile ime prema njihovim približnim molekulskim masama: mali Hsp proteini, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110. Primjerice, Hsp70 proteinska porodica ima molekulsku masu od oko 70 kDa (Pockley, 2003.). Hsp70 protein izrazito je bitan jer kao unutarstanični molekulski šaperon pomaže brojnim proteinima tijekom njihovog smatanja, kako bi poprimili ispravnu konformaciju i time mogli obavljati svoju funkciju. Osim toga, veže se i za denaturirane proteine i tako potiče njihovu razgradnju te regulira imunosne odgovore kako bi potpomogao održavanje staničnog integriteta (Hacker i sur., 2009.; Bhardwaj i sur., 2012.; Lim i sur., 2013.). Osim unutarstaničnog Hsp70 proteina, postoji i njegov izvanstanični oblik (eHsp70, *engl.* extracellular Hsp70) koji se oslobađa iz stanica uslijed njezinih jakih oštećenja. Osim toga, Hsp70 može se djelomice otpustiti iz vijabilnih stanica egzocitozom, a da pritom nije prisutno tkivno oštećenje ili stanično umiranje. Otpuštanjem eHsp70 iz stanice povećava se njegova koncentracija u izvanstaničnom prostoru što služi kao „signal opasnosti“. eHsp70 veže se na različite membranske receptore prisutne na specifičnim imunosnim stanicama te dovodi do transkripcije gena za citokina te njihovog otpuštanja pa tako modulira imunosne odgovore (Asea i sur., 2000.; Johnson i Fleshner, 2006.).

Upravo zbog ovakvog ponašanja, smatra se da Hsp70 protein spada u skupinu DAMP molekula. Molekulske strukture nastale oštećenjem (DAMP, *engl.* damage-associated molecular pattern) su endogene molekule koje se pri normalnim fiziološkim uvjetima nalaze unutar stanice, ali u uvjetima staničnog stresa ili oštećenja stanica DAMP molekule se otpuštaju u izvanstanični prostor. Niske koncentracije DAMP molekula mogu povoljno djelovati na tkivni popravak tako da potiču fiziološki upalni odgovor, dok su u kroničnoj upali prisutne visoke koncentracije DAMP molekula. Kritičan koncentracijski prag DAMP molekula koji je potreban da se potakne razvoj bolesti može ovisiti o trajanju i stupnju oštećenja. Trenutno se malo zna o povezanosti kinetike ekspresije ili otpuštanja DAMP molekula i progresije KOPB-a (Piccinini i Midwook, 2010.).

1.3. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRRs)

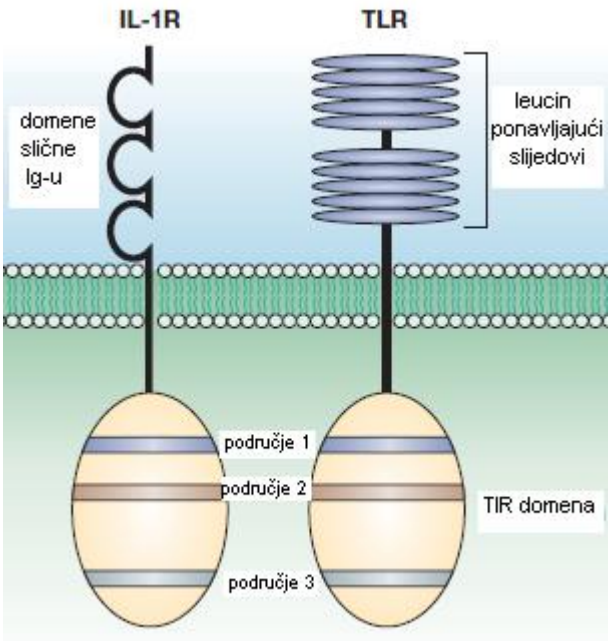
U plućnim bolestima, kao što je KOPB, značajnu ulogu ima prirođeni imunosni sustav koji djeluje preko receptora koji prepoznaju molekulske strukture (PRR, *engl.* pattern recognition receptor). Različiti PRR receptori su sposobni detektirati mikrobne molekule, kao i endogene molekule koje se oslobode oštećenjem stanica te inhalirane velike čestice (primjerice, azbestna vlakna). Nastali imunosni odgovor može biti koristan, ali i štetan za domaćina, ovisno o raširenosti imunosnih reakcija, njihovu trajanju te sposobnosti eliminacije patogena, odnosno popravka oštećenog tkiva. Prema tome, različiti PRR receptori imaju veliku ulogu u regulaciji tkivne homeostaze, zaštiti domaćina te patologiji infektivnih i neinfektivnih plućnih bolesti. PRR receptori se eksprimiraju na alveolarnim makrofagima, plućnim epitelnim stanicama i intraepitelnim dendritičnim stanicama (DCs, *engl*. dendritic cells), koje prve stupaju u konakt s patogenima, ali su također eksprimirani i na imunosnim stanicama koje se aktiviraju u kasnijoj fazi imunosnog odgovora (Opitz i sur., 2010.).

PRR receptori prepoznaju molekule koje ukazuju na oštećenje stanica (DAMP molekule), kao i različite molekulske strukture mikroorganizama (PAMP, *engl*. pathogen-associated molecular pattern) koje ukazuju na prisutnost infekcije određenim mikroorganizmima. Njihovim vezanjem na PRR receptore pokreće se signalna kaskada koja rezultira sintezom upalnih citokina, interferona (IFN) i kemokina. Navedeni medijatori upale 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 egzarcebacije KOPB-a zbog infekcije (Opitz i sur., 2010.).

PRR receptori obuhvaćaju nekoliko skupina receptora: receptori slični Toll receptoru *Drosophila* vrste (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) (Opitz i sur., 2010; Pouwels i sur., 2014.).

1.4. Receptori slični Toll receptoru (TLR)

Receptori slični Toll receptoru *Drosophila* vrste (TLR, *engl.* Toll-like receptor) su integralni membranski glikoproteini tipa I. Zbog homologne citoplazmatske domene pripadaju većoj superporodici receptora koja obuhvaća i receptore za interleukin-1 (IL-1Rs, *engl*. interleukin-1 receptors). No, ovi receptori se razlikuju prema izvastaničnom dijelu: izvanstanična domena TLR receptora sadrži ponavljajuće slijedove bogate leucinom (LRR, engl. leucine-rich repeat), dok se izvanstanični dio IL-1R receptora sastoji od tri domene slične imunoglobulinu (Akira i Takeda, 2004.).



Slika 1. Prikaz strukturnih domena IL-1R i TLR receptora. (Izvor: Akira i Takeda, 2004.)

Domena koja je homologna za Toll i IL-1 receptore (TIR, *engl*. Toll/interleukin-1 receptor homology domain) se sastoji od približno 200 aminokiselina. Unutar TIR domene nalaze se tri područja koja su izrazito bitna za prijenos signala. Izvanstanični dio TLR receptora se sastoji od 19-25 kopija LRR slijedova koji pri tome formiraju potkovastu strukturu te se smatra da je upravo ovakav oblik LRR domene izravno povezan s činjenicom da su TLR receptori važni za prepoznavanje širokog raspona različitih patogena (Akira i Takeda, 2004.).

Epitelne stanice dišnih putova se nalaze između domaćina i okoliša te predstavljaju početno mjesto bakterijske kolonizacije u respiracijskom traktu. Epitelne stanice dišnih putova i alveolarne epitelne stanice tipa II eksprimiraju TLR receptore. Kod prisutne infekcije, epitelne stanice dišnih putova mogu pojačati ekspresiju TLR receptora na njihovoj apikalnoj

membrani. Hiperosjetljivost dišnih putova na ozon se povezuje upravo sa TLR4 receptorima, no nije uočena povezanost TLR4 polimorfizama sa stadijima KOPB-a (Sabroe i sur., 2004). Ipak, snažna ekspresija TLR receptora u brojnim plućnim stanicama, uključujući infiltrirane monocite i neutrofile za koje se smatra da imaju glavnu ulogu u patologiji KOPB-a, ukazuju povezanost aktivacije TLR receptora sa razvojem KOPB-a. Aktivacija monocita i makrofaga s lipopolisaharidima (LPS, *engl*. lipopolysaccharide) potiče otpuštanje metaloproteinaza matriksa, što vrlo vjerojatno ima veliku ulogu u razvoju KOPB-a. Interakcije monocita i stanica glatkog mišićnog tkiva mogu rezultirati otpuštanjem razgradnih produkata matriksa koji potom mogu dovesti do stalne aktivacije TLR4 receptora. Tijekom akutnih egzacerbacija aktivirani su TLR receptori u plućima koji su bitni jer povezuju glatke mišiće dišnih putova i monocite. Mali broj monocita na kojima su aktivirani TLR receptori mogu uzrokovati otpuštanje velikog broja citokina iz stanica glatkih mišića dišnih putova. Prema tome je lako razumljivo zašto su ovakve interakcije bitne u nastanku upale kod KOPB-a (Chaudhuri i sur., 2005.).

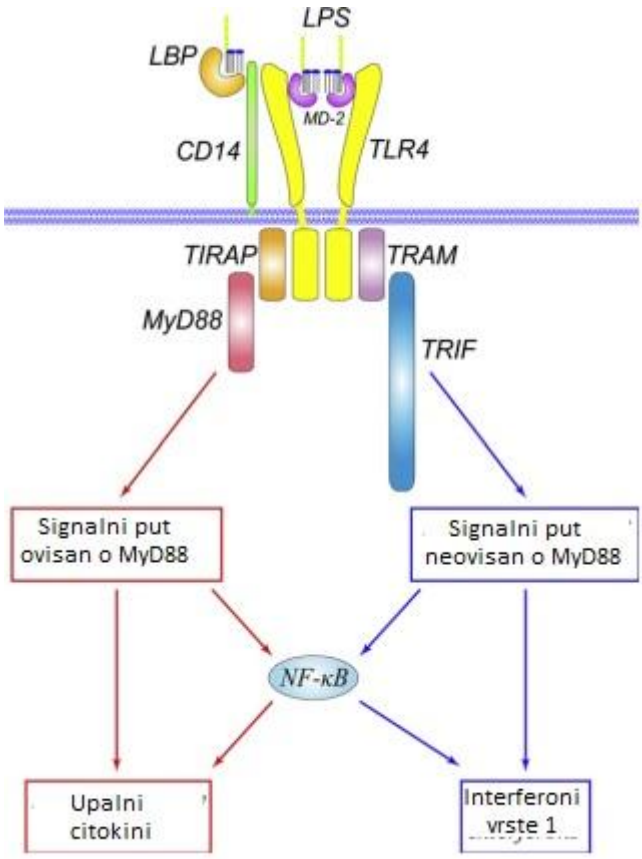
Iako svi TLR receptori imaju istu osnovnu strukturu, prepoznaju strukturno različite ligande, a i njihova je lokalizacija u stanici različita. TLR3, TLR7 i TLR9 prepoznaju strukture slične nukleinskim kiselinama, te za razliku od TLR1, TLR2 i TLR4, nisu smješteni na staničnoj membrani. Primjerice, TLR9 je eksprimiran u endoplazmatskom retikulumu (Akira i Takeda, 2004.).

TLR2 prepoznaje lipoproteine i lipoteikoičnu kiselinu (LTA, *engl*. lipoteichoic acid) koja potječe od mikobakterija i Gram-pozitivnih bakterija (primjerice, *S. pneumoniae*). Osim toga, na TLR2 receptore se mogu vezati rijetke vrste lipopolisaharida, kao što je LPS od *Porphyromonas gingivalis.* TLR2 ima važnu ulogu u imunosnom odgovoru na lipoproteine koji potječu iz različitih organizama, uključujući *Borrelia burgdorferi, Treponema pallidum, Aspergillus fumigatus* i *Mycoplasma fermentes* (Chaudhuri i sur., 2005.). Postoje dva pretpostavljena mehanizma koji objašnjavaju zašto TLR2 receptori prepoznaju tako široki spektar mikobnih komponenti. Prvo objašnjenje se temelji na tome da TLR2 formira heterodimer s drugim TLR receptorima koji su mu strukturno slični, kao što su TLR1 i TLR6. Drugo objašnjenje se odnosi na sposobnost TLR2 da prepoznaje komponente koje potječu od gljivica. Kod ovog modela, TLR2 se povezuje s različitim tipovima receptora kao što je dektin-1 koji pripada lektinskoj porodici receptora na koju se veže β-glukan, komponenta stanične stijenke gljivica (Takeda i Akira, 2005.).

TLR4 je receptor izrazito bitan za prepoznavanje LPS-a, ali i endogenih liganada, kao što su Hsp proteini (Hsp60 i Hsp70), oligosaharidi hijaluronske kiseline, heparan sulfat i fibrinogen. Naime, ove endogene molekule mogu aktivirati TLR4 receptore samo u slučaju njihove visoke koncentracije, dok će LPS i pri maloj koncentraciji aktivirati TLR4 te se zbog toga TLR4 smatra vrlo snažnim aktivatorom imunosnog odgovora (Takeda i Akira, 2005.).

1.5. Agonisti TLR receptora: LPS i LTA

Bakterijski endotoksin lipopolisaharid (LPS) je važna komponenta vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Sastavni dijelovi LPS-a su: oligosaharidna jezgra i O-bočni lanac te lipid A koji je glavni PAMP LPS-a. LPS stimulira stanice domaćina pomoću interakcija s proteinom koji veže LPS (LBP, *engl.* LBS binding protein), CD14, MD-2 i TLR4. LBP je topljivi prijenosni protein koji se izravno veže na LPS i povezuje ga s CD14. CD14 je protein uklopljen u membranu koji služi kao koreceptor i zbog toga ima važnu ulogu u prepoznavanju molekule LPS-a. CD14 posreduje u prijenosu LPS-a na TLR4/MD-2 receptorski kompleks i tako potiče prepoznavanje LPS-a. MD-2 je topljivi protein koji se nekovalentno veže na TLR4 receptor te je važan za aktivaciju TLR4 receptora LPS-om. Nakon prepoznavanja LPS-a, TLR4 se oligomeriza i potiče se signalna kaskada koja obuhvaća signalni put ovisan ili neovisan o čimbeniku mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88, *engl.* myeloid differentiation factor 88) te kao posljedica toga dolazi do sinteze upalnih citokina i interferona (Yong-Chen i sur., 2008.).



Slika 2. Vezanjem LPS-a na TLR4 receptor pokreće se signalna kaskada koja dovodi do povećane sinteze upalnih citokina i interferona. (Izvor: Yong-Chen i sur., 2008.).

Lipoteikoična kiselina (LTA) je glavna strukturna komponenta staničnog zida Gram-pozitivnih bakterija. Njezina struktura se razlikuje ovisno o vrsti Gram-pozitivnih bakterija, a može sadržavati lanac od ribitol- ili glicerol-fosfata. LTA se veže na heterodimer TLR2/TLR6 pomoću molekula CD14 i CD36 (Oliveira-Nascimento i sur., 2012.).

1.6. Signalni put ovisan o MyD88 proteinu

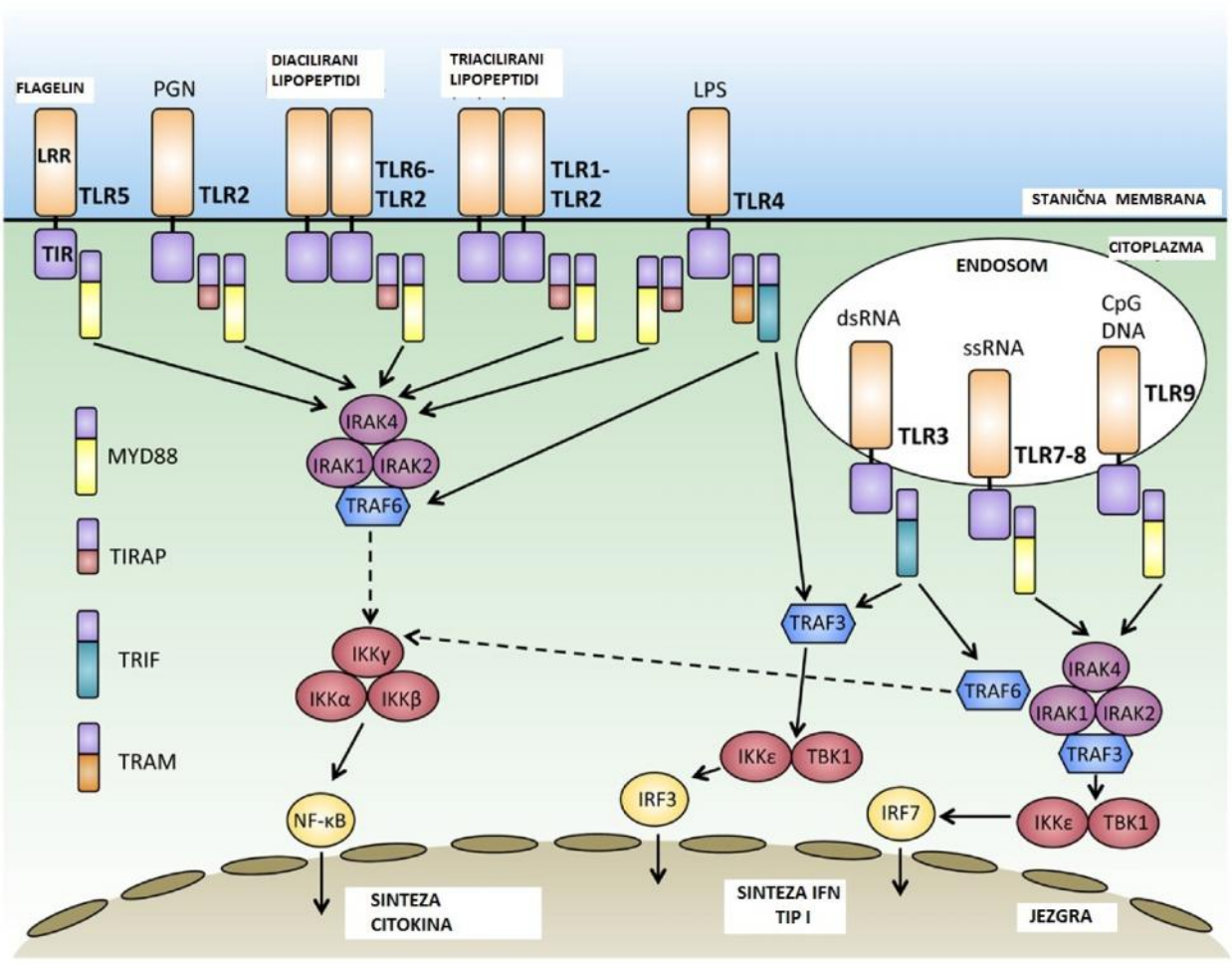
Svi TLR receptori se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu, putuju do Golgijeva aparata te se potom prenose do stanične membrane ili unutarstaničnih dijelova kao što su endosomi, gdje obavljaju svoju funkciju. Transmembranski protein UNC93B1 kontrolira putovanje unutarstaničnih TLR receptora od endoplazmatskog retikuluma do endosoma. Kako bi dobili funkcionalni oblik, TLR receptori u endosomu podliježu proteolitičkom kidanju pomoću katepsina B, S, L, H i K te asparginil-endopeptidaze. Nakon aktivacije TLR receptora MyD88 stvara kompleks s IRAK1 kinazom koja pripada porodici kinaza povezanih s receptorom za IL-1 (IRAK, *engl.* IL-1R associated kinases), a koji se naziva Myddosome. Tijekom njegovog nastanka, IRAK4 aktivira IRAK1, koji se onda na nekoliko mjesta

samofosforilira i disocira od MyD88. IRAK1 se veže na RING domenu E3 ubikvitin-ligaze TRAF6, koja potom zajedno s ubikvitin konjugirajućim enzimima UBC13 i UEV1A potiče K36-posredovanu poliubikvitinilaciju samog TRAF6, ali i TAK1 protein-kinaznog kompleksa. TAK1 je kinaza 1 aktivirana faktorom rasta tumora-β (*engl.* transforming growth factor-β activated kinase 1) te je član obitelji kinaza koje aktiviraju kinaze protein-kinaze aktiviranih mitogena (MAPKKK, *engl*. mitogen-activated protein kinase kinase kinase). TAK1 tvori kompleks s regulacijskim podjedinicama TAB1, TAB2 i TAB3 (TAB, *engl.* TAK1-binding protein), koje su u interakciji s poliubikvitinskim lancima nastalim na TRAF6 i dovode do aktivacije TAK1. Naime, iako su nepoznati točni mehanizmi aktivacije TAK1 unutar ovog kompleksa, moguće je da do nje dovode ubikvitinilacija u kojoj posreduje K36 ili transfosforilacija (Kawasaki i Kawai, 2014.).

TAK1 potom aktivira dva različita signalna puta: put nuklearnog faktora κB (NF-κB, *engl.* nuclear factor κB) i put protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, *engl.* mitogen-activated protein kinase). IκB kinazni kompleks (IKK) se sastoji od katalitičkih podjedinica IKKα, IKKβ i IKKγ. TAK1 se veže na IKK kompleks preko ubikvitinskih lanaca, koji omogućavaju njegovu fosforilaciju i aktivaciju IKKβ. IKK kompleks fosforilira NF-κB inhibicijski protein IκBα, koji se pri tome odvaja od NF-κB i podliježe razgradnji u proteasomu, čime se omogućuje da se NF-κB translocira u jezgru i potakne ekspresiju upalnih gena. Aktivacija TAK1 također potiče aktivaciju članova porodice MAPK, u koju spadaju kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1/2 (ERK1/2, *engl*. extracellular signal-regulated kinases 1/2), p38 i kinaze koje fosforiliraju N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun (JNK, *engl*. c-Jun N-terminal kinases) (Kawasaki i Kawai, 2014.).

1.7. Signalni put ovisan o TRIF proteinu

Adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (TRIF, *engl.* TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β) ulazi u interakciju s TRAF6 i TRAF3. TRAF6 privlači kinazu 1 koja je u interakciji s receptorom (RIP-1, *engl.* receptor-interacting protein kinase 1) koja onda fosforilira TAK1 kompleks, što dovodi do aktivacije NF-κB i MAPK signalnih putova te se potom sintetiziraju upalnih citokina. Suprotno tome, TRAF3 privlači kinazu vezanu na TANK (TBK1, *engl*. TANK binding kinase 1) i IKKε te potom dolazi do fosforilacije čimbenika 3 regulacije interferona (IRF3, *engl*. interferon regulatory factor 3). Pri tome IRF3 tvori dimer i translocira se iz citoplazme u jezgru, gdje potom potiče ekspresiju IFN tip I gena (Kawasaki i Kawai, 2014.).



Slika 3. Aktivacijom TLR receptora dolazi do pokretanja signalne kaskade koja obuhvaća signalne putove ovisne o MyD88 i TRIF proteinu.
(Izvor: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00367/full)

1.8. Citokini koji se oslobađaju kod KOPB-a

Citokini su izvanstanični signalni proteini molekulske mase manje od 80 kDa, a proizvode ih različite stanične vrste. Najviše je izraženo njihovo parakrino djelovanje, odnosno njihov učinak na stanice u neposrednoj blizini. Također mogu djelovati na udaljene stanice (endokrino djelovanje), kao i na stanice iz kojih potječu (autokrino djelovanje). Pojedini citokini se uglavnom sintetiziraju zajedno s drugim vrstama citokina, ovisno o tome kako oni trebaju djelovati. Funkcije citokina su jednake kod različitih citokinskih vrsta. Također, učinak određenog citokina ovisi o drugim citokinima koji se uz njega oslobađaju iz stanice; taj učinak može biti sinergistički ili antagonistički. Učinak citokina ovisi o visoko specifičnim receptorima na koje se oni vežu na određenim ciljnim stanicama. Receptori različitih citokina su grupirani u veće superporodice ovisno o njihovim homolognim regijama. Citokini također

mogu potaknuti ekspresiju tih receptora, te autokrino djelovati na stanicu iz koje potječu i time potaknuti svoju ekspresiju ili ekspresiju drugih citokina koji će potaknuti djelovanje prvotnog citokina (Chung, 2001.).

Brojne upalne stanice i njihovi medijatori su uključeni u upalne procese KOPB-a. Naime, cigaretni dim može izravno aktivirati brojne upalne stanice, kao što su makrofagi i epitelne stanice koje potom otpuštaju citokine i kemokine te time dovode do aktivacije drugih upalnih stanica i tkivnog remodeliranja. Regulacija otpuštanja ovih citokina je pod utjecajem NF-κB koji je aktiviran u makrofagima bolesnika s KOPB-om. Povišen broj makrofaga u plućima posljedica je privlačenja brojnih monocita u plućno tkivo te povećana lokalna proliferacija i preživljenje plućnih makrofaga (Caramori, 2014.).

Povišene koncentracije interleukina (IL) IL-6 , IL-1β i IL-8, te faktora tumorske nekroze alfa (TNF-α, *engl.* tumor necrosis factor-α) pronađene su u sputumu bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB-a (Keatings i sur., 1996.). Zapaženo je povećano otpuštanje upalnih citokina IL-8, IL-1 i TNF-α, kao i protu-upalnog citokina IL-10, iz alveolarnih makrofaga pušača i bolesnika s KOPB-om (Lim i sur., 2000.). Otpuštanje citokina je veće kod asimptomatskih pušača nego kod pušača oboljelih od KOPB-a. Cigaretni dim potiče gensku ekspresiju IL-8 i njegovo otpuštanje u bronhijalnim epitelnim stanicama, te otpuštanje TNF-α i IL-6 iz alveolarnih makrofaga (Mio i sur., 1997.; Dubar i sur., 1993.). Oksidansi prisutni u cigaretnom dimu uzrokuju otpuštanje upalnih citokina kao što su IL-1 i IL-8 iz makrofaga i epitelnih stanica. Izlaganje cigaretnom dimu potiče mehanizme ovisne o superoksidima koji dovode do ekspresije transkripcijskog faktora NF-κB što rezultira infiltracijom neutrofila u dišne putove. Prema svemu navedenom može se zaključiti da su brojni citokini i kemokini uključeni u patogenezu KOPB-a. Ipak, najvažnijim smatraju se sljedeći citokini: TNF-α, interferon γ, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18, IL-32 i timusni stromalni limfopoetin (TSLP, *engl.* thymic stromal lymphopoietin). Također je uključeno nekoliko kemokina, među kojima je najvažniji CXCL8, no on se uglavnom smatra citokinom (IL-8) (Chung i sur., 2001.).

1.8.1. IL-1α i IL-1β

IL-1α i IL-1β se najviše sintetiziraju u monocitima, makrofagima i fibroblastima te se nakon otpuštanja vežu na receptor 1 za IL-1 (IL-1R1) (Caramori i sur., 2014.). Kod oboljelih od KOPB-a, IL-1β snažno potiče makrofage na otpuštanje upalnih citokina, kemokina i MMP-9 (Culpitt i sur., 2003.). Koncentracija IL-1β 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 (Sapey i sur., 2009.). IL-1β potiče leukocitozu tako što povećava otpuštanje neutrofila iz koštane srži, također potiče proliferaciju fibroblasta, otpuštanje prostaglandina i kolagenaze te sintezu fibronektina i kolagena (Chung i sur., 2001.).

1.8.2. IL-6

IL-6 često djeluje zajedno s drugim citokinima i predstavlja poveznicu prirođenog i stečenog imunosnog odgovora. Koncentracija IL-6 je povišena u sputumu i plazmi bolesnika s KOPB-om, pogotovo tijekom egzacerbacija (Bhowmik i sur., 2000.; Bucchioni i sur., 2003.). Koncentracija IL-6 u plazmi je proporcionalna s koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP, *engl.* C-reactive protein) zato što je IL-6 glavni pokretač sinteze i otpuštanja CRP-a iz jetre. Za razliku od drugih citokina, IL-6 je izrazito stabilan u cirkulaciji, te se smatra da je zbog toga uključen u neke sistemske značajke KOPB-a, kao i u pogoršanja bolesti, uglavnom zato što IL-6 može doprinijeti oslabljenoj funkciji endotelnih stanica, inzulinskoj rezistenciji, osteoporozi i depresiji (Barnes, 2009.).

1.8.3. IL-8

IL-8, CXCL8 kemokin, je neutrofilni kemoatraktant i aktivator koji potiče porast unutarstanične koncentracije kalcija te time otpuštanje enzima i proteina iz unutarstaničnih skladišnih organela. Također regulira povećanje ekspresije integrina CD11b/CD18 i CD11c/CD18 tijekom egzocitoze specifičnih granula. IL-8 aktivira neutrofilnu 5-lipoksigenazu pri čemu nastaju leukotrien B_4 i 5-hidroksi-eikozatetraenska kiselina. IL-8 također ima kemoatraktivna svojstva za T-stanice. Bakterije mogu potaknuti ekspresiju IL-8 u epitelnim stanicama. Neutrofilna elastaza također potiče epitelne stanice da sintetiziraju IL-8 i leukotrien B_4 (Chung i sur., 2001.).

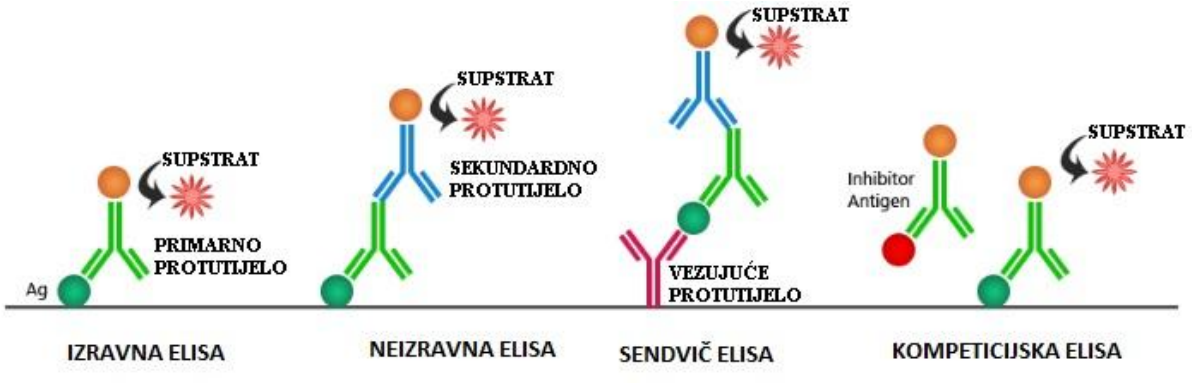
Njegova koncentracija je povišena u sputumu bolesnika s KOPB-om te ona ukazuje na težinu bolesti. Neutralizacija IL-8 s blokirajućim antitijelima smanjuje neutrofilnu kemotaktičnu aktivnost; no ovo smanjenje je samo djelomično jer djeluju i drugi neutrofilni kemotaktički faktori kao što je leukotrien B_4 (Caramori i sur., 2014.). Koncentracija IL-8 u sputumu je veća kod bolesnika s deficijencijom alfa-1 antitripsina nego kod bolesnika s KOPB-om s normalnom koncentracijom alfa-1 antitripsina (Woolhouse i sur., 2002.).

1.8.4. TNF-α

Brojne stanice stvaraju TNF-α, uključujući makrofage, T-stanice, mastocite i epitelne stanice, no njihovim glavnim izvorom smatraju se makrofagi. Otpuštanje TNF-α iz monocita, odnosno makrofaga, potaknuto je drugim citokinima, kao što su IL-1, GM-CSF i IFN-γ. TNF-α aktivira transkripcijski faktor NF-κB koji potiče ekspresiju gena za IL-8, čime se on pojačano otpušta iz epitelnih stanica dišnih putova i neutrofila. Također, TNF-α potiče ekspresiju ICAM-1, adhezijske molekule čija je koncentracija povišena u serumu bolesnika s KOPB-om (Riise i sur., 1994.). TNF-α stimulira makrofage na lučenje MMP-a, no ovaj mehanizam inhibira IL-10 (Chung i sur., 2001.). Veliko smanjenje tjelesne mase kod bolesnika s težim oblikom KOPB-a povezuje se s apoptozom stanica skeletnih mišića do koje dolazi upravo zbog povećane koncentracije TNF-α u cirkulaciji (Lewis, 2002; Barnes, 2003.).

1.9. ELISA

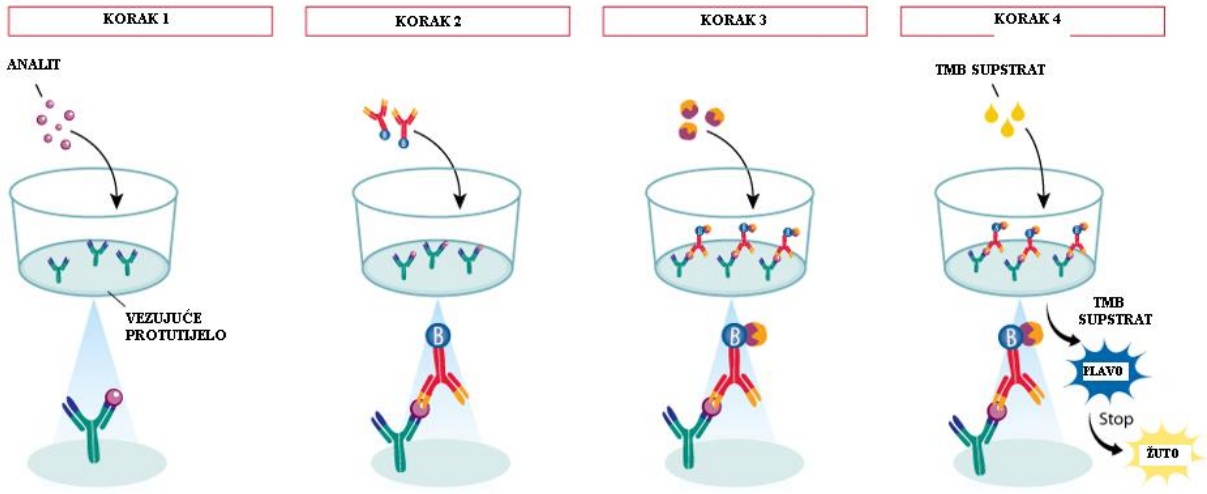
ELISA (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay) je imunokemijska metoda temeljena na specifičnim interakcijama između antigena i protutijela. Koristi se za određivanje koncentracije određenog antigena pomoću protutijela koja mogu biti obilježena s fluorescentnom bojom ili enzimom koji dodatkom supstrata stvara obojeni produkt. Antigeni koje određujemo mogu biti različiti peptidi, proteini, citokini, hormoni, ali i protutijela. Postoji nekoliko vrsta ELISA metode, ovisno o rasporedu vezanja protutijela i antigena. Stoga razlikujemo izravnu, neizravnu, sendvič i kompeticijsku ELISA metodu (https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle).



Slika 4. Različite vrste ELISA metode koje se međusobno razlikuju prema rasporedu vezanja protutijela i antigena. (Izvor: https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle)

1.9.1. Princip sendvič ELISA-e

Sendvič ELISA zahtjeva protutijela koja specifično prepoznaju različite epitope istog antigena. Vezujuće protutijelo (*engl.* capture antibody) koje specifično prepoznaje antigen vezano je na površini polistirenske mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja viška protutijela potrebno je blokirati slobodna vezajuća mjesta na dnu jažica s govođim serumskim albuminom (BSA, *engl.* bovine serum albumin). Potom se dodaju uzorci i standardi pri čemu se prisutni antigen veže na imobilizirano vezujuće protutijelo te se zatim nevezane komponente ispiru. Nakon dodatka detekcijskog protutijela (*engl.* detection antibody) obilježenog s biotinom i njegovog vezanja na antigen te ispiranja nevezanog protutijela, dodaje se streptavidin-peroksidaza iz hrena (HRP, *engl.* horseradish peroxidase) koja se veže na detekcijsko protutijelo. Nakon ispiranja nevezanih komponenti, u jažice mikrotitarske pločice dodaje se tetrametilbenzidin (TMB, *engl.* tetramethylbenzidine) pri čemu se ovaj supstrat prevodi u plavi produkt djelovanjem peroksidaze iz hrena. Plavo obojenje proporcionalno je prisutnoj koncentraciji analita. Daljnji razvoj boje zaustavlja se dodatkom otopine koja zaustavlja reakciju, pri čemu se stvara žuto obojeni produkt čija se apsorbancija određuje pri 450 nm (https://www.rndsystems.com/resources/technical/duoset-elisa-development-systems-assay-principle).



Slika 5. Koraci provedbe sendvič ELISA-e.
(Izvor:https://www.rndsystems.com/resources/technical/duoset-elisa-development-systems-assay-principle).

1.9.2. ELISA kao metoda određivanja citokina

Protutijelo vezano na dnu jažice mikrotitarske pločice odgovorno je za vezanje antigena i imunosnu specifičnost, dok je detekcijsko protutijelo odgovorno za prepoznavanje antigena i umnažanje signala detekcije. Ovakav mehanizam omogućava točnu i osjetljivo prepoznavanje antigena te se zbog toga koristi za određivanje koncentracije citokina. Također, prednost ELISA-e su njeni kvantitativni rezultati koji su reproducibilni. No postoje i ograničenja, jer ova metoda jako ovisi o kvaliteti protutijela, proizvođaču kita, kao i osobi koja izvodi pokus i njenom iskustvu. ELISA-om se ne može istovremeno određivati više citokina iz jednog uzorka, nego samo jedan. Ako uzorci imaju koncentraciju citokina iznad granice linearne ovisnosti koncentracije citokina i izmjerene apsorbancije, potrebno je razrijediti uzorak. No onda se pojavljuje drugi problem: razrijeđenjem se smanjuje koncentracija citokina, ali pri tome se mijenja i koncentracija cirkulirajućih inhibitora ili vezujućih proteina, što može utjecati na dobivene rezultate (Leng i sur., 2008.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

KOPB je učestala bolest koja se može spriječiti i liječiti, a karakterizirana je respiracijskim simptomima i ograničenim protokom zraka. Navedeni simptomi prouzročeni su abnormalnostima dišnih putova i/ili alveolarnim promjenama do kojih dolazi zbog izloženosti stranim česticama ili plinovima. Kronično ograničenje dišnih putova karakterizirano je kombinacijom bolesti malih dišnih putova (primjerice, opstruktivni bronhiolitis) i parenhimskim razaranjem (emfizem). 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 (GOLD, *engl*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2017.).

Brojne upalne stanice i njihovi medijatori uključeni su u upalne procese KOPB-a te je zbog toga cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu izvanstaničnog rhHsp70 proteina te LPS-a (agonista TLR4) i LTA (agonista TLR2) u imunosnom upalnom odgovoru na staničnim modelima KOPB-a te odrediti pri kojim koncentracijama ove molekule uzrokuju statistički značajnu povećanu sintezu pojedinih upalnih citokina. Kao plućni model KOPB-a korištena je stanična linija humanih bronhijalnih epitelnih stanica NCI-H292, a kao sistemski model KOPB-a stanična linija humanih monocitnih stanica THP-1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U provedbi ELISA metode korišten je DuoSet Ancillary Reagent Pack 2 (R&D Systems, kataloški broj #DY008). Sastojci ovog kita mogu se naručiti zasebno, pa je stoga uz naziv svakog sastojka kita naveden njegov zasebni kataloški broj.

3.1.1. Kemikalije

- RPMI medij (Capricorn) - sastav: RPMI 1640 medij + L-glutamin + HEPES; uz dodatak:
  - 1 mM natrijev piruvat (Fluka)
  - 10 % teleći fetalni serum koji je inaktiviran zagrijavanjem (Capricorn)
  - 1 % 100x koncentrirana otopina antimikotika i antibiotika - sastav: 10000 U/mL penicilina + 10 mg/mL streptomicina + 25 µg/mL amfotericina B (Lonza)
- 0,25 % tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- tripansko plavilo (Sigma Aldrich)
- 20 nM forbol 12-miristat-13-acetat (PMA) (Sigma-Aldrich)
- različite koncentracije otopina rekombinantnog humanog rhHsp70 proteina s niskom koncentracijom endotoksina LPS-a (0,27 ng/mL) (Enzo Life Sciences):
  - 0,1 µg/mL
  - 0,3 µg/mL
  - 1 µg/mL
  - 3 µg/mL
  - 10 µg/mL
  - 30 µg/mL
- 0,1 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich)
- 1 µg/mL LTA (Invivogen)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica (R&D Systems, kataloški broj #DY990)
- pokrovne folije (R&D Systems, kataloški broj #DY992)
- fosfatni pufer s dodatkom soli (PBS, *engl.* phosphate-buffered saline) (R&D Systems, kataloški broj #DY006)- sastav:
  - 137 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 8,1 mM Na_2HPO_4

- 1,5 mM KH_2PO_4
- pH 7,2 - 7,4
- filtrirano na 0,2 µm veličinu čestica

- pufer za ispiranje (R&D Systems, kataloški broj #WA126) - sastav:
  - 0,05 % Tween® 20 u PBS-u
  - pH 7,2 - 7,4
- otopina reagensa (*engl.* Reagent Diluent) (R&D Systems, kataloški broj #DY995)- sastav:
  - 1 % BSA u PBS-u
  - pH 7,2-7,4
  - filtrirano na 0,2 µm veličinu čestica
- otopina supstrata (*engl.* Substrate Solution) (R&D Systems, kataloški broj #DY999) - sastav:
  - mješavina (1:1) Color Reagent A (H_2O_2) i Color Reagent B (tetrametilbenzidin)
- otopina za zaustavljanje reakcije (*engl.* Stop Solution) (R&D Systems, kataloški broj #DY994)- sastav:
  - 2 N H_2SO_4
- streptavidin-HRP za IL-6 (R&D Systems, kataloški broj kita #DY206-05, kataloški broj kemikalije #893975)
- streptavidin-HRP za IL-8 (R&D Systems, kataloški broj kita #DY208-05, kataloški broj kemikalije #893975)
- streptavidin-HRP za IL-1β (R&D Systems, kataloški broj kita #DY201-05, kataloški broj kemikalije #893975)
- streptavidin-HRP za IL-1α (R&D Systems, kataloški broj kita #DY200-05, kataloški broj kemikalije #893975)
- streptavidin-HRP za TNF-α (R&D Systems, kataloški broj kita #DY210-05, kataloški broj kemikalije #893975)

3.1.2. Protutijela

- mišje protutijelo protiv ljudskog IL-6 (vezujuće protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY206-05, kataloški broj kemikalije #840113)
- mišje protutijelo protiv ljudskog IL-8 (vezujuće protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY208-05, kataloški broj kemikalije part #890804)

- mišje protutijelo protiv ljudskog IL-1β (vezujuće protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY201-05, kataloški broj kemikalije #840168)
- mišje protutijelo protiv ljudskog IL-1α (vezujuće protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY200-05, kataloški broj kemikalije #840201)
- mišje protutijelo protiv ljudskog TNF-α (vezujuće protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY210-05, kataloški broj kemikalije #840119)
- biotinizirano magarčevo protutijelo protiv ljudskog IL-6 (detekcijsko protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY206-05, kataloški broj kemikalije #840114)
- biotinizirano magarčevo protutijelo protiv ljudskog IL-8 (detekcijsko protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY208-05, kataloški broj kemikalije #890805)
- biotinizirano magarčevo protutijelo protiv ljudskog IL-1β (detekcijsko protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY201-05, kataloški broj kemikalije #840169)
- biotinizirano magarčevo protutijelo protiv ljudskog IL-1α (detekcijsko protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY200-05, kataloški broj kemikalije #840202)
- biotinizirano magarčevo protutijelo protiv ljudskog TNF-α (detekcijsko protutijelo) (R&D Systems, kataloški broj kita #DY210-05, kataloški broj kemikalije #840120)

3.1.3. Standardi

- rekombinantni ljudski IL-6 (R&D Systems, kataloški broj kita #DY206-05, kataloški broj kemikalije #840115)
- rekombinantni ljudski IL-8 (R&D Systems, kataloški broj kita #DY208-05, kataloški broj kemikalije #890806)
- rekombinantni ljudski IL-1β (R&D Systems, kataloški broj kuta #DY201-05, kataloški broj kemikalije #840170)
- rekombinantni ljudski IL-1α (R&D Systems, kataloški broj kita #DY200-05, kataloški broj kemikalije #840203)
- rekombinantni ljudski TNF-α (R&D Systems, kataloški broj #DY210-05, kataloški broj kemikalije #840121)

3.1.4. Stanične linije

- NCI-H292 su bronhijalne epitelne stanice koje adheriraju na podlogu. To su stanice mukoepidermoidnog plućnog karcinoma originalno izolirane iz metastaze u limfnom čvoru 32-godišnje bolesnice.

- THP-1 su stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta. Stanice su u suspenziji i rastu u manjim grudama.

3.1.5. Aparat za detekciju

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

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice su uzgajane u kompletnom RPMI mediju koji se sastojao od RPMI 1640 medija s L-glutaminom i HEPES-om (Capricorn, Njemačka) uz dodatak 1 mM natrijeva piruvata (Fluka), 10 % telećeg fetalnog seruma koji je inaktiviran zagrijavanjem (Capricorn), 1 % 100 x koncentrirane otopine antimikotika i antibiotika koji je sadržavao 10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 µg/mL amfotericina B (Lonza). Prilikom uzgoja stanica potrebni su sljedeći uvjeti inkubatora: temperatura 37 ˚C, vlažnost zraka 95 % i udio CO_2 5%. Prije provođenja postupka uzgoja stanica, potrebno je sve reagense izvaditi iz hladnjaka oko 20-30 minuta prije početka rada kako bi se zagrijali na sobnu temperaturu. Potrebna konfluentnost stanica je 80-90% za adherirajuće stanice, što se kontrolira invertnim mikroskopom, a nakon što bi stanice postigle zadovoljavajuću konfluentnost, potrebno ih je presaditi. Stanice koje rastu u suspenziji razrjeđuju se 1-2 x tjedno.

3.2.2. Nasađivanje stanica za pokus

Nakon uzgoja stanica u bočicama za uzgoj staničnih kultura, stanice se presade na pločice s 12 jažica tako da se u svaku jažicu nasadi 1 x 10^6 stanica.

3.2.2.1. Priprema NCI-H292 stanica

Potrebno je vakuum sisaljkom ukloniti sav medij iznad adheriranih stanica te stanice isprati dva puta otopinom EDTA i potom dodati 0,25 % tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich). Potom se stanična suspenzija inkubira 5 minuta pri 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2 kako bi tripsin odvojio stanice od podloge. Djelovanje tripsina zaustavi se dodatkom kompletnog RPMI medija, a sadržaj se prenese u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi. Vakuum sisaljkom se ukloni nadsloj, a talog stanica resuspendira u 1 mL medija za uzgoj stanica. Stanice se zatim izbroje pomoću tripanskog plavila, razrijede na odgovarajući volumen i nasade na ploče, te se prije pokusa inkubiraju 24 h na 37˚C, u 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.2.2.2. Priprema THP-1 stanica

Stanice se iz boca za uzgoj prenesu u sterilne epruvete i centrifugiraju 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi. Vakuum sisaljkom se ukloni nadsloj, a talog stanica resuspendira u 1 mL medija za uzgoj stanica. Stanice se zatim izbroje pomoću tripanskog plavila, razrijede na

odgovarajući volumen i nasade na ploče uz dodatak 20 nM forbol 12-miristat-13-acetata (PMA) te prije pokusa inkubiraju 48 h na 37˚C, u 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.2.3. Određivanje broja stanica

Stanice resuspendirane u 1 mL medija za uzgoj stanica pomiješaju se s 0,4 %-tnom otopinom tripanskog plavila u omjeru 1:40, 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 x. Tripansko plavilo se koristi za razlikovanje mrtvih i živih stanica. Žive stanice ga izlučuju pomoću membranskih pumpi, tako da žive stanice ostaju neobojene. Mrtve stanice ne mogu izbaciti tripansko plavilo pa se zato unutar njih akumulira te ih vidimo kao obojene stanice.

3.2.4. Tretiranje stanica

NCI-H292 stanice se nakon 24 h, a THP-1 stanice nakon 48 h inkubacije s 20nM PMA, na pločama s 12 jažica tretiraju tijekom 24 sata s rhHsp70, LPS i LTA prema koncentracijama navedenim u Tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije rhHsp70 proteina, LPS-a i LTA kojima se tretiraju NCI-H292 i THP-1 stanice.

0,1 µg/mL rhHsp70
0,3 µg/mL rhHsp70
1 µg/mL rhHsp70
3 µg/mL rhHsp70
10 µg/mL rhHsp70
30 µg/mL rhHsp70
0,1 µg/mL LPS
1 µg/mL LTA

3.2.5. Sendvič ELISA

3.2.5.1. Priprema mikrotitarskih pločica

Potrebno je otopiti liofilizat vezujućeg protutijela u 0,5 mL PBS-a, a zatim ga razrijediti na radnu koncentraciju s PBS-om. U svaku jažicu se stavi 100 µL razrijeđenog vezujućeg protutijela, ploča se prekrije samoljepljivom pokrovnom folijom te se ostavi inkubirati tijekom noći pri sobnoj temperaturi. Sutradan se prvo ukloni sva tekućina koja se nalazi u jažicama, a potom se sve jažice isperu s puferom za ispiranje. Potrebno je tri puta ispirati mikrotitarsku ploču, tako da se u svaku jažicu stavi 400 µL pufera. Naravno, između ispiranja

je potrebno ukloniti prethodno dodani pufer prije dodatka novog volumena pufera za ispiranje. Kod ovog postupka izrazito je bitno dobro ukloniti tekućinu nakon ispiranja kako bi se osigurala kvalitetna provedba pokusa. Nakon svakog ispiranja, a osobito nakon zadnjeg, potrebno je mikrotitarsku pločicu okrenuti i dobro protresti na čistim papirnatim ručnicima kako bi sav višak tekućine izašao iz jažica. Zatim se u svaku jažicu mikrotitarske pločice doda 300 µL otopine reagensa te se inkubira na sobnoj temperaturi minimalno jedan sat. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica se ispere tri puta.

3.2.5.2. Provedba analize

Uzorke i standarde potrebno je otopiti u otopini reagensa te zatim 100 µL staviti u svaku jažicu, prekriti mikrotitarsku pločicu sa samoljepljivom pokrovnom folijom i inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu stavi 100 µL detekcijskog protutijela koje se prije toga razrijedi u otopini reagensa. Mikrotitarsku pločicu je potrebno prekriti samoljepljivom pokrovnom folijom i inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica se ispere tri puta. Zatim se u svaku jažicu stavi 100 µL radne otopine streptavidin– HRP, mikrotitarska pločica se prekrije samoljepljivom pokrovnom folijom i ostavi inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu stavi 100 µL supstratne otopine, inkubira 20 minuta pri sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti. Nakon inkubacije, u svaku jažicu se doda 50 µL otopine za zaustavljanje enzimske reakcije te se lagano protrese mikrotitarska pločica kako bi se sastojci svih jažica dobro pomiješali. Apsorpciju jažica mikrotitarske pločice odredimo pomoću optičkog čitača mikrotitarskih pločica. Prvo se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 450 nm, a potom na 570 (ili 540 nm) kako bi zbog optičkih nesavršenosti mikrotitarskih pločica korigirali apsorbanciju dobivenu pri 450 nm i time dobili preciznije rezultate.

3.2.1. Statistička obrada rezultata

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

značajne razlike uzeta je vrijednosti $P<0,05$, gdje P označava koeficijent povezanosti dvije nekontinuirane varijable.

4. REZULTATI I RASPRAVA

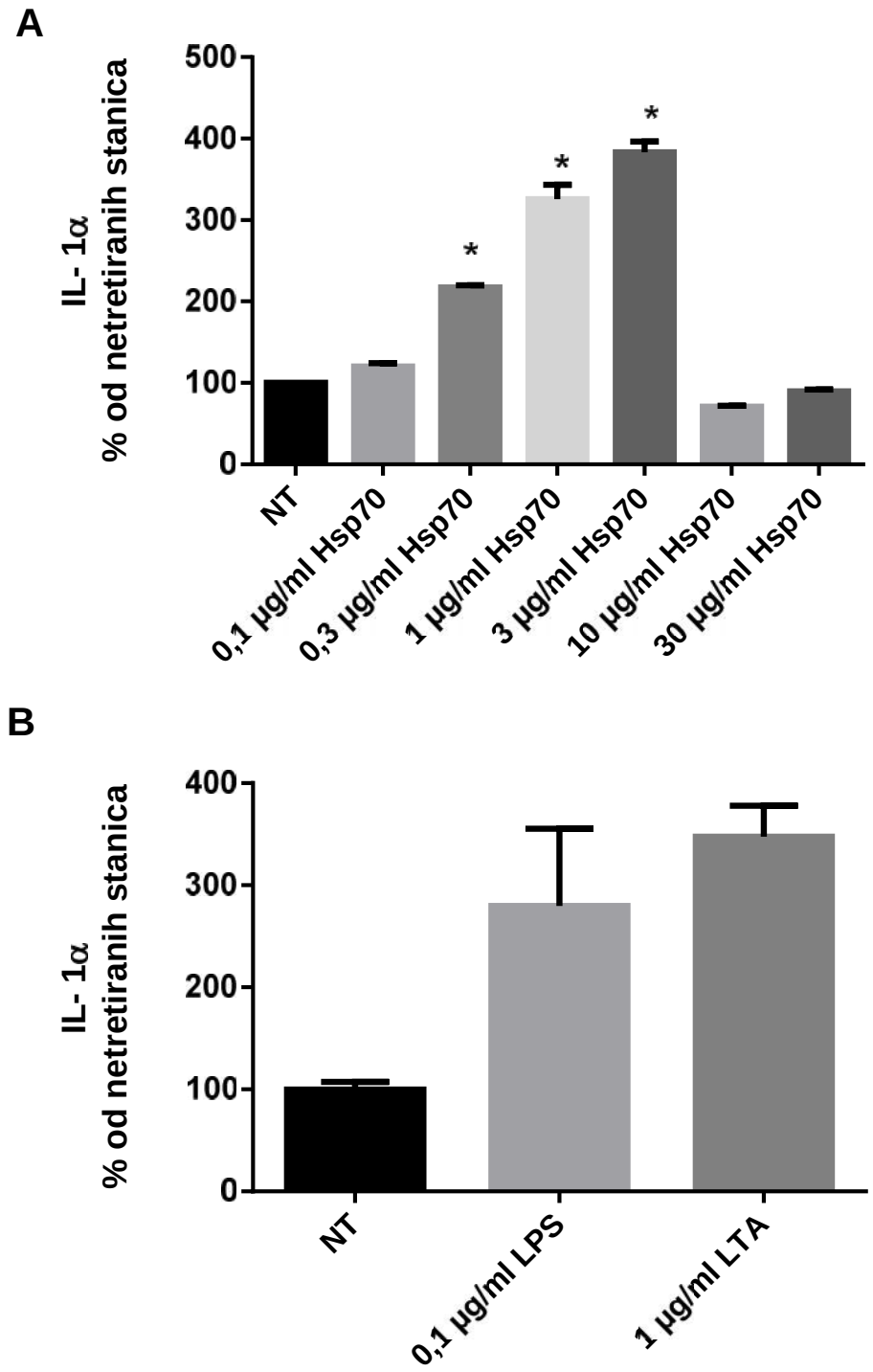
4.1. Rezultati

Nakon 24-satnog tretiranja NCI-H292 i THP-1 stanica s različitim koncentracijama rhHsp70 proteina (0,1, 0,3, 1, 3, 10 i 30 µg/mL) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA, sendvič ELISA-om izmjerena je koncentracija citokina koja je izlučena u stanični medij nakon vezanja ovih agonista na TLR2 i TLR4 receptore. Pri tome su određivani citokini za koje se smatra da imaju najveću ulogu u imunosnom odgovoru KOPB-a: IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6 i IL-8. Kod obje vrste stanica određivani su svi navedeni citokini, ali vrijednosti nekih citokina su bile ispod granice detekcije.

4.1.1. NCI-H292 stanice

Određivanjem citokina IL-1α nakon inkubacije NCI-H292 stanica s najmanjom primjenjenom koncentracijom rhHsp70 proteina (0,1 µg/mL) nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice (P=0,5120). Statistički značajna razlika nije uočena niti kod koncentracija 10 i 30 µg/mL rhHsp70 proteina (P=0,1900 i P=0,9521). Za razliku od toga, pri koncentracijama 0,3, 1 i 3 µg/mL rhHsp70 proteina oslobođa se količina IL-1α koja je statistička značajno različita u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001).

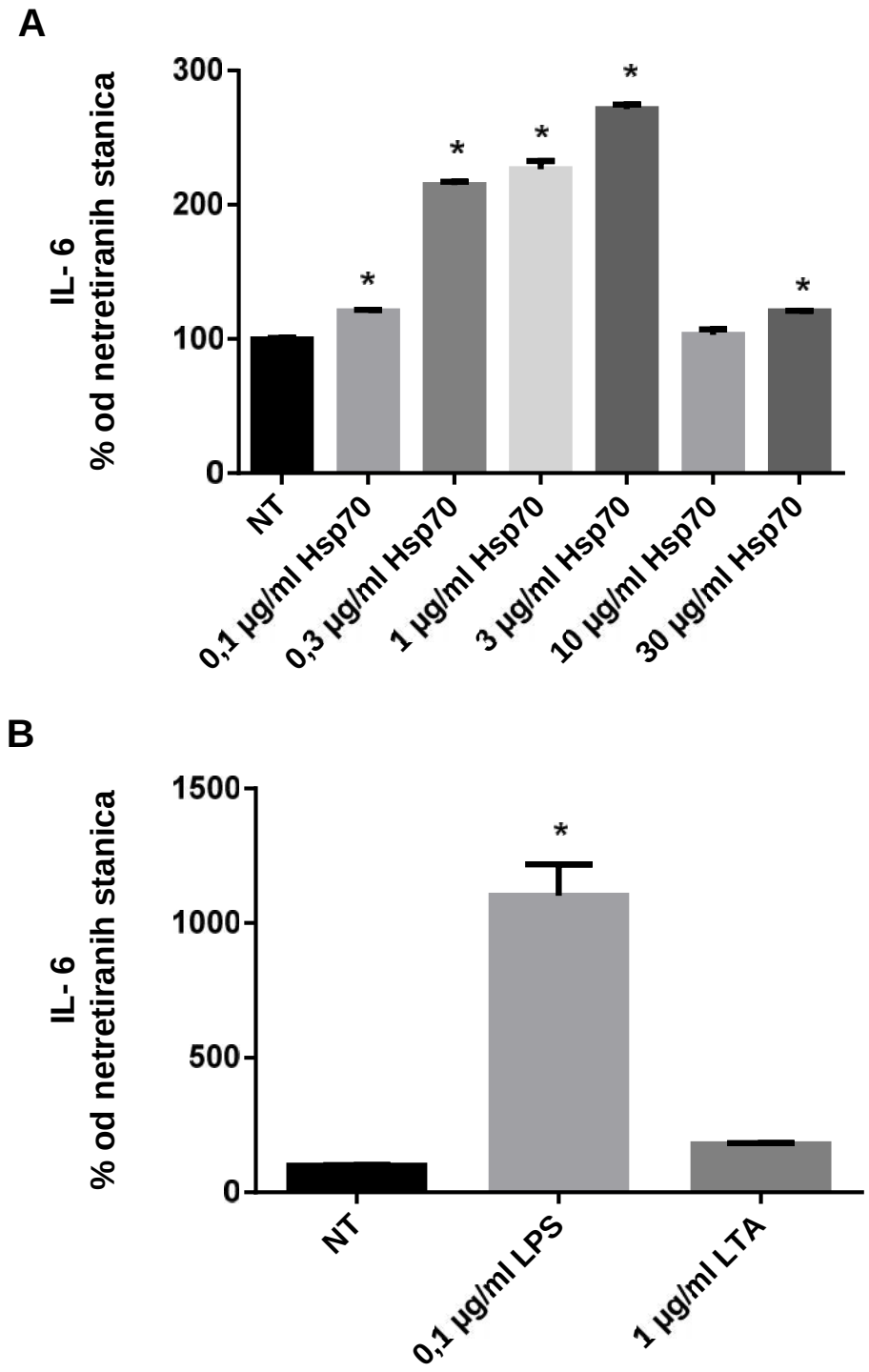
Rezultati statističke obrade pokazali su da se vrijednosti IL-1α određene nakon tretiranja NCI-H292 stanica s 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na netretirane stanice (P=0,1326 i P=0,0617).



Slika 6. Izlučivanje IL-1α iz NCI-H292 stanica pod utjecajem različitih koncentracija rhHsp70 (A) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (B). NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Rezultati dobiveni određivanjem citokina IL-6 pokazuju da se stimulacijom NCI-H292 stanica s različitim koncentracijama rhHsp70 proteina oslobađa koncentracija ovog citokina koja pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na koncentraciju IL-6 koju sintetiziraju netretirane stanice. Statistički najznačajnija razlika zapažena je primjenom 0,3, 1 i 3 µg/mL rhHsp70 proteina ($P<0,0001$), dok je ta razlika manje izražena kod koncentracija 0,1 i 30 µg/mL rhHsp70 proteina ($P=0,0079$ i $P=0,0077$). Ipak, statistički značajna razlika nije uočena primjenom 10 µg/mL rhHsp70 proteina ($P=0,9727$).

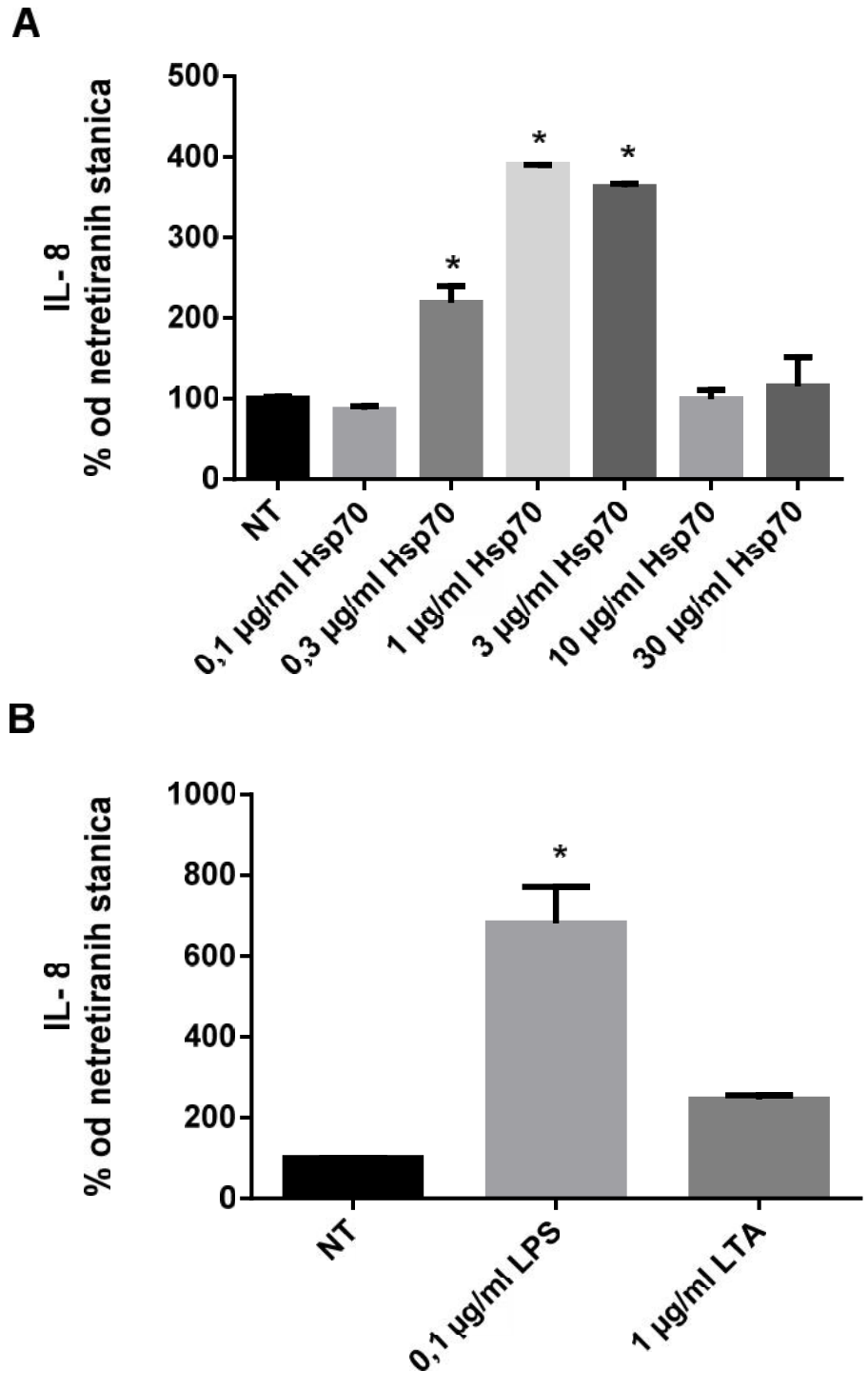
Statistički značajna razlika uočena je usporedbom koncentracije IL-6 koji se izlučio iz NCI-H292 stanica nakon 24-satnog tretiranja s 0,1 µg/mL LPS-a i netretiranih stanica ($P=0,0036$). No ova statistička značajnost nije utvrđena kod NCI-H292 stanica koje su tretirane s 1 µg/mL LTA ($P=0,7206$).



Slika 7. Izlučivanje IL-6 iz NCI-H292 stanica pod utjecajem različitih koncentracija rhHsp70 (A) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (B). NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Rezultati statističke obrade dobivenih vrijednosti citokina IL-8 pokazuju kako nema statistički značajne razlike u odnosu na vrijednosti netretiranih stanica nakon tretiranja NCI-H292 stanica s 0,1, 10 i 30 µg/mL rhHsp70 proteina (P=0,9644, P>0,9999 i P=0,9504). Ipak, statistički značajna razlika uočena je primjenom 1 i 3 µg/mL rhHsp70 proteina (P<0,001), kao i primjenom 0,3 µg/mL rhHsp70 proteina (P=0,0011).

Tretiranjem NCI-H292 stanica s 0,1 µg/mL LPS-a oslobađa se veća količina IL-8 nego kod netretiranih stanica, te je ta razlika statistički značajna (P=0,0085). Nasuprot tome, primjenom 1 µg/mL LTA oslobođena količina IL-8 ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na količinu IL-8 oslobođenu iz netretiranih stanica (P=0,2670).



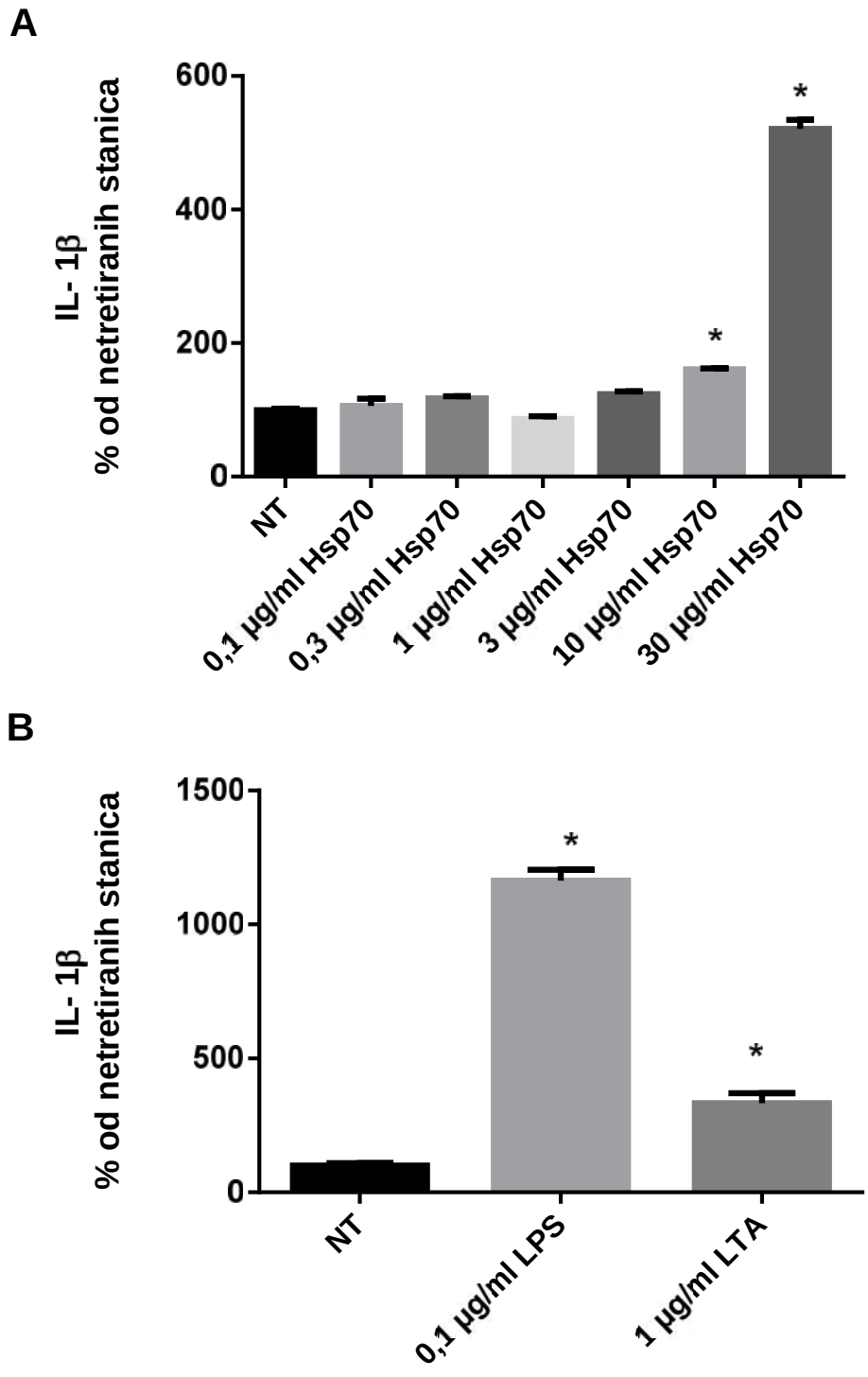
Slika 8. Izlučivanje IL-8 iz NCI-H292 stanica pod utjecajem različitih koncentracija rhHsp70 (A) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (B). NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Osim IL-1α, IL-6 i IL-8, određivale su se i koncentracije citokina TNF-α i IL-1β kod NCI-H292 stanice tretiranih s različitim koncentracijama rhHsp70 proteina te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA, ali njihove vrijednosti su bile ispod donje granice detekcije primjenjene ELISA metode.

4.1.2. THP-1 stanice

Koncentracija IL-1β oslobođenog iz THP-1 stanica tretiranih s 0,1, 0,3, 1 i 3 µg/mL rhHsp70 proteina nije se statistički razlikovala u odnosu na kontrolne stanice (P=0,9486; P=0,2272; P=0,4898 i P=0,0662). Ipak, statistički značajna razlika uočena je pri višim koncentracijama rhHsp70 proteina: 10 µg/mL (P=0,0003) i 30 µg/mL (P<0,0001).

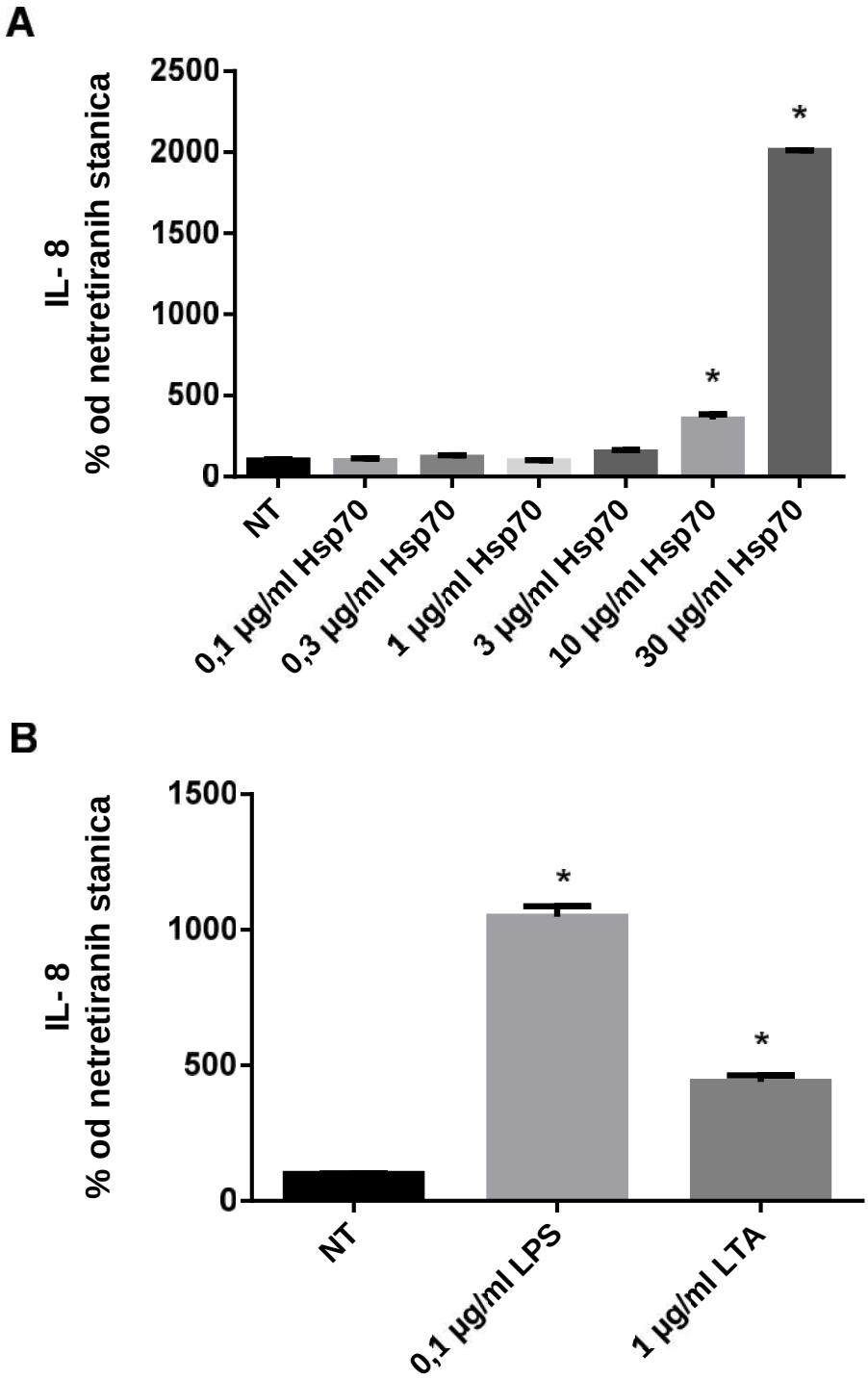
Stanice su tretirane i s 0,1 µg/mL LPS-om i 1 µg/mL LTA. Tretiranjem THP-1 stanica s LPS-om oslobađa se puno veća koncentracija IL-1β nego kod netretiranih THP-1 stanica te je ova razlika statistički značajna (P=0,0002), a nešto manja statistički značajna razlika zamjećuje se primjenom LTA (P=0,0211).



Slika 9. Izlučivanje IL-1β iz THP-1 stanica pod utjecajem različitih koncentracija rhHsp70 (A) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (B). NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Određivanjem IL-8 uočeno je da niske koncentracije rhHsp70 proteina ne dovode do statistički značajnog izlučivanja ovog citokina: 0,1 µg/mL (P>0,9999), 0,3 µg/mL (P=0,8903), 1 µg/mL (P=0,9999) i 3 µg/mL (P=0,0943). S druge strane, tretiranjem THP-1 stanica s višim koncentracijama rhHsp70 proteina sintetizira se statistički značajna količina IL-8 u odnosu na netretirane THP-1 stanice: 10 i 30 µg/mL rhHsp70 (P<0,0001).

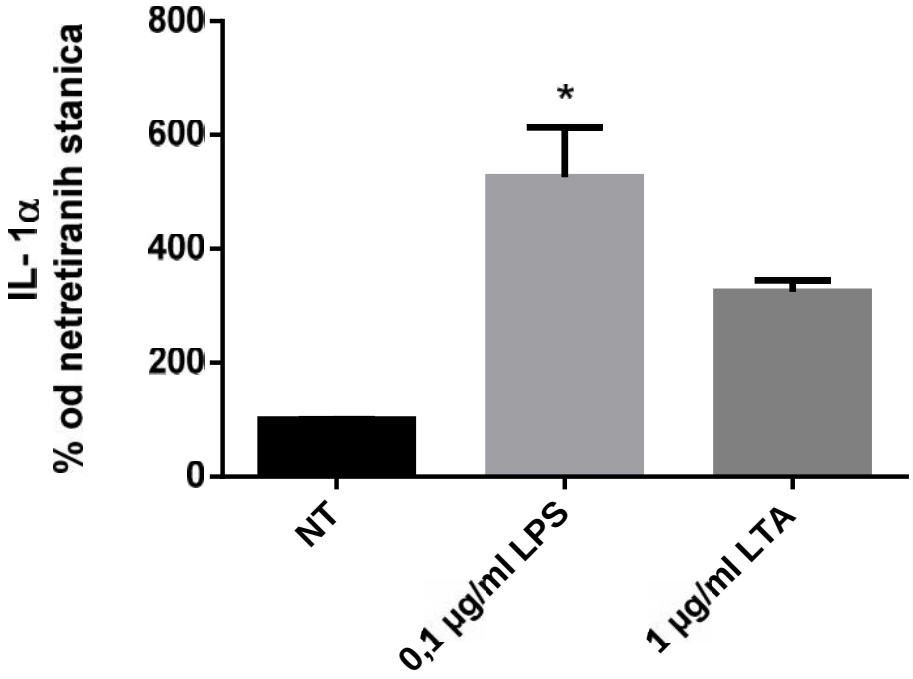
Statistički značajne razlike uočene su usporedbom koncentracije citokina IL-8 sintetiziranog kod netretiranih THP-1 stanica i koncentracije IL-8 kod THP-1 stanica tretiranih s LPS-om (P=0,0002) i LTA (P=0,0041).



Slika 10. Izlučivanje IL-8 iz THP-1 stanica pod utjecajem različitih koncentracija rhHsp70 (A) te 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA (B). NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Koncentracija IL-1α izlučena iz THP-1 stanica tretiranih s rhHsp70 proteinom bila je ispod donje granice detekcije primjenjene ELISA metode.

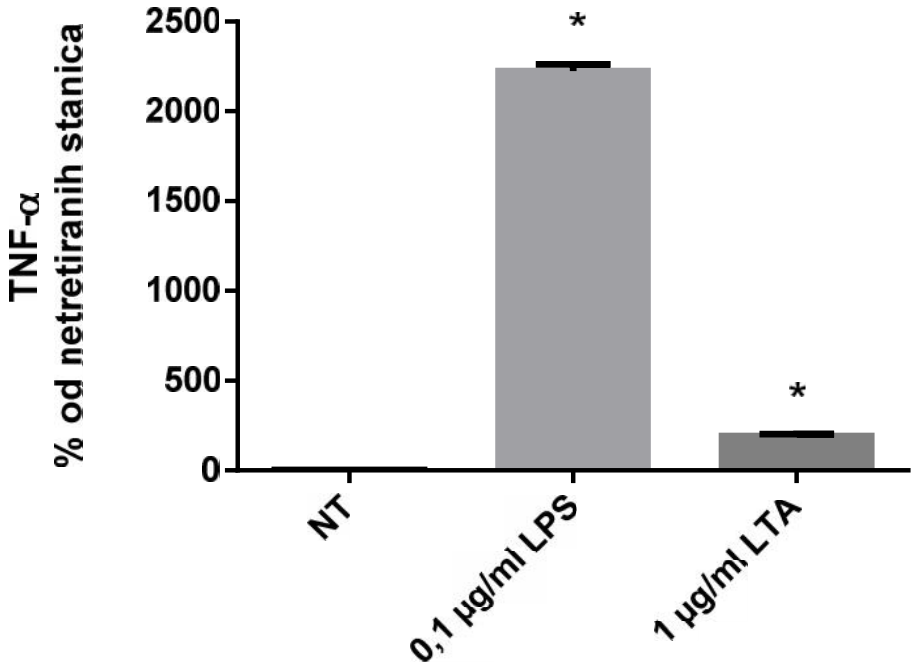
LPS je inducirao statistički značajno izlučivanje IL-1α u odnosu na netretirane stanice (P=0,0196), dok ta razlika nije statistički značajna kod THP-1 stanica tretiranih s 1 µg/mL LTA (P=0,1042).



Slika 11. Izlučivanje IL-1α iz THP-1 stanica pod utjecajem 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA. NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P<0,05 (*).

Koncentracija TNF-α u netretiranim THP-1 stanicama bila je ispod granice detekcije primjenjene ELISA metode, stoga je kao vrijednost koncentracije citokina izlučenih iz njih korištena polovica vrijednosti najnižeg standarda: 3,91 pg/mL.

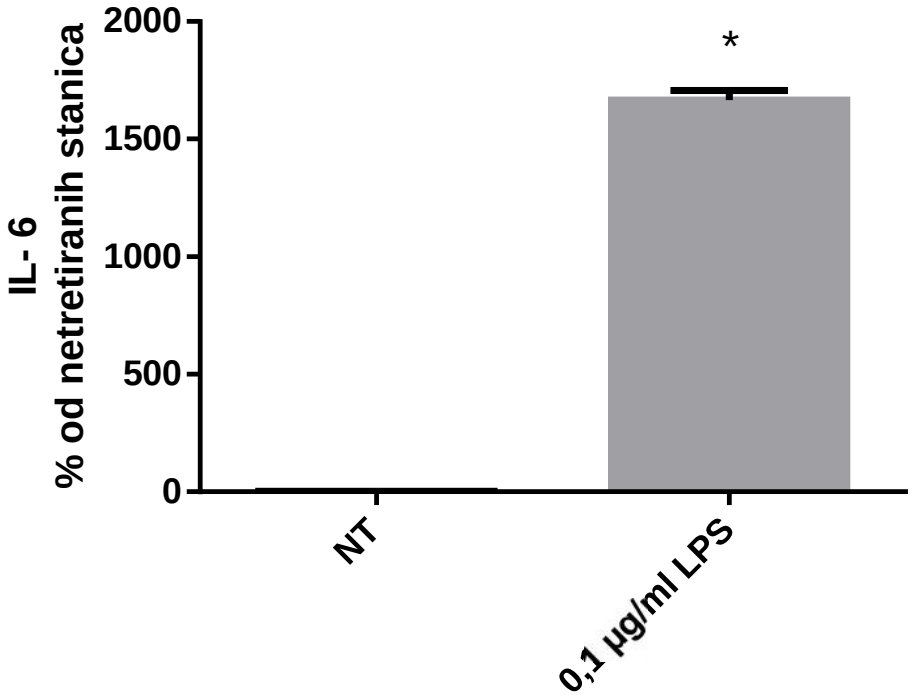
Koncentracija TNF-α izlučena iz THP-1 stanica tretiranih s rhHsp70 proteinom bila je ispod donje detekcijske granice, a njegova koncentracija kod stanica tretiranih s LPS-om se statistički značajno razlikuje u odnosu na koncentraciju TNF-α kod kontrolnih stanica ($P<0,0001$). Manja, ali također statistički značajna razlika, zamijećena je i kod THP-1 stanica tretiranih s LTA ($P=0,0179$).



Slika 12. Izlučivanje TNF-α iz THP-1 stanica pod utjecajem 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA. NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*).

Koncentracija IL-6 u netretiranim THP-1 stanicama bila je ispod granice detekcije primjenjene ELISA metode, stoga je kao vrijednost koncentracije citokina izlučenih iz njih korištena polovica vrijednosti najnižeg standarda: 2,35 pg/mL.

Pošto su vrijednosti IL-6 kod THP-1 stanica tretiranih s LTA i rhHsp70 proteinom, bile ispod donje granice detekcije primjenjene metode, u statističkoj obradi rezultata THP-1 stanica tretiranih s LPS-om korišten je nespareni t-test umjesto ANOVA testa. Dobiveni rezultati pokazuju kako postoji statistički značajna razlika između koncentracije IL-6 određene kod THP-1 stanica tretiranih s LPS-om i netretiranih THP-1 stanica (P=0,0006).



Slika 13. Izlučivanje IL-6 iz THP-1 stanica pod utjecajem 0,1 µg/mL LPS-a. NT= netretirane (kontrolne) stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P<0,05 (*).

4.2. Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu izvanstaničnog rhHsp70 proteina te LPS-a i LTA u imunosnom upalnom odgovoru kod NCI-H292 i THP-1 staničnih linija te pri kojim koncentracijama rhHsp70 protein, LPS i LTA uzrokuju statistički značajno povećano izlučivanje pojedinih upalnih citokina. Kao plućni model KOPB-a korištena je stanična linija humanih bronhijalnih epitelnih stanica NCI-H292, a kao sistemski model KOPB-a stanična linija humanih monocitnih stanica THP-1.

Povišene koncentracije IL-1β IL-6, IL-8 i TNF-α pronađene su u sputumu bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB-a (Keatings i sur., 1996.). Uz to, zapaženo je povećano otpuštanje upalnih citokina IL-8, IL-1 i TNF-α, kao i protu-upalnog citokina IL-10, iz alveolarnih makrofaga pušača i bolesnika s KOPB-om (Lim i sur., 2000.). Upravo stoga je u ovom isptraživanju određivana koncentracija citokina za koje se smatra da imaju naznačajniju ulogu u upalnom procesu KOPB-a: IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α.

Izvanstanični Hsp70 je DAMP molekula koja aktivira monocite i makrofage na način da se veže na TLR2 i TLR4 receptore te uzrokuje sintezu upalnih citokina (Thériault i sur., 2005.; Ferat-Osorio i sur., 2014.). Naše istraživanje je pokazalo da rhHsp70 kod NCI-H292 stanica potiče izlučivanje IL-1α, IL-6 i IL-8. S druge strane, kod THP-1 stanica potiče izlučivanje IL-1β i IL-8, ali ne i IL-1α, IL-6 niti TNF-α. Ovi rezultati se slažu s istraživanjem Ferat-Osorio i suradnika koji su dokazali čak sniženu ekspresiju gena za TNF-α nakon tretmana s Hsp70 proteinom, iako pri tom nisu koristili THP-1 staničnu liniju, već primarne monocite (Ferat-Osorio i sur., 2014.).

Osim Hsp70 proteina, TLR2 i TLR4 receptori se mogu aktivirati bakterijskim komponentama LPS-om (veže se na TLR4) i LTA (veže se na TLR2). Nakon prepoznavanja LPS-a, TLR4 se oligomeriza i potiče se signalna kaskada koja obuhvaća signalni put ovisan ili neovisan o MyD88 adaptacijskom proteinu te kao posljedica toga dolazi do sinteze upalnih citokina i interferona (Yong-Chen i sur., 2008.). Aktivacija TLR2 i TLR4 receptora pokreće NF-κB i MAPK signalne putove te rezultira stvaranjem TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 i IL-10 (Hutchison i sur., 2000.; Dokladny i sur., 2010.; Vinokurov i sur., 2012.). Istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu potvrđuje navedena opažanja, jer dobiveni rezultati pokazuju da THP-1 stanice tretirane s LPS-om ili LTA izlučuju povećanu količinu svih ispitivanih citokina (IL-

1α, IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α). Pri tome je uočeno kako LPS ima izraženiji učinak na THP-1 stanice od LTA.

Naše istraživanje je također pokazalo da tretiranje NCI-H292 stanica s LPS-om uzrokuje povećano izlučivanje IL-6 i IL-8, te da LPS uzrokuje snažnije izlučivanje IL-6 i IL-8 od LTA. Ovi rezultati se slažu s nekoliko objavljenih znanstvenih članaka. Primjerice, Hutchison i sur. su dokazali da LPS koji potječe iz različitih Gram – negativnih bakterija uzrokuje povećano izlučivanje upalnih citokina (Hutchison i sur., 2000.). Uz to su i neki drugi autori zamijetili da LPS uzrokuje povećano izlučivanje citokina IL-6 i IL-8 iz NCI-H292 stanica tretiranih s LPS-om (Fan i sur., 2016.).

5. ZAKLJUČCI

- NCI-H292 stanice izlučuju povećane koncentracije IL-1α i IL-8 nakon tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70. Povećanje koncentracije IL-1α nije uočeno tretiranjem stanica s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA, dok je koncentracija IL-8 povećana nakon tretiranja s 0,1 μg/mL LPS-a, ali ne i nakon primjene 1 μg/mL LTA.

- NCI-H292 stanice izlučuju povećanu koncentraciju IL-6 nakon tretiranja s 0,1, 0,3, 1, 3 i 30 μg/mL rhHsp70. 1 μg/mL LTA ne uzrokuje povećano izlučivanje IL-6, za razliku od 0,1 μg/mL LPS-a.

- Koncentracija IL-1β i TNF-α izlučena iz NCI-H292 stanica tretiranih s različitim koncentracijama rhHsp70 te 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA je ispod donje granice detekcije primjenje ELISA metode.

- Povećano je izlučivanje IL-1β i IL-8 iz THP-1 stanica tretiranih s 10 i 30 μg/mL rhHsp70, kao i THP-1 stanica tretiranih s 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA.

- Koncentracija IL-1α izlučena iz THP-1 stanica tretiranih s različitim koncentracijama rhHsp70 je ispod donje granice detekcije primjenje ELISA metode. THP-1 stanice tretirane s 0,1 μg/mL LPS-a izlučuju povećanu koncentraciju IL-1α, ali 1 μg/mL LTA ne uzrokuje povećanje koncentracije IL-1α.

- 0,1 μg/mL LPS-a i 1 μg/mL LTA uzrokuju povećano izlučivanje TNF-α iz tretiranih THP-1 stanica, dok je koncentracija TNF-α kod THP-1 stanica tretiranih s rhHsp70 ispod donje granice detekcije primjenjene ELISA-e.

- rhHsp70 i LTA ne uzrokuju povećano izlučivanje IL-6 iz THP-1 stanica, a 0,1 μg/mL LPS-a dovodi do povećanja koncentracije IL-6 kod tretiranih THP-1 stanica.

6. LITERATURA

1. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol,* 2004, 4, 499-511.
2. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA i sur. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med,* 2000, 6, 435-42.
3. Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for treatment of chronic airway diseases. *Cyto G Fact Rev*, 2003, 14, 511-522.
4. Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41, 631-638.
5. Bhardwaj N, Dormer J, Ahmad F, Strickland AD, Gravante G, Beckingham I. Heat shock protein 70 expression following hepatic radiofrequency ablation is affected by adjacent vasculature. *J Surg Res*, 2012, 173(2), 249-57.
6. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function shanges in COPD exacerbations. *Thorax,* 2000, 55, 114-120.
7. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of HSP70. *Fr Immunol,* 2012, 3, 95.
8. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med,* 2003, 97, 1299-1302.
9. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition int he treatment od COPD. *Int Jour of COPD,* 2014, 9, 397-412.
10. Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MKB, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin Science,* 2005, 109, 125-133.
11. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J,* 2001, 18, 50-59.
12. 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.
13. Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, Moseley PL. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF-κB. *Cell Stress Chap*, 2010, 15, 153–163.

14. Dubar V, Gosset P, Aerts C, Voisin C, Wallaert B, Tonnel AB. *In vitro* acute effects of tobacco smoke on tumor necrosis factor-α and interleukin-6 prodution by alveolar macrophages. *Exp Lung Res,* 1993, 19, 345-359.
15. DuoSet ELISA Development Systems Assay Principle, 2017., https://www.rndsystems.com/resources/technical/duoset-elisa-development-systems-assay-principle, pristupljeno 5.4.2017.
16. ELISA kits, ELISA principle- immunoassays, 2015., https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle, pristupljeno 5.4.2017.
17. Fan XY, Chen B, Lu ZS, Jiang ZF, Zhang SQ. Poly-1-arginine acts synergistically with LPS to promote the release of IL-6 and IL-8 via p38/ERK signaling pathways in NCI-H292 cells, inflammation. *Inflamm,* 2016, 39, 47-53.
18. Ferat-Osorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, Bosco-Garate I, Wong-Baeza I, Pastelin-Palacios R, Pedraza-Alva G, Bonifaz LC, Cortes-Reynosa P, Perez-Salazar E, Arriaga-Pizano L, Lopez-Macias C, Rosenstein Y, Isibasi A. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. *J Inflamm,* 2014, 11-19.
19. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (Updated 2017.). 2017, www.goldcopd.org, pristupljeno 5.4.2017.
20. Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aginer C, Lichtenauer M. 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.
21. Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JRW. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27, 73–77.
22. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leuk Biol,* 2006, 79, 425-34.
23. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Fr Immunol,* 2014, 5, 461.
24. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Resp Crit Care Med,* 1996, 153, 530-534.

25. Landis SH, Muellerova H, Mannino DM. Continuing to Confront COPD International Patient Survey: methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012-2013. *Int J Chr Obs Pulmon Dis,* 2014, 9, 597-611.
26. Lange P, Celli B, Agusti A. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obrustive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*, 2015, 373(2), 111-22.
27. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol*, 2008, 63, 879–884.
28. Lewis MI. Apoptosis as a potential mechanism of muscle cachexia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med,* 2002, 166, 434-436.
29. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162, 1355-1360.
30. Lim WK, Kanelakis KC, Neubig RR. Regulation of G protein signaling by the 70 kDa heat shock protein. *Cell Signal*, 2013, 25(2), 389-96.
31. Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing oft he lung in COPD: new concepts. *Thorax*, 2015, 70(5), 482-9.
32. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennars DI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155, 1770-1776.
33. Oliviera-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Fr Immunol*, 2012, 3, 79.
34. 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.
35. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Med Inflamm*, 2010, 2010, 672395.
36. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 2003, 362, 469-476.
37. 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. *Muc Immun*, 2014, *7*(2), 215-226.
38. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*, 2009, 374(9691), 733-43.

39. 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.
40. 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(9589), 758-64.
41. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005, 365(9478), 2225-36.
42. Takeda K, Akira S. Toll-like receptor in innate immunity. *Int Immun*, 2005, 1, 1-14.
43. Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER. The lung health study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation. The Lung Health Study Research Group. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145(2 Pt 1), 301-10.
44. Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*, 2005, 579, 1951-1960.
45. 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.
46. Vinokurov M, Ostrov V, Yurinskaya M, Garbuz D, Murashev A, Antonova O, Evgen'ev M. Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal levels. *Cell Stress Chap*, 2012, 17, 89–101.
47. Vlegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J*, 2007, 30, 993-1013.
48. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of α_1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B_4 and interleukin 8. *Thorax*, 2002, 57, 709-714.
49. Yong-Chen L, Wen-Chen Y, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 2008, 42, 145-151.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je bolest karakterizirana nedostatnim protokom zraka kroz pluća pri čemu je više otežan izdisaj nego udisaj te je produljena ekspiracijska faza respiracije. U patogenezi KOPB-a bitnu ulogu imaju oksidacijski stres i upalni procesi, jer do opstrukcije dišnih putova dolazi zbog kronične upale dišnih putova i razaranja parenhima čime se gubi alveolarna povezanost i elastičnost pluća. Glavni simptomi koji ukazuju da bolesnik boluje od KOPB-a su: dispneja, kronični kašalj i kronično stvaranje sputuma, prisutnost KOPB-a kod drugih članova obitelji te izlaganje rizičnim čimbenicima, odnosno štetnim česticama među kojima se smatra da cigaretni dim ima najveću ulogu.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu izvanstaničnog rhHsp70 proteina te LPS-a i LTA u imunosnom i upalnom odgovoru kod NCI-H292 i THP-1 staničnih linija te pri kojim koncentracijama rhHsp70 protein uzrokuje statistički značajno povećano izlučivanje upalnih citokina IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α. Istraživanje je pokazalo da kod NCI-H292 stanica 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70 stimulira izlučivanje IL-1α i IL-8, dok 0,1, 0,3, 1, 3 i 30 μg/mL rhHsp70 potiče otpuštanje IL-6. Osim toga, dokazano je kako tretiranje NCI-H292 stanica s LPS-om uzrokuje povećano izlučivanje IL-6 i IL-8, te da LPS uzrokuje snažnije izlučivanje IL-6 i IL-8 nego LTA. S druge strane, kod THP-1 stanica 10 i 30 μg/mL rhHsp70 uzrokuje povećanu koncentraciju IL-1β i IL-8, ali ne i IL-1α, IL-6 niti TNF-α. Također, dobiveni rezultati pokazuju da THP-1 stanice tretirane s LPS-om ili LTA izlučuju povećanu količinu svih ispitivanih citokina. Pri tome je uočeno kako LPS ima izraženiji učinak od LTA i na THP-1 stanice.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by insufficient flow of air through the lungs wherein the exhalation is more difficult than the inhalation, and the expiratory phase of respiration is prolonged. In the pathogenesis of COPD, oxidative stress and inflammatory processes have an essential role due to chronic inflammation of the airways and destruction of parenchyma which leads to lost of alveolar connectivity and lung elasticity. The main symptoms of the patients suffering from COPD are dyspnea, chronic cough and chronic sputum production, the presence of COPD at the other family members and exposure to risk factors or harmful particles among which cigarette smoke plays a major role.

The aim of this study was to investigate the role of extracellular rhHsp70 protein, LPS and LTA in the immune and inflammatory responses of NCI-H292 and THP-1 cell lines, and to find out which concentrations of rhHsp70 protein cause statistically significant increased secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α. Research showed that in NCI-H292 cells 0.3, 1 and 3 μg/mL rhHsp70 stimulates the secretion of IL-1α and IL-8, while 0.1, 0.3, 1, 3 and 30 μg/mL rhHsp70 provokes release of IL-6. Besides, our results have demonstrated increased release of IL-6 and IL-8 from NCI-H292 cells treated with LPS, and this secretion was stronger if compared with LTA treatment. On the other hand, in THP-1 cell line 10 and 30 μg/mL rhHsp70 caused increased concentrations of IL-1β and IL-8 in cell supernatants, but not of IL-1α, IL-6 or TNF-α. Also, the results showed that THP-1 cells treated with LPS or LTA release increased levels of all measured cytokines. Once again, LPS was stronger inducer of cytokines secretion than LTA.

8. PRILOZI

8.1. Kratice

AATD	deficijencija alfa-1 antitripsina (*engl.* alpha-1 antitrypsin deficiency)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (*engl.* One Way Analysis of Variance)
BSA	goveđi serumski albumin (*engl.* bovine serum albumin)
CLR	lektinski receptor tipa C (*engl*. C-type lectin receptor)
CRP	C-reaktivni protein (*engl.* C-reactive protein)
DAMP	molekulska struktura nastala oštećenjem (*engl.* damage-associated molecular pattern)
DCs	dendritične stanice (*engl*. dendritic cells)
ELISA	enzimimunokemijska metoda (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay)
ERK1/2	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima 1/2 (*engl*. extracellular signal-regulated kinase 1/2)
GOLD	Svjetska inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (*engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
H_2O_2	vodikov peroksid
H_2SO_4	sulfatna kiselina
HRP	peroksidaza iz hrena (*engl.* horseradish peroxidase)
Hsp	protein toplinskog šoka (*engl.* heat shock protein)
IFN	interferon (*engl.* interferon)
IKK	inhibitor NF-κB kinaze (*engl.* inhibitor of NF-κB kinase)
IL	interleukin
IL-1R1	receptor 1 za IL-1 (*engl*. IL-1 receptor 1)
IRAK	kinaza povezana s receptorom za IL-1 (*engl.* IL-1R associated kinase)
IRF3	čimbenik 3 regulacije interferona (*engl*. interferon regulatory factor 3)
JNK	kinaza koja fosforilira N-kraj transkripcijskog čimbenika c-Jun (*engl*. c-Jun N-terminal kinase)
KCl	kalijev klorid
KH_2PO_4	kalijev hidrogen fosfat
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LBP	protein koji veže LPS (*engl.* LPS binding protein)
LPS	lipopolisaharid (*engl*. lipopolysaccharide)
LRR	ponavljajući slijed bogat leucinom (engl. leucine-rich repeat)

LTA	lipoteikoična kiselina (*engl*. lipoteichoic acid)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (*engl.* mitogen-activated protein kinase)
MAPKKK	kinaza koja aktivira kinazu protein-kinaze aktivirane mitogenom (*engl*. mitogen-activated protein kinase kinase kinase)
MMP	metaloproteinaza matriksa (*engl.* matrix metalloproteinase)
MyD88	čimbenik mijeloidne diferencijacije 88 (*engl.* myeloid differentiation factor 88)
Na_2HPO_4	natrijev hidrogen fosfat
NaCl	natrijev klorid
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (*engl.* nuclear factor κB)
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (*engl*. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
PAMP	molekulska struktura različitih mikroorganizama (*engl*. pathogen-associated molecular pattern)
PBS	fosfatni pufer s dodatkom soli (*engl.* phosphate-buffered saline)
PMA	forbol 12-miristat-13-acetat
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture (*engl.* pattern recognition receptor)
RAGE	receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije (*engl*. receptor for advanced glycation end-products)
RIG-1R	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (*engl*. retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor)
RIP-1	kinaza 1 koja je u interakciji s receptorom (*engl.* receptor-interacting protein kinase 1)
TAB	protein koji veže TAK1 (*engl.* TAK1-binding protein)
TAK1	kinaza 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (*engl.* transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1)
TANK	aktivator NF-κB-a povezan s TRAF-om (*engl.* TRAF-associated NF-κB activator)
TBK1	kinaza 1 vezana na TANK (*engl*. TANK binding kinase 1)
TIR	domena homologna kod Toll i IL-1 receptora (*engl*. Toll/interleukin-1 receptor homology domain)
TLR	receptor sličan Toll receptoru *Drosophila* vrste (*engl.* Toll-like receptor)
TMB	tetrametilbenzidin (*engl.* tetramethylbenzidine)

TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (*engl.* tumor necrosis factor)
TRAF	čimbenik povezan s receptorom za TNF (*engl.* TNF receptor-associated factor)
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (*engl.* TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β)
TSLP	timusni stromalni limfopoetin (*engl.* thymic stromal lymphopoietin)

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

ODREĐIVANJE UPALNIH CITOKINA IZLUČENIH IZ THP-1 I NCI-H292 STANICA NAKON TRETIRANJA IZVANSTANIČNIM Hsp70 PROTEINOM

Ana Dojder

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je bolest karakterizirana nedostatnim protokom zraka kroz pluća pri čemu je više otežan izdisaj nego udisaj te je produljena ekspiracijska faza respiracije. U patogenezi KOPB-a bitnu ulogu imaju oksidacijski stres i upalni procesi, jer do opstrukcije dišnih putova dolazi zbog kronične upale dišnih putova i razaranja parenhima čime se gubi alveolarna povezanost i elastičnost pluća. Glavni simptomi koji ukazuju da bolesnik boluje od KOPB-a su: dispneja, kronični kašalj i kronično stvaranje sputuma, prisutnost KOPB-a kod drugih članova obitelji te izlaganje rizičnim čimbenicima, odnosno štetnim česticama među kojima se smatra da cigaretni dim ima najveću ulogu.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu izvanstaničnog rhHsp70 proteina te LPS-a i LTA u imunosnom i upalnom odgovoru kod NCI-H292 i THP-1 staničnih linija te pri kojim koncentracijama rhHsp70 protein uzrokuje statistički značajno povećano izlučivanje upalnih citokina IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α. Istraživanje je pokazalo da kod NCI-H292 stanica 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70 stimulira izlučivanje IL-1α i IL-8, dok 0,1, 0,3, 1, 3 i 30 μg/mL rhHsp70 potiče otpuštanje IL-6. Osim toga, dokazano je kako tretiranje NCI-H292 stanica s LPS-om uzrokuje povećano izlučivanje IL-6 i IL-8, te da LPS uzrokuje snažnije izlučivanje IL-6 i IL-8 nego LTA. S druge strane, kod THP-1 stanica 10 i 30 μg/mL rhHsp70 uzrokuje povećanu koncentraciju IL-1β i IL-8, ali ne i IL-1α, IL-6 niti TNF-α. Također, dobiveni rezultati pokazuju da THP-1 stanice tretirane s LPS-om ili LTA izlučuju povećanu količinu svih ispitivanih citokina. Pri tome je uočeno kako LPS ima izraženiji učinak od LTA i na THP-1 stanice.

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

Rad sadrži: 52 stranice, 13 grafičkih prikaza, 1 tablica i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: KOPB, upalni citokini, Hsp70 protein, ELISA, LPS, LTA, TLR receptori, NCI-H292 stanice, THP-1 stanice

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Petra Turčić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

MEASUREMENT OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES SECRETED FROM THP-1 AND NCI-H292 CELLS AFTER TREATMENT WITH EXTRACELLULAR Hsp70 PROTEIN

Ana Dojder

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by insufficient flow of air through the lungs wherein the exhalation is more difficult than the inhalation, and the expiratory phase of respiration is prolonged. In the pathogenesis of COPD, oxidative stress and inflammatory processes have an essential role due to chronic inflammation of the airways and destruction of parenchyma which leads to lost of alveolar connectivity and lung elasticity. The main symptoms of the patients suffering from COPD are dyspnea, chronic cough and chronic sputum production, the presence of COPD at the other family members and exposure to risk factors or harmful particles among which cigarette smoke plays a major role.

The aim of this study was to investigate the role of extracellular rhHsp70 protein, LPS and LTA in the immune and inflammatory responses of NCI-H292 and THP-1 cell lines, and to find out which concentrations of rhHsp70 protein cause statistically significant increased secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α. Research showed that in NCI-H292 cells 0.3, 1 and 3 μg/mL rhHsp70 stimulates the secretion of IL-1α and IL-8, while 0.1, 0.3, 1, 3 and 30 μg/mL rhHsp70 provokes release of IL-6. Besides, our results have demonstrated increased release of IL-6 and IL-8 from NCI-H292 cells treated with LPS, and this secretion was stronger if compared with LTA treatment. On the other hand, in THP-1 cell line 10 and 30 μg/mL rhHsp70 caused increased concentrations of IL-1β and IL-8 in cell supernatants, but not of IL-1α, IL-6 or TNF-α. Also, the results showed that THP-1 cells treated with LPS or LTA release increased levels of all measured cytokines. Once again, LPS was stronger inducer of cytokines secretion than LTA.

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

Thesis includes: 52 pages, 13 figures, 1 table and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COPD, inflammatory cytokines, Hsp70 protein, ELISA, LPS, LTA, TLR receptors, NCI-H292 cells, THP-1 cells

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

Petra Turčić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2017.