

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ida Žrvnar

**Uloga protein-kinaza aktiviranih mitogenom i
proteina toplinskog šoka u oksidacijskom stresu
izazvanom ekstraktom dima cigareta kod A549
alveolarnih epitelnih stanica**

Zagreb, godina 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom dr. sc. Anite Somborac Bačura. Predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018/2019.



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost, broj projekta IP-2014-09-1247.

POPIS KRATICA

BCA	bicinkonična kiselina
BSA	goveđi serumski albumin (<i>eng.</i> bovine serum albumin)
CSE	ekstrakt dima cigareta (<i>eng.</i> cigarette smoke extract)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (<i>eng.</i> death inducing signaling complex)
DMSO	dimetil-sulfoksid
EDTA	etilendiamin-tetraoctena kiselina
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (<i>eng.</i> extracellular signal-regulated kinase)
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (<i>eng.</i> Fas-associated death domain)
FBS	fetalni goveđi serum (<i>eng.</i> fetal bovine serum)
FEV ₁	forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi (<i>eng.</i> forced expired volume in 1 second)
GOLD	globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (<i>eng.</i> Global Initiative Chronic Obstructive Lung Diseases)
HSP	protein toplinskog šoka (<i>eng.</i> heat shock protein)
JNK	kinaza koja fosforilira N-terminalni dio transkripcijskog čimbenika c-Jun-a (<i>eng.</i> c-Jun N-terminal kinase)
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LDH	laktat dehidrogenaza
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (<i>eng.</i> mitogen-activated protein kinase)
NF- κ B	jezgrin čimbenik kappa B (<i>eng.</i> nuclear factor kappa B)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (<i>eng.</i> reactive oxygen species)
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (<i>eng.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TLR	receptor sličan Tollu (<i>eng.</i> Toll-like receptor)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB).....	1
1.1.1. Patogeneza KOPB-a.....	1
1.1.2. Uzroci KOPB-a.....	2
1.2. Apoptoza.....	3
1.3. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK).....	4
1.4. Proteini toplinskog šoka (HSP).....	4
2. CILJEVI RADA.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. Stanična kultura.....	7
3.2. Priprema ekstrakta dima cigareta.....	7
3.3. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina.....	8
3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze.....	8
3.5. Western blot analiza.....	9
3.6. Statistička obrada podataka.....	12
4. REZULTATI.....	14
4.1. Učinak CSE-a na slobodne tiolne skupine proteina.....	14
4.2. Učinak CSE-a na preživljavanje stanica.....	15
4.3. Uloga MAPK i HSP proteina u oksidacijskom stresu izazvanom CSE-om.....	16
5. RASPRAVA.....	19
6. ZAKLJUČCI.....	23
7. POPIS LITERATURE.....	24
8. SAŽETAK.....	32

1. UVOD

1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB)

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) definirana je postojanim respiratornim simptomima i bronhoopstrukcijom, a predstavlja bolest gornjih dišnih puteva. Trenutačno je četvrti po redu vodeći uzročnik smrti u svijetu, a smatra se da će starenjem populacije i sve većom izloženošću rizičnim čimbenicima do 2020. godine doći na treće mjesto (Lozano i sur., 2012). Mnoge osobe boluju od ove bolesti, a 2012. godine 3 milijuna ljudi je preminulo od KOPB-a ili KOPB-om uzrokovanim komplikacijama. Bolest karakterizira kronična upala dišnih puteva koja za posljedicu ima sužavanje malih dišnih puteva, uništavanje plućnog parenhima i smanjenje plućne elastičnosti, što dovodi do nastanka simptoma karakterističnih za KOPB koji uključuju dispneju, otežano disanje, te kronični kašalj (sa ili bez stvaranja sputuma). Strukturne promjene dišnih puteva, koje se najčešće povezuju sa značajnom izloženošću dišnih puteva štetnim česticama i plinovima, između ostaloga smanjuju sposobnost normalnog izdaha zraka. Budući da je KOPB jedan od glavnih razloga kroničnog morbiditeta i mortaliteta, ona ujedno predstavlja i veliki izazov javnome zdravstvu (Mathers i Loncar, 2006).

1.1.1. Patogeneza KOPB-a

Nekoliko mehanizama pridonosi patogenezi KOPB-a. Udisanje štetnih čestica, poput dima cigareta, uzrokuje infiltraciju upalnih stanica u dišne puteve i pluća što dovodi do kronične upale. Različite upalne stanice kao što su makrofagi, neutrofil i CD8⁺ T-limfociti sudjeluju u upalnome odgovoru u dišnim putevima osoba koje boluju od KOPB-a (Barnes i sur., 2003).

Do nastanka bolesti može doći i zbog poremećaja ravnoteže između proteolitičkih i anti-proteolitičkih molekula u plućima, što je primijećeno kod KOPB bolesnika kod kojih je povećana proteolitička aktivnost. Ta povećana proteolitička aktivnost uzrokuje uništavanje zdravog plućnog parenhima što dovodi do razvoja emfizema. Do povećane proteolitičke aktivnosti može doći zbog upale, odnosno otpuštanja proteolitičkih enzima od strane upalnih stanica kao što su makrofagi i neutrofil. U njenoj pozadini, isto tako mogu biti genski čimbenici kao što je nedostatak alfa-1-antitripsina (Demedts i sur., 2005).

Još jedan mehanizam uključen u nastajanje KOPB-a je oksidacijski stres. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica nastanka previše reaktivnih kisikovih spojeva (*eng. reactive oxygen species*, ROS) ili zbog nedostatka antioksidansa. Neki od potencijalnih uzroka oksidacijskog stresa u gornjim dišnim putevima su dim cigareta i leukociti. Sam oksidacijski stres može

dovesti do disfunkcije stanica i stanične smrti te može inducirati štetu izvanstaničnom matriksu pluća. Isto tako, oksidansi pridonose upali tako da aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- κ B što za posljedicu ima poticanje transkripcije proupalnih gena. U razvoju bolesti dolazi do različitih interakcija ova tri mehanizma. Također, neravnoteža između apoptoze i obnove strukturnih stanica u plućima može dovesti do oštećenja plućnog tkiva i nastanka emfizema (Barnes i sur., 2003).

1.1.2. Uzroci KOPB-a

Kompleksna međuigra dugoročne kumulativne izloženosti štetnim česticama i plinovima te kombinacija različitih genetskih predispozicija smatra se pozadinom razvoja KOPB-a.

Rizik razvoja KOPB-a pripisuje se najvećim dijelom dimu cigareta. Osobe koje konzumiraju cigarete imaju višu prevalenciju respiratornih simptoma, veću godišnju stopu smanjenja forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi (FEV₁) i veću KOPB-om uzrokovanu smrtnost od nepušača (Kohansal i sur., 2009). Kronična izloženost dimu cigareta oštećuje epitel dišnih putova što dovodi do aktivacije signalnih kaskada koje potiču otpuštanje upalnih citokina. Dolazi do privlačenja upalnih stanica i pojačavanja upalnog odgovora. Uz to, dim cigareta ograničava proces popravka alveola, što uzrokuje fibrozu (Decramer i sur., 2012; Baglolle i sur., 2008; Rumora i sur., 2008; Kode i sur., 2006).

Ostali rizični čimbenici uključuju izloženost različitim česticama zraka što uključuje organsku i anorgansku prašinu, pare i plinove na radnom mjestu, smog te ostale zagađivače zraka. U zemljama u razvoju veliki rizik predstavlja izloženost zraku nastalom izgaranjem biomase u slabo ventiliranim zatvorenim prostorima, budući da se biomasa koristi za kuhanje i grijanje. Isto tako lošiji ekonomski uvjeti podrazumijevaju veću stopu pušenja, veću učestalost respiracijskih bolesti kao i slabiju dostupnost zdravstvene skrbi dovodeći do većeg rizika razvoja KOPB-a (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2018; Adeloye i sur., 2015; Vestbo, 2014).

Iako neka istraživanja pokazuju povećanu osjetljivost žena na cigaretni dim (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2018; Han i sur., 2010), prevalencija KOPB-a ja podjednaka u muškaraca i žena.

Složena interakcija okolišnih i genskih čimbenika u konačnici rezultira KOPB-om, no dosadašnja istraživanja povezanosti genskih čimbenika i KOPB-a nisu dala dosljedne rezultate (Diaz-Guzman i Mannino, 2014; Molfino, 2007; Wood i Stockley, 2006).

Druge bolesti, kao što su kronični bronhitis i astma, također povećavaju rizik od KOPB-a, ali na razvoj bolesti mogu utjecati i svi ostali čimbenici koji utječu na razvoj pluća za vrijeme

trudnoće i djetinjstva (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2018; Postma i Rabe, 2015; Diaz-Guzman i Mannino, 2014).

1.2. Apoptoza

Apoptoza je visoko regulirani mehanizam stanične smrti. Ovako programirana stanična smrt dozvoljava uklanjanje neželjenih, oštećenih ili zaraženih stanica. Do sada su opisana tri različita signalna puta koja sudjeluju u staničnoj smrti. Različite kaspaze, proteini koji sudjeluju u regulaciji apoptoze, uključene su u ove različite puteve apoptoza (Degterev i sur., 2003). Prvi signalni put zove se receptorima posredovani vanjski put i aktivira se kao odgovor na izvanstanične signale te je posredovan vezanjem članova porodice TNF-a (*eng. tumor necrosis factor*), npr. TNF- α , na receptore smrti na površini stanice. Vezanje TNF-a dovodi do multimerizacije receptora smrti i nastanka signalnog kompleksa koji inducira smrt (*eng. death inducing signalling complex, DISC*). DISC sadrži različite adaptorske molekule uključujući i domenu smrti povezanu s Fas-om (*eng. Fas associated death domain, FADD*). FADD potom aktivira kaspazu-8 koja aktivira kaspazu-3, a ona izvršava apoptozu tako da oslobađa kaspazama aktivirane DNAze od njihovih inhibitora, što za posljedicu ima fragmentaciju DNA (Yamamoto i sur., 2002; Scaffidi i sur., 1998; Tang i Kidd, 1998; Muzio i sur., 1996).

Drugi signalni put, unutarnji mitohondrijski put, odgovor je na fizičke i kemijske signale stresa te dovodi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c aktivira aktivirajući čimbenik apoptotske proteaze 1 (*eng. apoptotic protease activating factor-1*) što aktivira kaspazu-9, koja potom aktivira kaspazu-3 te konačno započinje apoptozu (Slee i sur., 1999; Luo i sur., 1998; Li i sur., 1997; Zou i sur., 1997).

U posljednjem, endoplazmatskom signalnom putu kaspazu-12 aktiviraju stresni signali kao što je hipoksija (Szegezdi i sur., 2003; Rao i sur., 2001).

Proteaze koje nisu kaspaze isto tako mogu direktno aktivirati kaspaze, primjerice granzim B koji aktivira kaspazu-3 (Darmon i sur., 1995). Apoptozu može inducirati i nedostatak signala preživljavanja, kao npr. nedostatak čimbenika rasta. U takvim slučajevima dolazi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija koji potom pokreće apoptozu (Vander Heiden i sur., 2001; Eastman, 1995).

Dok je apoptoza veoma regulirani aktivni mehanizam stanične smrti, stanična nekroza je nekontrolirani procesu kojem sama stanica ni na koji način ne sudjeluje (Lockshin i Zakeri, 2001). Zbog toga je nekrozu teško spriječiti, međutim apoptoza je proces koji se može modulirati u cilju održavanja stanične vijabilnosti.

Posljedično, apoptoza je veoma bitna u održavanju normalne stanične homeostaze zbog doprinosa ravnoteži između stanične proliferacije i diferencijacije te uklanjanja tkiva koje više nije potrebno. Poremećaj ravnoteže između proliferacije i apoptoze u plućnom tkivu doprinosi patogenezi KOPB-a. U ljudi postoji veoma ograničen broj ispitivanja, ali je na životinjskim modelima dobiven veći uvid u povezanost dima cigareta i apoptoze te razvitka emfizema (Demedts i sur., 2006).

1.3. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK)

Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) regulatorni su proteini pronađeni u svim eukariotskim stanicama. Aktiviraju se raznim signalnim putevima kao odgovor na izvanstanične stimulanse. U sisavaca je karakterizirano pet velikih grupa MAPK, dok su tri češće istraživane skupine kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (*eng. extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, ERK1/2*), kinaze koje fosforiliraju N-terminalni dio transkripcijskog čimbenika c-Jun-a (*eng. c-Jun N-terminal kinases, JNK*) i p38 kinaze. ERK 1 i ERK 2 se uglavnom aktiviraju kao odgovor na čimbenike rasta, dok na aktivaciju p38 i JNK najviše utječu čimbenici stresa koji uključuju stimulaciju citokinima, ionizirajuće zračenje i osmotski šok. MAPK se aktiviraju dvostrukom fosforilacijom treoninskih i tirozinskih ostataka koji se nalaze u aktivacijskoj petlji subdomene VIII kinaza. Tako aktivirane MAPK fosforiliraju brojne transkripcijske čimbenike, kao npr. c-Jun i NF- κ B, koji vezanjem na DNA potiču transkripciju i sintezu različitih upalnih citokina kao i apoptotskih molekula (Roux i Blenis, 2004; Villena i sur., 2014; Kawai i Akira, 2006; Newton i Dixit, 2012; Takeda i Akira, 2005).

1.4. Proteini toplinskog šoka (HSP)

Proteini toplinskog šoka (HSP, *eng. heat shock proteins*) evolucijski su veoma konzervirani proteini. Spadaju u skupinu stresnih proteina te se mogu pronaći u stanicama različitih organizama, od bakterija do sisavaca (Borges i sur., 2012). U svojoj promotorskoj regiji sadrže elemente toplinskog šoka (HSE, *eng. heat shock elements*), a induktori njihove transkripcije, čimbenici toplinskog šoka (HSF, *eng. heat shock factors*) potiču njihovu transkripciju (Sharp i sur., 2013). Iako su dobili ime zbog toga što se mogu inducirati toplinom, na povećanu transkripciju HSP-a najčešće utječe stanični stres, koji osim topline uključuje i ultraljubičasto zračenje, oksidacijski stres, te virusne infekcije (Kalmar i Greensmith, 2009). Njihova najbitnija uloga u stanici je ona molekuskog šaperona te kao takvi sudjeluju u sastavljanju,

stabilizaciji, smotavanju i translociranju različitih proteina. Isto tako, HSP proteini imaju bitnu ulogu u poticanju razgradnje oštećenih proteina te regulaciji staničnog odgovora. Na taj način ovi proteini doprinose održavanju homeostaze stanica i tkiva. Proteini toplinskog šoka podijeljeni su na temelju njihovih molekulskih masa (prema kojima nose i ime) u pet porodica: mali HSP proteini, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP110. Sadrže dvije funkcionalno značajne domene, domenu koja veže supstrat i domenu koja veže ATP, budući da su svi HSP, osim malih HSP proteina, ovisni o ATP-u (Pockley, 2003).

Porodica HSP70 uključuje najpoznatije i najviše konzervirane proteine toplinskog šoka koji mogu biti inducibilni ili konstitutivno eksprimirani. Većina njih, kao što je inducibilni HSP70, nalazi se u citosolu, ali pripadnici ove porodice pronađeni su i u mitohondrijima te endoplazmatskom retikulumu. Kao proteini koji inhibiraju staničnu smrt ovisnu i neovisnu o kaspazama imaju veoma moćno antiapoptotsko djelovanje. Inhibicijom NF- κ B signalnog puta sprječavaju odgovor stanice na upalne citokine te na taj način sudjeluju u regulaciji imunskog odgovora (Sevin i sur., 2015).

Za razliku od unutarstaničnog HSP70, izvanstanični HSP70 vezanjem na površinske receptore slične Tollu (*eng. Toll-like receptor*, TLR), TLR2 i TLR4, na imunskim stanicama aktivira NF- κ B signalni put i potiče sintezu kao i izlučivanje upalnih citokina na taj način modulirajući imunski odgovor. Izvanstanični HSP70 može potjecati iz živih stanica bez da je prisutno tkivno oštećenje ili stanično umiranje, ali točan mehanizam izlaska HSP70 proteina iz takvih stanica nije poznat. Smatra se, doduše, da u izlasku sudjeluju egzosomi, odnosno membranski vezane vezikule koje sadrže različite stanične proteine. Ukoliko izvanstanični HSP70 potječe iz žive stanice, pretpostavlja se da ima regulacijsku ulogu. S druge strane ako izvanstanični HSP70 potječe iz mrtve stanice, on iz nje izlazi uslijed jakih oštećenja i pucanja stanične membrane te djeluje kao signal opasnosti (Sevin i sur., 2015; Han i sur., 2009). Povišena koncentracija Hsp70 u plazmi prisutna je u različitim upalnim bolestima, među kojima je i KOPB (Qu i sur., 2015).

HSP70 sudjeluje u pravilnom smotanju proteina u prisutnosti ATP-a, dok u njegovom nedostatku HSP27 preuzima ulogu vezanja krivo smotanih proteina na taj način onemogućujući njihovo nakupljanje i stvaranje agregata. Nadalje, kao i HSP70, HSP27 ima ulogu u regulaciji redoks potencijala (Sharp i sur., 2013). HSP32, odnosno hem oksidaza (HO-1) inducibilan je enzim, a njegovu ekspresiju potiču različiti stimulansi, što uključuje i ROS (Maestrelli i sur., 2003). HO-1 ima ulogu u nastanku bilirubina koji je potentan antioksidans. Naime, HO-1 metabolizira hem do biliverdina (koji se potom metabolizira u bilirubin), ugljičnog monoksida i slobodnog željeza (Fe^{3+}) (Sharp i sur., 2013).

2. CILJEVI RADA

Dim cigareta smatra se jednim od najbitnijih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a.

Proteini toplinskog šoka (HSP) visoko su konzervirana porodica proteina koji su u stanici primarno molekularni šaperoni. Najviše je istražena HSP70 porodica. Kao unutarstanični proteini djeluju izrazito antiapoptotski, ali izlaskom iz stanice potiču sintezu upalnih citokina i pridonose razvoju upale. Pripadnici porodice malih HSP proteina, HSP27 (koji također ima ulogu molekularnog šaperona) i HSP32 (sudjeluje u sintezi snažnog antioksidansa, bilirubina) sudjeluju u regulaciji stanične homeostaze.

Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) regulatorni su proteini koji se najčešće aktiviraju različitim čimbenicima stresa. Nakon aktivacije, MAPK potiču transkripciju različitih upalnih molekula te pridonose procesu apoptoze.

Cilj ovoga rada bio je istražiti ulogu različitih MAPK i HSP proteina u oksidacijskom stresu izazvanom ekstraktom dima cigareta kod A549 alveolarnih epitelnih stanica. Razinu oksidacijskog stresa ispitali smo mjerenjem slobodnih tiolnih skupina proteina u stanicama, dok smo razinu oštećenja stanica odredili mjerenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze otpuštene u medij iznad stanica. Kako bismo odredili ulogu različitih MAPK i HSP proteina u oksidacijskom stresu, stanice su bile tretirane specifičnim inhibitorima ERK-a (PD98059), p38 (SB202190) i HSP-a (KNK437).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična kultura

A549 epitelne stanice (stanična linija ljudskog alveolarnog epitela tipa II), nabavljene su iz American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Stanice su uzgajane u RPMI 1640 mediju s L-glutaminom (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) uz dodatak 10 % toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (*eng. fetal bovine serum, FBS*) (Thermo Fischer Scientific) i 1 % 100x koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (Thermo Fischer Scientific). Stanice su kultivirane u plastičnim bočicama za uzgoj staničnih kultura površine 75 cm² (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švicarska) u inkubatoru na 37 °C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂ dok nisu postigle 80 - 90 % konfluentnosti.

Prije pokusa, A549 epitelne stanice iz monosloja se isperu otopinom soli puferiranom fosfatom (*eng. phosphate buffer saline, PBS*) te se odvajaju od podloge uz 0,05 % tripsin-EDTA 1x (Thermo Fischer Scientific) i potom centrifugiraju na niskoj brzini (400 g) tijekom 5 min. Stanice se resuspendiraju u mediju za stanične kulture i uzgajaju na pločicama s 6- ili 12- jažica (TPP Techno Plastic Products) do konačne koncentracije od 1,0 x 10⁶ ili 0,5 x 10⁶ stanica/jažici. Prije izlaganja A549 stanica ekstraktu dima cigareta, stanice se preko noći inkubiraju u staničnom mediju bez seruma.

Kako bismo ispitali mehanizme uključene u indukciju oksidacijskog stresa i stanične smrti, stanice su predinkubirane s inhibitorom ERK-a (50 μM PD98059 u 0.1% dimetil sulfoksidu (DMSO); Merck, Darmstadt, Njemačka), inhibitorom p38 (10 μM SB202190 u 0.1% DMSO; Cell Signaling Technology, Dancers, Ma, USA) ili inhibitorom HSP-a (100 μM KNK437 u 1% DMSO; Meck) tijekom jednog sata.

3.2. Priprema ekstrakta dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (*eng. cigarette smoke extract, CSE*) je svježe pripremljen neposredno prije izvođenja svakog pokusa. Korištene su referentne cigarete 3R4F (Kentucky Tobacco Research & Development Center, University of Kentucky, Lexington, KY, USA). Prije pripremanja ekstrakta dima cigareta s cigareta su odrezani filteri te se dim dviju cigareta propuhao kroz 25 ml staničnog medija bez seruma uz upotrebu vakuumske pumpe. Tako nastali 100 % CSE standardizirao se mjerenjem apsorbancije CSE-a na 320 nm uz pomoć UV/VIS spektrofotometra (Cecil Aquarius CE 7200, Cecil Instruments). Apsorbancija svježe pripremljenog CSE za svaki nezavisni pokus odgovarala je vrijednostima dobivenim mjerenjem apsorbancija šest ekstrakata dima cigareta pripremljenih u tri uzastopna dana

(Somborac-Bačura i sur., 2018). Za pokuse je korišten CSE razrijeđen sa staničnim medijem bez seruma unutar 30 minuta od pripreme.

3.3. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina ispitana je kako bi se utvrdila oksidacijska šteta na staničnim komponentama uslijed izlaganja stanica ekstraktu dima cigareta. Stanični lizati pripremljeni su iz stanica uzgajanih u triplikatu na pločicama sa 6 jažica i tretiranih s CSE-om tijekom 24 h. Nakon tretmana, stanice se isperu dva puta s hladnim PBS-om, odvoje se od podloge uz 0,05 % tripsin-EDTA 1x, resuspendiraju se u staničnom mediju te centrifugiraju 5 min na 400 g na 4 °C. Talog stanica se resuspendira u hladnom PBS-u i lizira na 4 W tijekom 15 s uz upotrebu ultrazvučnog homogenizatora. Tako lizirane stanice se centrifugiraju na 15 000 g tijekom 20 min na 4 °C. U dobivenom nadsloju odredi se koncentracija proteina (metodom s bicinkoničnom kiselinom, BCA) i slobodnih tiolnih skupina proteina.

Određivanje proteina uz upotrebu BCA (Sigma) vrši se na mikrotitarskim pločicama. Metoda se temelji na stvaranju kompleksa proteina s Cu^{2+} (bakar (II) sulfat pentahidrat, Sigma) pod alkalnim uvjetima nakon čega slijedi redukcija Cu^{2+} u Cu^+ . Količina redukcije proporcionalna je koncentraciji proteina. BCA stvara plavo-ljubičasti kompleks s Cu^+ u alkalnom okolišu čija se apsorbancija mjeri na 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (VIKTOR3 Multilabel Counter 1420, Wallac, Perkin-Elmer).

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina mjerila se spektrofotometrijski upotrebom 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) kao reagensa, metodom koja je prije opisana (Hu, 1994) uz manje preinake. Ukratko, stanični lizati (100 μL) se pomiješaju s Tris-EDTA puferom (0,25 M Tris-HCL, pH 8,2 koji sadrži 20 mM EDTA; 150 μL), DTNB reagensom (10 mM; otopljen u apsolutnom metanolu; 10 μL) i apsolutnim metanolom (740 μL) te se inkubacija provodi 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju na 3000 g tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija supernatanta mjeri se na 412 nm (Cecil Aquarius Ce 7200, Cecil Instruments), a koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina izražavaju u $\mu\text{mol} / \text{g}$ proteina.

3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze

Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju iznad stanica služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari te se koristi kao pokazatelj integriteta stanične

membrane. LDH je isključivo citoplazmatski enzim i ako je integritet stanične membrane očuvan, ne bi smio biti prisutan u staničnom mediju. Stanice su bile uzgajane u triplikatu na pločicama s 12 jažica i tretirane CSE-om tijekom 24 h. Kao pozitivna kontrola, stanice su bile tretirane 30 μ M kamptotecinom (Sigma-Aldrich) otopljenim u DMSO-u tako da je konačna koncentracija DMSO-a iznosila 0,1 %. Nakon inkubacije, medij iznad stanica je centrifugiran na 1000 g tijekom 5 min na 4 °C. Aktivnost LDH mjerena je u dobivenim supernatantima odmah nakon centrifugiranja spektrofotometrijskom metodom uz LDH reagens (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska) na poluautomatskom biokemijskom analizatoru (Trace 30) (Somborac-Bačura i sur., 2018). Princip ove metode je da se u prisutnosti LDH L-laktat oksidira u piruvat, pri čemu se NAD^+ reducira te se mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm na 37 °C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij (U/L) \pm standardna pogreška.

3.5. Western blot analiza

Western blot analizom određena je aktivacija i ekspresija različitih MAPK te ekspresija HSP proteina. Princip metode je da se proteini iz staničnih lizata razdvoje SDS-PAGE elektroforezom te 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 ciljni 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 u uređaju za fotografiranje membrana ta mjesta vide kao zatamnjene vrpce.

Stanični lizati pripremljeni su iz stanica uzgajanih u triplikatu na pločicama sa 6 jažica i tretiranih s CSE-om tijekom 24 h. Nakon tretmana, stanice se isperu dva puta s hladnim PBS-om te liziraju pomoću pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 1 mM natrijev ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)) tijekom 20 min. Tako lizirane stanice se centrifugiraju na 15 000 g tijekom 20 min na 4 °C. U jednom dijelu dobivenog nadsloja odredi se koncentracija proteina (metodom s BCA), dok se u drugi dio nadsloja doda 6x koncentrirani Laemmlijev pufer za nanošenje uzoraka (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 12 % SDS,

30 % glicerol, 0,2 % bromfenol plavilo, 12 % β -merkaptoetanol u destiliranoj vodi). Uzorci se prokuhaju na 97 °C tijekom 3 min, brzo ohlade na ledu i pospreme na -20 °C do korištenja za Western blot analizu.

Proteini iz staničnih lizata (40 μ g) razdvoje se okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (*eng.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Za elektroforezu proteina korišten je 4 %-tni sabijajući gel te 10 %-tni razdvajajući gel. Sastav 4 %-tnog sabijajućeg gela je 6,1 ml ultračiste H₂O, 2,5 ml pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 100 μ l 10 % otopine SDS-a, 1,3 ml 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μ l 10 % otopine amonij-persulfata i 10 μ l tetrametil-etilendiamina (TEMED). Za 10% razdvajajući gel korišteno je 4,35 ml ultračiste H₂O, 2,5 ml pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 μ l 10% otopine SDS-a, 3,0 ml 30% otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μ l 10% otopine amonij-persulfata i 5 μ l TEMED-a.

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 deset obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 10 do 250 kDa (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, Bio Rad, SAD).

Elektroforezom razdvojeni proteini prenesu se na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 μ 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 prijena 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.

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje. Kao pufer za blokiranje korišteno je 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:

- za detekciju ukupnog proteina ERK korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu ERK1 štakora, a koja detektiraju ERK1 i ERK2 kinazu (ERK 1 (C-16): sc-93, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % goveđeg serumskog albumina (*eng. bovine serum albumin, BSA*));
- za detekciju dvojno-fosforiliranog ERK-a korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnih oblika ERK1 (Thr202 i Tyr204) i ERK2 (Thr185 i Tyr187) kinaza (Phospho p44/42 MAPK (ERK1/2) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb, #8544, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu p38 miša (p38 α (C-20): sc-535; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju dvojno-fosforilirane p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudske p38 kinaze (Thr80 i Tyr182) (Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP[®] RabbitmAb, #4511, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju HSP70 proteina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram nativnog ljudskog Hsp70 proteina (HSP70/HSP72, mAb (C92F3A-5), #ADI-SPA-810, Enzo Life Sciences, Švicarska) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju HSP32 proteina korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram rekombinantnog ljudskog HSP32 proteina (HO-1, pAb; #ADI-SPA-894; Stressgen; Enzo Life Sciences) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje)
- za detekciju HSP27 proteina korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram rekombinantnog ljudskog HSP27 proteina (HSP27, pAb; #ADI-SPA-803; Stressgen; Enzo Life Sciences) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje)
- za detekciju β -aktina korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram C-terminalnog ostatka ljudskog aktina (Actin (I19): sc-1616-R; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA).

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 su sljedeća sekundarna protutijela:

- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi ekspresije HSP70) 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);
- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi aktivacije MAPK te ekspresije HSP32 i HSP27) korištena su IgG protutijela iz seruma kože 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 kunićjih protutijela (pri analizi ekspresije MAPK i β -aktina) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:10000 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 pripremljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 ml ultračiste H₂O, 5 μ l H₂O₂, 150 μ l pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 ml DMSO-a). Membrana se zatim fotografira u uređaju za fotografiranje membrana Amersham AI600 Imager (GE Healthcare).

3.6. Statistička obrada podataka

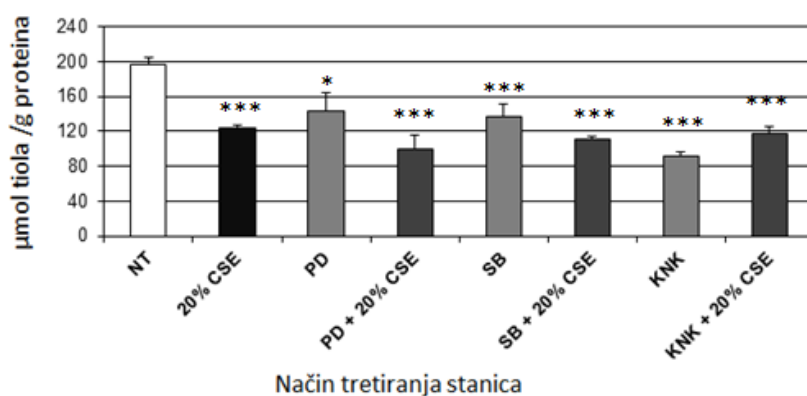
Statistička obrada rezultata dobivenih mjerenjima koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u stanicama (n = 3) i aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica (n = 3) izvršena je upotrebom programa SigmaStat za Windows-e, verzija 3.00 (SPSS Inc.). Normalnost raspodjele podataka testirana je *Kolmogorov-Smirnovim testom*. Statističke razlike između skupina, koje nisu pokazale normalnu raspodjelu, testirane su neparametrijskim testom za usporedbu više od dvije skupine podataka (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance*

on Ranks). *Post hoc* analize provedene su *Dunnett-ovim testom značajnosti*. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Za statistički značajne razlike uzeta je vrijednost $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Učinak CSE-a na slobodne tiolne skupine proteina

Prisustvo oksidacijskog stresa u A549 alveolarnim epitelnim stanicama izloženim djelovanju CSE-a ispitali smo mjerenjem koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina. Dim cigareta uzrokovao je smanjenje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,001$). Upotrebom inhibitora ERK-a (PD98059), p38 (SB202190) i HSP-a (KNK437) također se smanjila koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina (i u kombinaciji s CSE-om), ali bez značajnih razlika u odnosu na sami 20 % CSE (**Slika 1**). Ovi rezultati upućuju na oksidacijsko oštećenje staničnih proteina pod utjecajem dima cigareta.

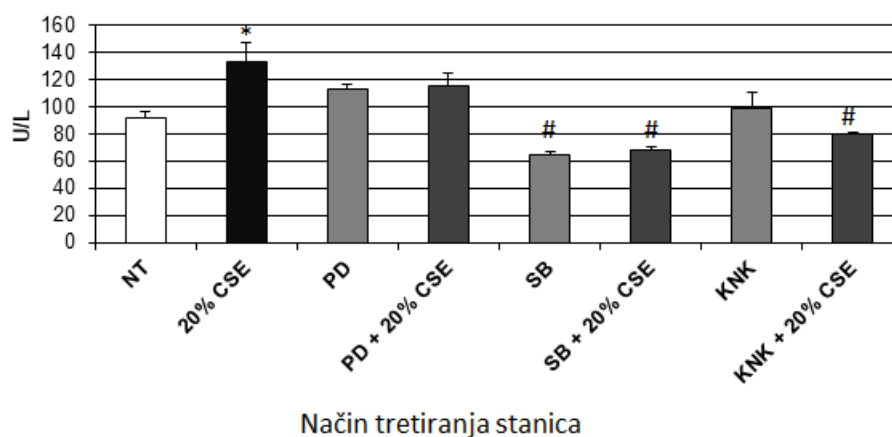


Slika 1. Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju 20 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 24 h te uz prethodnu predinkubaciju s inhibitorom ERK-a (PD98059), inhibitorom p38 (SB202190) ili inhibitorom HSP-a (KNK437). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM ($n = 3$). Statističke razlike ispitane su pomoću Kruskal-Wallisovog testa ($*P < 0,05$, $***P \leq 0,001$ u odnosu na netretirane stanice).

Skraćenice: NT = netretirane (kontrolne) stanice; PD = PD98059; SB = SB202190; KNK = KNK437.

4.2. Učinak CSE-a na preživljavanje stanica

Procjenu citotoksičnosti CSE-a prema A549 alveolarnim epitelnim stanicama odredili smo mjerenjem aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica. Ispitivanjem smo utvrdili da 20 % CSE povećava aktivnosti LDH u mediju ($P < 0,05$) upućujući na staničnu nekrozu. Značajno smanjenje LDH kod uzoraka prethodno inkubiranih inhibitorom p38 (SB202190) i inhibitorom HSP-a (KNK437) u kombinaciji s 20 % CSE-om u odnosu na sami 20 % CSE ($P \leq 0,001$) ukazuje da p38 kao i HSP imaju ulogu u staničnoj smrti izazvanoj CSE-om (**Slika 2**).



Slika 2. Katalitička aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) otpuštene u medij iznad A549 stanica izloženih djelovanju 20 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 24 h te uz prethodnu predinkubaciju s inhibitorima ERK-a (PD98059), p38 (SB202190) ili HSP-a (KNK437). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM ($n = 3$). Statističke razlike ispitane su pomoću Kruskal-Wallisovog testa ($*P < 0,05$, $\#P \leq 0,001$ u odnosu na 20 % CSE).

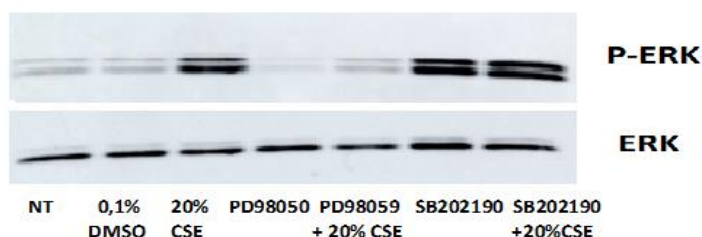
Skraćenice: NT = netretirane (kontrolne) stanice; PD = PD98059; SB = SB202190; KNK = KNK437.

4.3. Uloga MAPK i HSP proteina u oksidacijskom stresu izazvanom CSE-om

Kako bismo odredili ulogu različitih MAPK i HSP proteina u oksidacijskom stresu izazvanom djelovanjem CSE-a na A549 alveolarne epitelne stanice, proveli smo Western blot analizu. Neposredno prije izlaganja CSE-u, stanice su bile predinkubirane s inhibitorima ERK-a (PD98059), p38 (SB202190) ili HSP-a (KNK437).

U A549 stanicama tretiranim s 20 % CSE-om došlo je do povećane aktivacije ERK-a. Predinkubacijom stanica s inhibitorom ERK-a (PD98059) nije došlo do aktivacije ERK-a, kao što je i očekivano. Međutim, prethodna inkubacija stanica s inhibitorom p38 (SB202190) kao i kombinacija inhibitora p38 (SB202190) i 20 % CSE-a dovela je do povećane aktivacije ERK-a (**Slika 3. a**). Do još veće aktivacije ERK-a došlo je u uzorcima predinkubiranim s inhibitorom HSP proteina (KNK437), osobito u kombinaciji s 20 % CSE-om (**Slika 3. b**). U stanicama tretiranim odgovarajućom koncentracijom DMSO-a nije došlo do aktivacije ERK-a (**Slike 3. a i b**).

a)



b)

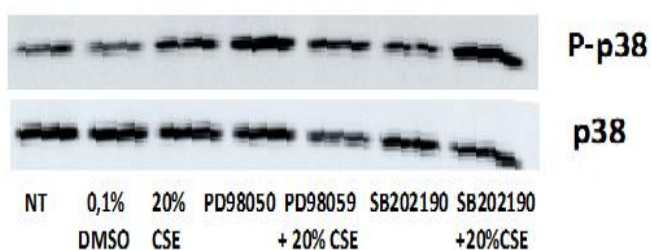


Slika 3. Western blot analiza ekspresije ukupne ERK i aktivirane ERK (P-ERK) u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju 20 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 24 h te uz prethodnu predinkubaciju s **a**) inhibitorima ERK-a (PD98059) ili p38 (SB202190) te **b**) inhibitorom HSP-a (KNK437).

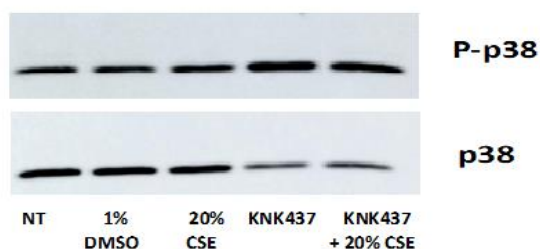
Skraćenice: NT = netretirane (kontrolne) stanice; DMSO = dimetil-sulfoksid (otapalo za inhibitore).

Do aktivacije p38 došlo je u A459 stanicama koje su bile tretirane s 20 % CSE, kao i u stanicama prethodno inkubiranim s inhibitorom ERK-a (PD980509) te kombinacijom inhibitora ERK-a (PD980509) i 20 % CSE-a. Za razliku od očekivanog, u stanicama predinkubiranim s inhibitorom p38 (SB202190) u kombinaciji s 20 % CSE-om došlo je do povećane aktivacije p38 (**Slika 4. a**). Nadalje, do snažne aktivacije p38 došlo je i u uzorcima predinkubiranim s inhibitorom HSP-a (KNK437) te kombinacijom inhibitora HSP-a (KNK437) i 20 % CSE-a (**Slika 4. b**). Do značajnije aktivacije p38 nije došlo u stanicama tretiranim s odgovarajućom koncentracijom DMSO-a (**Slike 4. a i b**).

a)



b)



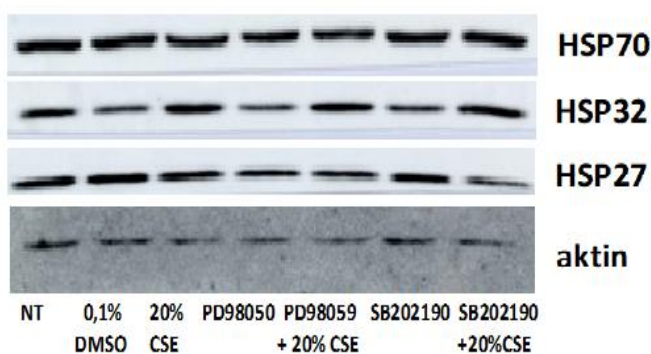
Slika 4. Western blot analiza ekspresije ukupne p38 i aktivirane p38 (P-38) u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju 20 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 24 h te uz prethodnu predinkubaciju s **a**) inhibitorima ERK-a (PD980509) ili p38 (SB202190) te **b**) inhibitorom HSP-a (KNK437).

Skraćenice: NT = netretirane (kontrolne) stanice; DMSO = dimetil-sulfoksid (otapalo za inhibitore).

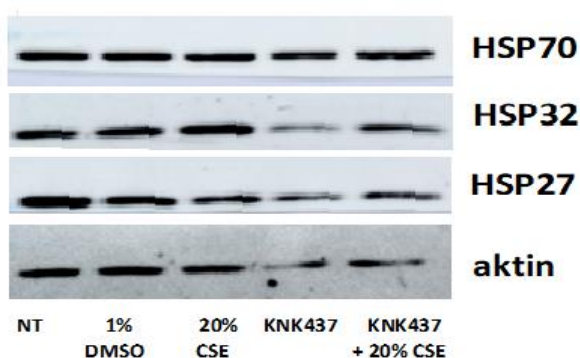
Do značajnog povećanja ekspresije HSP32 došlo je u stanicama prethodno inkubiranim s 20 % CSE-om te kombinacijama inhibitora ERK-a (PD980509) i inhibitora p38 (SB202190) s 20 % CSE (**Slika 5. a**). Tretiranje odgovarajućim koncentracijama DMSO-a, inhibitorom ERK-a (PD980509) i inhibitorom p38 (SB202190) nije dovelo do značajnijih promjena ekspresije HSP32 (**Slike 5. a i b**). Nakon tretiranja stanica inhibitorom HSP-a (KNK437), očekivano je došlo do smanjenja ekspresije HSP32 (**Slika 5. b**).

Značajnije promjene ekspresija HSP70 i HSP27 u A459 stanicama nisu primijećene niti u jednom načinu tretiranja (**Slike 5. a i b**).

a)



b)



Slika 5. Western blot analiza ekspresije HSP70, HSP32 i HSP27 u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju 20 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 24 h te uz prethodnu predinkubaciju s **a**) inhibitorima ERK-a (PD980509) ili p38 (SB202190) te **b**) inhibitorom HSP-a (KNK437).

Skraćenice: NT = netretirane (kontrolne) stanice; DMSO = dimetil-sulfoksid (otapalo za inhibitore).

5. RASPRAVA

Glavni čimbenik rizika za nastanak KOPB-a je dim cigareta. Udisanje dima cigareta za posljedicu ima razvoj upale koja dovodi do uništavanja parenhimskog tkiva. U ovome istraživanju promatrali smo učinak CSE-a na A549 alveolarne epitelne stanice. Ispitali smo na koje moguće načine MAPK signalni putevi i HSP proteini sudjeluju u procesu stanične smrti i nastanku oksidacijskog stresa u navedenim stanicama.

U našem ispitivanju utvrdili smo da se koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina značajno smanjila nakon 24-satnog izlaganja A549 stanica 20 % CSE-u. Zbog poremećaja redoksne homeostaze djelovanjem dima cigareta dolazi do prekomjerne oksidacije makromolekula unutar stanice što dovodi do oksidacijskog stresa. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem podudaraju se sa smanjenjem koncentracije tiolnih skupina koje je bilo primjećeno u fibroblastima i serumu pušača (Frei i sur., 2015; Colombo i sur., 2012). Smanjenje koncentracije tiolnih skupina u A549 alveolarnim epitelnim stanicama pod utjecajem dima cigareta ukazuje na prisustvo oksidacijskog stresa, a moglo bi biti uzrok značajnih promjena u staničnome metabolizmu.

Do sada se u različitim istraživanjima primijetila uzročno-posljedična veza između oksidacijskog stresa i stanične smrti. U ovom istraživanju smo pokazali da 20 % CSE tijekom 24 h dovodi do značajnog oštećenja membrane A549 stanica (detektiranog mjerenjem aktivnosti LDH u mediju iznad stanica) što upućuje na razvoj stanične nekroze. Ovo je u skladu s ranije provedenim istraživanjem u kojem su Hoshino i suradnici (2001) pokazali da CSE uzrokuje apoptozu u stanica tretiranim s 5 % CSE-om, dok koncentracije veće od 10 % CSE-a uzrokuju nekrozu stanica. Za razliku od njih, Yamada i suradnici (2016) zaključili su da dim cigareta uzrokuje povećanu apoptozu kod A549 stanica zbog neprikladnog antioksidacijskog odgovora uzrokovanog smanjenjem funkcije jezgrinog čimbenika povezanog s eritroidom 2 (Nrf2). Na temelju svega toga, pretpostavljamo da dugotrajna izloženost dimu cigareta može dovesti do gubitka alveolarnih struktura kod bolesti pluća povezanih s pušenjem.

Isto tako, pokazali smo da izlaganje A549 alveolarnih epitelnih stanica 20 % CSE-u aktivira ERK i p38 signalne puteve, dok nije bilo učinka na promjenu ukupne ekspresije ERK i p38. Morissett i suradnici (2009) su predložili da bi smrt strukturnih stanica pluća kao odgovor na dim cigareta mogla biti uzrokovana oksidacijskim stresom ili posljedicama aktivacije MAPK kao odgovor na unutarstanični stres. Ovisno o podržaju, aktivacija MAPK signalnih puteva može dovesti do stanične proliferacije, diferencijacije ili smrti, što u konačnici može dovesti do

upalnog odgovora (Roux i Blenis, 2004). Hellermann i suradnici (2002) su pokazali da aktivacija ERK1/2 u normalnim ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama (NHBE) ovisi o dozi kondenzata dima cigareta. Isto tako su pokazali da inhibicijom kinaze protein-kinaza aktiviranih mitogenom dolazi do smanjene aktivacije ERK1/2 inducirane kondenzatom dima cigareta. Luppi i suradnici (2005) su pokazali da niže koncentracije kondenzata dima cigareta dovode do aktivacije ERK1/2 u bronhijalnim epitelnim stanicama (NCI-H292), dok više koncentracije aktiviraju p38 i JNK. Povećana aktivacija proupalnog p38 primjećena je i u plućnim fibroblastima izloženim CSE-u (Kim i sur., 2011). Ipak, u nekim studijama je pokazano da CSE ne aktivira MAPK (Li i sur., 2007). To ukazuje da aktivacija različitih MAPK ponajprije ovisi o vrsti stanica korištenih u ispitivanjima, načinu pripreme ekstrakta dima cigareta te o duljini tretiranja. U alveolarnim makrofazima pušača pronađene su manje koncentracije aktiviranog p38 u usporedbi s nepušačima. Ipak, tretiranje stanica lipopolisaharidima dovelo je do brže aktivacije p38 u pušača u usporedbi s nepušačima, ali nije pronađena razlika u aktivaciji ERK i JNK (Mochida-Nishimura i sur., 2001). U prijašnjem istraživanju, Rumora i suradnici (2008) su u leukocitima bolesnika oboljelih od KOPB-a i zdravih osoba, ustvrdili aktivaciju ERK-a kod svih nepušača, a osobito kod zdravih pojedinaca. Aktivacija JNK i p38 bila je pronađena u pušača i bivših pušača oboljelih od KOPB, ali u zdravim pušačima. Istraživanja na različitim mišjim linijama pokazala su da upotreba specifičnog p38 α MAPK inhibitora može dovesti do smanjenja upalnog odgovora izazvanog dimom cigareta u plućima. Zbog toga, postoji mogućnost primjene p38 inhibitora u liječenju KOPB-a (Marumo i sur., 2014; Medicherla i sur., 2008). Nedavno su Charron i suradnici (2017) pokazali skromnu kliničku korisnost RV568, p38 MAPK- α i - γ inhibitora, u dvotjednom kliničkom istraživanju KOPB-a. Isto tako, inhibicijom p38 došlo je do smanjenog otpuštanja proupalnih medijatora iz CD8⁺ limfocita i epitelnih stanica respiratornog trakta, što upućuje na povezanost aktivacije p38 i upalnog procesa (Gaffey i sur., 2013). Možemo zaključiti da dim cigareta u nižim dozama dovodi do aktivacije ERK-a, što može dovesti do hiperplazije epitelnih stanica kod pušača. U višim koncentracijama i tijekom dugoročne izloženosti, dim cigareta vjerojatno dovodi do aktivacije p38 i povećanog upalnog odgovora, koji bi se mogao regulirati upotrebom p38 MAPK inhibitora.

Nadalje, u ovome istraživanju pokazali smo da 24-satnim izlaganjem A549 alveolarnih epitelnih stanica CSE-u dolazi do povećane ekspresije HSP32 (HO-1). Indukcija HO-1 može se povezati s nastankom hidroksidnih radikala koji snižuju koncentraciju GSH u stanicama (Muller i Gebel, 1994; Baglolle i sur., 2008). Povećana ekspresija HO-1 uzrokovana dimom cigareta nađena je i u glatkim mišićnim stanicama ljudskih bronhija (Jeong i sur., 2012),

plućnim fibroblastima (Bagloli i sur., 2008), BEAS-2B bronhijalnim epitelnim stanicama (Lee i sur., 2017; Zhe i sur., 2016; Slebos i sur., 2007). Fukano i suradnici (2006) su pokazali povećanu ekspresiju HSP32 uslijed izlaganja A549 alveolarnih epitelnih stanica dimu cigareta, što se podudara s našim istraživanjem. Ipak, smanjena ekspresija HO-1 pronađena je u alveolarnim makrofazima bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave pušače (Maestrelli i sur., 2003), što je navelo istraživače na zaključak da KOPB bolesnici posjeduju manju zaštitu od oksidacijskog stresa, što može biti ili posljedica bolesti ili njen uzrok (van der Toorn i sur., 2007). Isto tako, Slebos i suradnici (2004) su ustanovili smanjenu ekspresiju HO-1 u alveolarnim makrofazima bronhoalveolarne tekućine bivših pušača koji boluju od KOPB-a u usporedbi sa zdravim bivšim pušačima te došli do zaključka da pušenje ne utječe direktno na ekspresiju HO-1, nego bi HO-1 mogla biti nedovoljno eksprimirana zbog genskih polimorfizama. Yamada i suradnici (2000) povezali su sniženje HO-1 s mikrosatelitnim polimorfizmom, odnosno ponavljanjem GT dinukleotida, u promotorskoj regiji HO-1 gena. Prisutnost tog polimorfizma mogla bi utjecati na podložnost razvoja emfizema u pojedincima koji ga posjeduju. Ipak, nije pronađena korelacija između HO-1 polimorfizma i razvoja KOPB-a u hrvatskoj populaciji (Matokanovic i sur., 2012), ali je otkrivena povezanost HSP70-2 (+1267 A/G) genskog polimorfizma i KOPB-a. Prisutstvo G alela i GG genotipa bilo je učestalije kod bolesnika s KOPB-om nego zdravih ispitanika.

Iako u ovome istraživanju nisu utvrđene značajne razlike u ekspresiji HSP70 i HSP27 u A549 alveolarnim epitelnim stanicama izloženim CSE-u, neka prijašnja ispitivanja pokazala su povećanje ekspresije HSP70 u plućnim fibroblastima pod utjecajem CSE-a (Li i suradnici 2007) te povećani HSP70 i HSP27 u A549 stanicama (Somborac-Bačura i sur., 2018). Većina *in vitro* istraživanja pokazuje povećanu ekspresiju različitih HSP-ova nakon tretiranja CSE-om, dok istraživanja provedena na uzorcima bolesnika s KOPB-om pokazuju da je kod njih ekspresija HSP proteina smanjena (Rumora i sur. 2008b, Hacker i sur. 2009). Razlog tome mogao bi biti da do razvoja KOPB-a dolazi zbog iscrplivanja obrambenih mehanizama tijekom duljeg vremenskog perioda zbog kroničnog izlaganja negativnim učincima dima cigareta kod pojedinaca, dok *in vitro* studije pokazuju prolaznu indukciju HSP-a u stanicama tretiranim CSE-om. Kako smo u ovom radu pokazali smanjenje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina nakon izlaganja stanica dimu cigareta, to bi mogao biti jedan od razloga smanjene antiapoptotske i antioksidacijske funkcije HSP-ova kao posljedica oksidacije njihovih ključnih cisteinskih ostataka.

Konačno, u ovome istraživanju pokazali smo izravnu umiješanost p38 i HSP proteina u indukciju stanične smrti. Inhibicijom p38 i HSP-a došlo je do smanjenja izlaska LDH iz stanica tretiranih dimom cigareta u usporedbi sa stanicama tretiranim samo CSE-om. Nadalje, inhibicija p38 i HSP-a dovela je i do povećane fosforilacije ERK-a. Stres-kinaze mogu se aktivirati zbog otpuštanja slobodnog unutarstaničnog HSP70 uslijed nakupljanja oštećenih proteina u stresnim uvjetima, a ERK i JNK mogu i potisnuti aktivnost transkripcijskog čimbenika HSF-1 (Rumora i sur., 2008b). U ovom radu, pojedinačnom inhibicijom HSP-a i MAPK signalnih puteva (ERK i p38) pokazali smo njihovu međusobnu regulaciju u A549 stanicama izloženim utjecaju CSE-a. Stoga možemo predložiti da HSP i MAPK signalni putevi imaju značajnu ulogu u poremećajima izazvanim pušenjem.

6. ZAKLJUČCI

U ovome istraživanju pokazali smo da izlaganje 20 % CSE-u uzrokuje pad koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina, što je neizravna mjera oštećenja staničnih proteina, te vodi A549 alveolarne epitelne stanice u nekrozu. Isto tako, pokazali smo postojanje međudjelovanja MAPK signalnih puteva i HSP proteina te njihovo sudjelovanje u oksidacijskom oštećenju koje uzrokuje CSE kao i u mehanizmu citotoksičnosti. U konačnici, upalni odgovor i apoptoza koji se javljaju kod bolesnika s KOPB-om mogli bi biti povezani s indukcijom HSP-a i aktivacijom MAPK u stresnim uvjetima koji uključuju izlaganje dimu cigareta.

7. POPIS LITERATURE

Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis *J Glob Health*, 2015, 5

Baglolle CJ, Sime PJ, Phipps RP. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295, L624–L636.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms *Eur Respir J*, 2003, 22, 672–688.

Borges TJ, Wieten L, Van Herwijnen MJC, Broere F, Van derZee R, Bonorino C, Van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70 *Front Immunol*, 2012, 3, 1–12.

Charron CE, Russell P, Ito K, Lea S, Kizawa Y, Brindley C, Singh D. RV568, a narrow-spectrum kinase inhibitor with p38 MAPK- α and - γ selectivity, suppresses COPD inflammation *Eur Respir J*, 2017, 50

Colombo G, Dalle-Donne I, Orioli M, Giustarini D, Rossi R, Clerici M, Regazzoni L, Aldini G, Milzani A, Butterfield DA, Gagliano N. Oxidative damage in human gingival fibroblasts exposed to cigarette smoke *Free Radic Biol Med*, 2012, 52, 1584–1596.

Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B *Nature*, 1995, 377, 446–448.

Decramer M, Janssens W, Miravittles M. , 2012. Chronic obstructive pulmonary diseaseU: The *Lancet*. 2012, str. 1341–1351. . doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases *Oncogene*, 2003, 22, 8543.

Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5, 257–263.

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.

Eastman A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis *Semin Cancer Biol*, 1995, 6, 45–52.

Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid *Biochem J*, 2015, 277, 133–138.

Fukano Y, Oishi M, Chibana F, Numazawa S, Yoshida T. Analysis of the expression of heme oxygenase-1 gene in human alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *J Toxicol Sci*, 2006, 31, 99–109.

Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorylated p38 mitogenactivated protein kinase in COPD lungs *Eur Respir J*, 2013, 42, 28–41.

GOLD. (2018). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD (2018 Report). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). <https://goldcopd.org/gold-reports/>

Hacker, S., Lambers, C., Hoetzenecker, K., Pollreisz, A., Aigner, C., Lichtenauer, M., ... Ankersmit, H. J. (2009). Elevated HSP27, HSP70 and HSP90alpha in chronic obstructive pulmonary disease: Markers for immune activation and tissue destruction. *Clinical Laboratory*, 55(1–2), 31–40.

Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, MacNee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EFM, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: The future of COPD *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 598–604.

He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, Zhao X, Wang P. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells *Int Endod J*, 2013, 46, 128–136.

Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells *Respir Res*, 2002, 3, 22.

Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281, L509-16.

Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, Jelić D, Dojder A, Čepelak I, Rumora L. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells *Cell Stress Chaperones*, 2017

Jeong Y-Y, Park H-J, Cho Y-W, Kim E-J, Kim G-T, Mun Y-J, Lee JD, Shin J-H, Sung N-J, Kang D, Han J. Aged red garlic extract reduces cigarette smoke extract-induced cell death in human bronchial smooth muscle cells by increasing intracellular glutathione levels. *Phytother Res*, 2012, 26, 18–25.

Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 310–318.

Kawai T, Akira S. TLR signaling *Cell Death Differ*, 2006, 13, 816–825.

Kim SY, Lee JH, Huh JW, Ro JY, Oh YM, Lee S Do, An S, Lee YS. Cigarette smoke induces Akt protein degradation by the ubiquitin-proteasome system *J Biol Chem*, 2011, 286, 31932–31943.

Kode A, Yang S-R, Rahman I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells *Respir Res*, 2006, 7, 132.

Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agustí A, Sonia Buist A, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: An analysis of the Framingham Offspring Cohort *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180, 3–10.

Lee KY, Park S-Y, Park S, Hong GH, Moon K-A, Kim Y-S, Oh Y-M, Kwon H-S, Kim T-B, Moon H-B, Cho YS. Progranulin protects lung epithelial cells from cigarette smoking-induced apoptosis. *Respirology*, 2017, 22, 1140–1148.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade *Cell*, 1997, 91, 479–489.

Li W, Xu YJ, Shen HH. Effect of cigarette smoke extract on lipopolysaccharide-activated mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured cells *Chin Med J*, 2007, 120, 1075–1081.

Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2, 545.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A Bin, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope III CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 *Lancet*, 2012, 380, 2095–2128.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1-s2.0-S0092867400815895-main1998, 94, 481–490.

Luppi F, Aarbiou J, van Wetering S, Rahman I, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione *Respir Res*, 2005, 6, 140.

Maestrelli P, Páska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients *Eur Respir J*, 2003, 21, 971–976.

Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. P38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice *BMC Pulm Med*, 2014, 14

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 *PLoS Med*, 2006, 3, 2011–2030.

Matokanovic M, Rumora L, Popovic-Grle S, Cepelak I, Culic O, Barisic K. Association of hsp70-2 (+1267A/G), hsp70-hom (+2437T/C), HMOX-1 (number of GT repeats) and TNF-alpha (+489G/A) polymorphisms with COPD in Croatian population. *Clin Biochem*, 2012, 45, 770–774.

Medicherla S, Fitzgerald MF, Spicer D, Woodman P, Ma JY, Kapoun AM, Chakravarty S, Dugar S, Protter AA, Higgins LS. p38 α -Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor SD-282 Reduces Inflammation in a Subchronic Model of Tobacco Smoke-Induced Airway Inflammation *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324, 921–929.

Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross J V, Hejal R, Templeton D, Rich EA, Toossi Z. Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers *Mol Med*, 2001, 7, 177–185.

Molfino NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease *Curr Opin Pulm Med*, 2007, 13, 107–113.

Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2009, 4, 19–31.

Muller T, Gebel S. Heme oxygenase expression in Swiss 3T3 cells following exposure to aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, 1994, 15, 67–72.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex *Cell*, 1996, 85, 817–827.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 1, 3.

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

Postma DS, Rabe KF. The Asthma–COPD Overlap Syndrome N Engl J Med, 2015, 373, 1241–1249.

Rao R V, Hermel E, Castro-obregon S, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program: role of the ER chaperone GRP78 FEBS Lett, 2001, 276, 33869–33874.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68, 320–344.

Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Čepelak I, Grubišić TŽ. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude Clin Biochem, 2008, 41, 387–394.

Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Grubišić TŽ, & Čepelak I, (2008b). Reduction in peripheral blood leukocyte heat shock proteins 27 and 70 expression in chronic obstructive pulmonary disease. Croatica Chemica Acta, 81(1), 73–80.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K, Kramer PH, Peter ME. EMBO J 1998 Scaffidi 1998, 17, 1–13.

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, 2015, 1–8.

Sharp FR, Zhan X, Liu DZ. Heat Shock Proteins in the Brain: Role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential Transl Stroke Res, 2013, 4, 685–692.

Slebos DJ, Ryter SW, Van Der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AMK. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36, 409–417.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang H, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. 99224541999, 144, 281–292.

Somborac-Baćura A, Rumora L, Novak R, Rašić D, Dumić J, Čepelak I, Žanić-Grubišić T. Differential expression of heat shock proteins and activation of mitogen-activated protein kinases in A549 alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke extract *Exp Physiol*, 2018, 103, 1666–1678.

Szegezdi E, Fitzgerald U, Samalía A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010, 186–194.

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

Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45 / ICAD by Multiple Caspases Is Essential Apoptosis * *Biochemistry*, 1998, 28549–28552.

Villena J, Aso H, Kitazawa H. Regulation of Toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: Role of signalling pathways and negative regulators *Front Immunol*, 2014, 5

van der Toorn M, Slebos D-J, 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.

Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 5899–5912.

Vestbo J. COPD: Definition and phenotypes *Clin Chest Med*, 2014, 35, 1–6.

Wood A, Stockley R. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2006, 7, 130.

Yamada K, Asai K, Nagayasu F, Sato K, Ijiri N, Yoshii N, Imahashi Y, Watanabe T, Tochino Y, Kanazawa H, Hirata K. Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking *BMC Pulm Med*, 2016, 16, 1–4.

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet*, 2000, 66, 187–195.

Yamamoto K, Sasada M, Okazaki T, Kobayashi S, Takahashi A, Sawai H, Yonehara S, Hirata H. Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis *J Exp Med*, 2002, 187, 587–600.

Zhe Y, Li Y, Liu D, Su DM, Liu JG, Li HY. Extracellular HSP70-peptide complexes promote the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via TLR2/4/JNK1/2MAPK pathway *Tumor Biol*, 2016, 37, 13951–13959.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in 1997, 90, 405–413.

8. SAŽETAK

Ida Žrvnar

Uloga protein-kinaza aktiviranih mitogenom i proteina toplinskog šoka u oksidacijskom stresu izazvanom ekstraktom dima cigareta kod A549 alveolarnih epitelnih stanica

Dim cigareta sadrži različite štetne komponente koje pridonose oštećenju tkiva i razvoju upale. Bitni regulatori stanične homeostaze, proteini toplinskog šoka (HSP), u stanici djeluju antiapoptotski, ali izlaskom iz stanice uslijed njenog oštećenja mogu potaknuti sintezu upalnih medijatora. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), aktivirane različitim izvanstaničnim podražajima, također doprinose razvoju upale i preživljenju.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati uzrokuje li dim cigareta oksidacijski stres i djeluje li citotoksično na alveolarne epitelne stanice A549 putem promjena u aktivaciji MAPK i ekspresiji HSP-a.

A549 stanice su bile tretirane 20 % ekstraktom dima cigareta (CSE) tijekom 24 h uz i bez prisustva specifičnih inhibitora ERK-a (PD98059), p38 (SB202190) i HSP-a (KNK437). Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina u stanicama te aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju iznad stanica određene su spektrofotometrijski, dok su aktivacija MAPK (ERK i p38) i ekspresija HSP-a (HSP27, HSP32 i HSP70) ispitane Western blot analizom.

Izlaganjem A549 stanica CSE-u došlo je do smanjenja koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u stanicama ($P < 0,001$) te povećane aktivnosti LDH ($P < 0,05$) što je upućivalo na oksidacijsko oštećenje staničnih proteina i staničnu nekrozu. U prisustvu inhibitora p38 i HSP-a, aktivnost LDH se značajno smanjila u odnosu na 20 % CSE ($P \leq 0,001$), ukazujući na ulogu p38 i HSP proteina u staničnoj smrti izazvanoj CSE-om. Nadalje, sami CSE doveo je do povećane aktivacije ERK-a, p38 i HSP32. Uz korištenje inhibitora HSP-a došlo je do aktivacije ERK-a i p38. Inhibicija ERK-a u kombinaciji s CSE-om dovela je do slabe aktivacije p38 i jakog porasta HSP32. Upotrebom inhibitora p38 u kombinaciji s CSE-om došlo je do snažne aktivacije ERK-a i porasta ekspresije HSP32.

Možemo zaključiti da bi MAPK i HSP proteini mogli sudjelovati u upalnom odgovoru i apoptozi primijećenima kod bolesnika koji boluju od različitih bolesti povezanih s pušenjem, kao što je kronična opstruktivna plućna bolest.

KLJUČNE RIJEČI: A549 stanice, dim cigareta, HSP, MAPK

SUMMARY

Ida Žrvnar

The role of mitogen activated protein kinases and heat shock proteins in oxidative stress induced by cigarette smoke extract in A549 alveolar epithelial cells

Cigarette smoke contains multiple harmful components that could cause tissue damage and inflammation progression. Important regulators of cellular homeostasis, heat shock proteins (HSP), have an anti-apoptotic role inside the cell, but once they are introduced to an extracellular environment due to cell damage they can trigger the synthesis of pro-inflammatory mediators. Mitogen activated protein kinases (MAPKs), activated by different extracellular stimuli, also contribute to inflammation progression and cell survival.

The aim of this study was to test whether cigarette smoke causes oxidative stress and cytotoxicity in A549 alveolar epithelial cells by causing the changes in activation of MAPKs and expression of HSPs.

A549 cells were treated with 20% cigarette smoke extract (CSE) during 24 h period with and without specific inhibitors of ERK (PD98059), p38 (SB202190) and HSPs (KNK437). The concentration of total thiol protein groups and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) were determined by spectrophotometry. The activation of MAPKs (ERK and p38) and the expression of HSPs (HSP27, HSP32 and HSP70) were determined by Western blot analysis.

After the exposure of A549 cells to CSE we found a decrease in the concentration of total thiol protein groups in cells ($P < 0.001$) as well as an increase in LDH activity ($P < 0.05$), indicating the oxidative damage of cellular proteins and cellular necrosis. In the presence of p38 and HSP inhibitors, the activity of LDH was significantly decreased compared to 20% CSE ($P \leq 0.001$), which indicates a possible role of p38 and HSPs in CSE-induced cellular death. Furthermore, CSE alone caused an increase in the activation of ERK, p38 and HSP32. With the use of HSP inhibitors, there was an increase in the activation of ERK and p38. Inhibition of ERK in the combination with CSE caused a slight activation of p38 and a significant increase of HSP32. Inhibition of p38 in combination with CSE caused a strong activation of ERK and an increase in the expression of HSP32.

We can thus conclude that both MAPKs and HSPs play a potential role in the inflammatory response and apoptosis that was detected in patients with different smoking-related diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease.

KEYWORDS: A549 cells, cigarette smoke, HSPs, MAPKs