

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Milena O. Zlatanova

**Modulacija malim molekulima inflamacije
posredovane NF- κ B signalnim putem u
ćelijama urođenog imunskog sistema**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Milena O. Zlatanova

**Modulation of NF- κ B-mediated inflammation by
small molecules in innate immune cells**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentor:

Dr Marija Gavrović-Jankulović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Tanja Ćirković-Veličković
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu
Redovni član SANU

Dr Milica Popović
Vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Marijana Stojanović
Naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Zahvaljujem se svojoj mentorki, dr Mariji Gavrović-Jankulović, na nesebičnom zalaganju, podršci i strpljenju tokom mog studiranja. Njeno znanje i iskustvo predstavljali su neiscrpan izvor inspiracije i motivacije. Tokom ovih godina mi je nesebično prenela dragocena naučna i životna iskustva, i naučila me da istrajnost, radoznalost i vera u sopstveni rad vode do ostvarenja i najzahtevnijih ciljeva. Hvala joj što mi je pružila priliku da budem deo njene istraživačke grupe, od izrade diplomskog i master rada, pa sve do izrade i odbrane ove doktorske disertacije.

Dr Tanji Ćirković-Veličković, se zahvaljujem na njenom dragocenom doprinosu i izdvojenom vremenu u izradi ove doktorske disertacije, ali i prihvatanju uloge člana Komisije. Njene sugestije i naučni uvidi značajno su doprineli oblikovanju i unapređenju ove disertacije.

Zahvaljujem se i dr Milici Popović, na korisnim savetima, podršci i prenetom znanju u svim periodima mog studiranja. Njena spremnost da pomogne i podeli svoje znanje i iskustvo, kako u eksperimentalnom radu i teorijskom znanju, bili su od velikog značaja, još od ranih početaka tokom izrade mog diplomskog rada, do izrade ove disertacije. Hvala joj što je prihvatila da bude član Komisije.

Dr Marijani Stojanović, dugujem veliku zahvalnost na podršci, savetima, uputstvima i izdvojenom vremenu pri oblikovanju ove doktorske disertacije. Veoma sam zahvalna što je prihvatila da bude član Komisije, i time značajno doprinela poboljšanju kvaliteta ovog rada.

Zahvaljujem se članovima sa Katedre za biohemiju na podršci, sugestijama i divnoj atmosferi tokom čitavog trajanja doktorskih studija. Vaša stručnost, posvećenost i otvorenost za diskusiju značajno su doprineli mom profesionalnom razvoju.

Istraživanje se ne završava eksperimentalnim radom i obradom podataka, već ga upotpunjuju ljudi sa kojima se taj put deli. Zato bih se najtoplije zahvalila svim kolegama iz laboratorije 429, sa kojima sam imala zadovoljstvo da radim tokom ovih godina, kao i kolegama iz drugih laboratorija, na pomoći, podršci i inspirativnoj atmosferi, kao i na brojnim druženjima koja su dodatno ulepšala protekli period. Hvala vam na svakodnevnim razgovorima, na smehu, i prijateljstvu.

Mojim prijateljima i porodici, svima koji su bili uz mene u trenucima sumnje i umora, dugujem posebnu zahvalnost. Vaše razumevanje, ohrabrenje i ljubav bili su mi dragoceni u trenucima kada je motivacija bila na ispitu. Hvala vam što ste verovali u mene, što ste me bodrili i davali snagu da nastavim dalje, ali i slavili svaku malu pobjedu sa iskrenom radošću. Svi ti mali trenuci su oblikovali ovaj put i doveli me ovde.

Na kraju, najveće hvala dugujem osobi kojoj ovaj rad, trud i želja u obliku doktorske disertacije najviše i pripada. Iako nije više ovde, pratila me i bila uz mene u mislima svakog dana tokom ovog putovanja. Njena ljubav i vera u mene ostali su i zavek će biti deo mene, moj najveći pokretač i nadahnuće.

Mojoj mami.

Modulacija malim molekulima inflamacije posredovane NF- κ B signalnim putem u ćelijama urođenog imunskog sistema

Sažetak

Organizam poseduje višestruke sisteme odbrane od patogena, od kojih je urođeni imunski sistem jedan od prvih nivoa zaštite. U okviru imunskog sistema, epitelne ćelije učestvuju u regulisanju inflamacije pre svega proizvodnjom citokina. Receptori za prepoznavanje obrazaca patogena (PRRs), kao što su receptori slični Toll-u (TLRs), imaju ključnu ulogu u ovim procesima, jer prepoznaju karakteristične strukturne motive na patogenima i signale oslobođene iz oštećenih tkiva. Signalizacija posredovana TLRs rezultuje aktivacijom signalnih puteva i transkripcionih faktora koji regulišu sintezu citokina, hemokina, adhezivnih molekula i površinskih markera. Centralni transkripcioni regulator inflamacije ali i velikog broja osnovnih ćelijskih procesa je nuklearni faktor kappa B (NF- κ B). Poremećaji ili prekomerna aktivacija ovog signalnog puta su povezani sa patogenezi mnogih inflamatornih bolesti, tumora, i alergijskih reakcija. Zbog svoje centralne uloge u patogenezi, NF- κ B predstavlja primamljivu metu za razvoj ciljanih inhibitora koji bi regulisali prekomernu inflamaciju zabeleženu u mnogim patološkim stanjima, kao i prilikom vakcinacije i senzitivacije.

Ciljevi ove doktorske disertacije su i) karakterizacija molekulskog mehanizma aktivacije NF- κ B alergenom Act d 1 (cistein proteaza aktinidin), ii) poređenje aktivacije proinflamatornih mehanizama Act d 1 i lipopolisaharida (LPS), u modelu *in vitro* diferenciranih THP-1 makrofaga i iii) analiza mogućnosti inhibicije Act d 1- i LPS-pokrenutog NF- κ B signalnog puta odabranim malim molekulima sa imunomodulatornim i antioksidativnim efektima. U prvom delu disertacije je pokazano da Act d 1 aktivira TLR4 proteolizom njegovog ektodomena, a ne klasičnim vezivanjem za receptor. Proteolitička aktivnost Act d 1 se pokazala neophodnom za aktivaciju NF- κ B preko TLR4, i za izazivanje proinflamatornog odgovora u različitim ćelijskim model sistemima. U drugom delu ove disertacije je uspostavljen model makrofaga dobijenih *in vitro* diferencijacijom iz THP-1 monocita, koji pokazuje stabilne morfološke i funkcionalne karakteristike, kao i sposobnost odgovora na različite stimulse promenom fenotipa i proizvodnjom citokina. Koristeći ovako razvijen model makrofaga, uz model sisteme epitelnih ćelija (HEK293 i Caco-2), testirana je sposobnost odabranih malih molekula da utiču na inflamaciju posredovanu LPS-om i Act d 1, dva aktivatora NF- κ B preko TLR4. Mali molekuli su pokazali selektivne inhibitorne efekte na NF- κ B aktivaciju, pre svega na ekspresiju i translokaciju p65 komponente. Takođe, testirani inhibitori, posebno molekuli iz porodice vaniloida su ispoljili inhibitorni efekat na gensku ekspresiju i sintezu proinflamatornih citokina, modulisali polarizaciju makrofaga i imali značajan antioksidativni potencijal. Dobijeni rezultati ukazuju da, iako Act d 1 preko TLR4 deli mehanizam NF- κ B aktivacije sa LPS-om, način i priroda njihove aktivacije se razlikuju, što značajno utiče na imunomodulatorni efekat ispitivanih malih molekula. Iako su za potvrdu ovih efekata neophodna dalja *in vivo* istraživanja u životinjskim sistemima, dobijeni rezultati ukazuju da ova jedinjenja predstavljaju potencijalna terapijska rešenja kod patoloških stanja u kojima ključnu ulogu igra prekomerna aktivacija NF- κ B. Karakterizacija molekula inhibitora NF- κ B otvara mogućnost za bolje razumevanje terapijskih agenasa i sintezu efikasnijih derivata već okarakterisanih i poznatih inhibitora.

Ključne reči: NF- κ B, inflamacija, makrofagi, urođeni imunski sistem, imunomodulacija, proteazni alergeni, aktinidin, Act d 1, LPS

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Modulation of NF- κ B-mediated inflammation by small molecules in innate immune cells**Abstract**

The organism has multiple defense systems against pathogens, among which the innate immune system represents the first level of protection. In addition to immune cells, epithelial cells also participate in the regulation of inflammation, primarily through the production of cytokines. Pattern recognition receptors (PRRs), such as toll-like receptors, play a key role in these processes by recognizing characteristic motifs on pathogens and danger signals from damaged tissues, thereby transmitting signals into the cell. This signaling results in the activation of intracellular pathways and transcription factors that regulate the synthesis of cytokines, chemokines, adhesion molecules, and surface markers. The central transcriptional regulator of inflammation, as well as of numerous fundamental cellular processes, is nuclear factor kappa B (NF- κ B). Dysregulation or excessive activation of this pathway has been associated with the pathogenesis of many inflammatory diseases, tumors, and allergic reactions. Due to its central role in pathogenesis, NF- κ B represents an attractive target for the development of specific inhibitors capable of regulating excessive inflammation observed in many pathological conditions, but also in the contexts of vaccination and sensitization.

The aims of this doctoral dissertation were to *i*) characterize the molecular mechanism of NF- κ B activation by the allergen protease Act d 1, *ii*) compare the activation of proinflammatory mechanisms of Act d 1 and LPS in *in vitro* THP-1 macrophage model system, and *iii*) analyse potential inhibition of Act d 1- and LPS-induced NF- κ B activation by selected small molecules with immunomodulatory and antioxidant effects. In the first part of the study, it was demonstrated that actinidin activates TLR4 not through classical ligand–receptor binding, but via cleavage of its ectodomain. Furthermore, the proteolytic activity of actinidin was shown to be essential for NF- κ B activation through TLR4, as well as for eliciting a pro-inflammatory response to this allergen in various cellular models. In the second part of this dissertation, an optimized *in vitro* macrophage model system was established by differentiating THP-1 monocytes to macrophages. These macrophages displayed expected morphological and functional characteristics, as well as expected responses to different stimuli through phenotype changes and cytokine production. Using this macrophage model, as well as epithelial cell models, the ability of selected small molecules to modulate inflammation mediated by LPS and actinidin, two activators of NF- κ B via TLR4, was tested. The small molecules exhibited selective inhibitory effects on NF- κ B activation and p65 subunit translocation. In addition, inhibitory effects on gene expression and synthesis of pro-inflammatory cytokines, modulation of macrophage polarization, and significant antioxidant potential were confirmed, particularly for small molecules belonging to the vanilloid family. The obtained results indicate that although actinidin shares the mechanism of NF- κ B activation with LPS via TLR4, the nature and mode of their activation differ significantly, which strongly influences the immunomodulatory effects of the investigated small molecules. Although further *in vivo* studies in animal models would benefit these findings, the results suggest that these compounds represent potential therapeutic solutions for pathological conditions in which excessive NF- κ B activation plays a central role. The characterization of NF- κ B inhibitors also provides a basis for a deeper understanding of therapeutic agents and opens possibilities for the synthesis of more effective derivatives of already characterized and known inhibitors.

Keywords: NF- κ B, inflammation, macrophages, innate immune system, immunomodulation, protease allergens, actinidin, Act d 1, LPS

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

ANOVA	Analiza varijanse
APC	Antigen-prezentujuća ćelija
ATCC	Američka kolekcija tipova ćelija
BCA	Test sa bicinoninskom kiselinom
BMDM	Makrofagi izvedeni iz koštane srži
BSA	Goveđi serum albumin
CCK-8	Kit za brojanje ćelija-8
CD	Klaster diferencijacije
DAMP	Molekulski obrasci povezani sa oštećenjem
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Dendritska ćelija
DCFH-DA	2',7'-dihlorodihidrofluorescein-diacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
ELISA	Imunosorbentni test povezan sa enzimom
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FACS	Fluorescentno aktivirano sortiranje ćelija
FBS	Fetalni goveđi serum
FITC	Fluorescein izotiocijanat
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GFP	Zeleni fluorescentni protein
GSH	Redukovani glutation
HRP	Peroksidaza iz rena
ICAM	Međućelijski adhezivni molekul
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Inducibilna azot (II) oksid sintaza

IRF	Regulatorni faktor interferona
LA	Laurinska kiselina
LDH	Laktat dehidrogenaza
LPS	Lipopolisaharid
LRR	Leucinom bogati motivi
MAPK	Mitogen-aktivirana proteinska kinaza
NOD	Receptori slični nukleotid-vezujućem oligomerizacionom domenu
PAMP	Molekulski obrazac karakterističan za patogen
PAR	Receptor aktiviran proteazama
PBS	Puferisan fiziološki rastvor
PCR	Lančana reakcija polimeraze
PE	Fikoeritrin
PI	Propidijum-jodid
PMA	Forbol-12-miristat-13-acetat
PRR	Receptori za prepoznavanje obrazaca patogena
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivne kiseonične vrste
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 medijum
SDS PAGE	Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza
TBS	Trisom puferisan fiziološki rastvor
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
Th	Pomoćničke T ćelije
TLR	Receptor sličan Toll-u
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF	Faktor nekroze tumora
TRIF	Toll/interleukin-1 receptor domen-sadržajući adapter koji indukuje interferon β
TSLP	Limfopojetin strome timusa
VA	Vanilil alkohol
VCAM	Vaskularni adhezivni molekul
VL	Vanilil-laurat
VN	Vanilin

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Pregled literature	2
2.1	Urođeni imunski sistem	2
2.2	NF- κ B signalni put.....	4
2.2.1	NF- κ B aktivacija u patogenezi inflamatornih bolesti i tumora	6
2.3	Receptori slični Toll-u	7
2.3.1	TLR4.....	10
2.4	Alegeni kao aktivatori imunskog sistema	12
2.4.1	Cistein proteaze	14
2.4.2	Act d 1.....	15
2.5	Mali molekuli kao modulatori NF- κ B posredovane inflamacije	16
2.5.1	Prednosti malih molekula	17
2.5.2	Mali molekuli izolovani iz prirodnih proizvoda.....	18
2.5.3	Sintetički mali molekuli.....	19
2.6	<i>In vitro</i> model sistemi urođenih ćelija imunskog sistema.....	19
3	Ciljevi	22
4	Naši radovi	23
4.1	Izolovanje Act d 1	23
4.2	Karakterizacija prečišćenog Act d 1	24
4.3	Efekat Act d 1 i malih molekula na vijabilnost ćelija	25
4.4	Ispitivanje prirode proinflatornog efekta Act d 1.....	29
4.4.1	Act d 1 izaziva proizvodnju proinflatornih citokina aktivacijom NF- κ B signalnog puta 29	
4.4.2	Proinflatorni efekat Act d 1 je zavisen od TLR4.....	30
4.4.3	Act d 1 aktivira TLR4-zavisne promotere NF- κ B i IFN β	32
4.4.4	Act d 1 selektivno aktivira mutante humanog TLR4 F463A i F440A	34
4.5	Proinflatorni efekat Act d 1 zavisi od njegove proteolitičke aktivnosti.....	36
4.5.1	Uloga proteolitičke aktivnosti Act d 1 u izazivanju proinflatornog odgovora	36
4.5.2	Mehanizam aktivacije TLR4 aktinidinom	39
4.5.3	Inhibicijom Act d 1 dolazi do smanjenja inflamacije u THP-1 makrofagima.....	41
4.6	Uspostavljanje model sistema THP-1 makrofaga za procenu imunomodulatornih efekata	43
4.6.1	Optimizacija postupka diferencijacije	43
4.6.2	Optimizacija dužine trajanja tretmana	47
4.7	Uticaj malih molekula na proinflatorne citokine	49
4.7.1	Mali molekuli ne pokazuju proinflatorni efekat	49

4.7.2	Mali molekuli utiču na gensku ekspresiju proinflamatornih citokina	51
4.7.3	Mali molekuli utiču na proizvodnju citokina.....	54
4.8	Mali molekuli inhibiraju aktivaciju NF- κ B signalnog puta	56
4.8.1	Aktivacija NF- κ B u epitelnim ćelijama.....	56
4.8.2	Aktivacija NF- κ B u THP-1 makrofagima	58
4.8.3	Ekspresija p65 subjedinice	59
4.8.4	Aktivacija NF- κ B i translokacija p65 komponente u nukleus.....	60
4.9	Fenotipske promene u THP-1 makrofagima pod uticajem Act d 1 i malih molekula	62
4.10	Antioksidativno dejstvo malih molekula	64
4.10.1	Parametri oksidativnog stresa	65
4.10.2	Uticaj malih molekula na metabolizam NO	67
5	Diskusija.....	70
6	Zaključak	76
7	Materijal i metode	78
7.1	Metode izolovanja i prečišćavanja Act d 1	78
7.1.1	Priprema ekstrakta iz ploda kivija	78
7.1.2	Prečišćavanje na SP-Sephadex C-50	78
7.1.3	Prečišćavanje na QAE-Sephadex A-50	78
7.2	Metode određivanja koncentracije	78
7.2.1	Bicinhonska metoda određivanja koncentracije proteina	78
7.2.2	Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina.....	79
7.2.3	Određivanje koncentracije endotoksina.....	79
7.3	Elektroforetske metode	79
7.3.1	Natrijum dodecilsulfat polikarilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)	79
7.3.2	Agarozna elektroforeza.....	80
7.4	Određivanje enzimske aktivnosti Act d 1	80
7.4.1	Aktivacija Act d 1	80
7.4.2	Kazeinolitički test	80
7.5	Imunohemijske metode	81
7.5.1	Detekcija proteina u imunoblotu	81
7.5.2	Imunosorbentni test povezan sa enzimom (ELISA)	83
7.6	Kultura ćelijskih linija.....	83
7.6.1	HEK-293 ćelijska linija	83
7.6.2	Caco-2 ćelijska linija	83
7.6.3	THP-1 ćelijska linija	84

7.6.4	Reporterska ćelijska linija RAW-Blue™	84
7.6.5	Mišji iBMDMs.....	84
7.6.6	Primarne miške BMDMs.....	84
7.6.7	Održavanje ćelijske kulture	84
7.7	Diferencijacija THP-1 monocita u makrofage	85
7.7.1	Optimizacija protokola diferencijacije	85
7.7.2	Opšti protokol diferencijacije	85
7.8	Mikroskopija ćelijskih preparata.....	86
7.9	Određivanje ekspresije površinskih markera FACS-om.....	86
7.10	Metode provere citotoksičnosti i vijabilnosti.....	86
7.10.1	CCK-8 test vijabilnosti	86
7.10.2	LDH test citotoksičnosti	86
7.10.3	Preuzimanje propidijum-jodida (PI).....	86
7.11	Određivanje genske ekspresije citokina.....	87
7.11.1	Izolovanje ukupne RNK	87
7.11.2	PCR kome prethodi reverzna transkripcija.....	87
7.11.3	Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)	88
7.12	Metode određivanja nivoa oksidativnog stresa.....	88
7.12.1	Određivanje proizvodnje azot (II) oksida.....	88
7.12.2	Merenje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)	89
7.12.3	Aktivnost enzima katalaze.....	89
7.12.4	Određivanje nivoa redukovano glutationa (GSH)	89
7.13	Određivanje aktivacije NF-κB signalnog puta.....	89
7.13.1	NF-κB GFP reporter test.....	89
7.13.2	NF-κB DNK vezujući test	90
7.13.3	Analiza ekspresije p65.....	90
7.13.4	NanoGlo luciferazni test	91
7.13.5	Dual-luciferazni reporter test.....	91
7.13.6	Reporterski test sa RAW-Blue™ makrofagima	91
7.14	Statistička obrada rezultata	91
8	Literatura	92

1 Uvod

Urođeni imunski sistem predstavlja prvu barijeru zaštite organizma i obuhvata više mehanizama koji omogućavaju odbranu organizma[1]. Više tipova imunskih ćelija je uključeno u odbranu organizma od raznih patogena i antigena iz spoljne sredine, pre svega njihovom detekcijom preko receptora za prepoznavanje obrazaca patogena (PRRs)[1]. Ovi receptori prepoznaju bakterijske motive i molekule iz oštećenih tkiva, a zatim daju signal koji rezultira aktivacijom ćelija imunskog sistema. PRRs su heterogena grupa receptora koja obuhvata receptore slične Toll-u (TLRs), receptore slične nukleotid-vezujućim oligomerizacionim domenima (NODs), lektine C-tipa i skevendžer receptore[2]. Njihova aktivacija pokreće sintezu citokina (posebno interferona i hemokina), adhezivnih molekula, fagocitozu i aktivaciju ključnih transkripcionih faktora u imunskom odgovoru, poput NF- κ B i IFN β [2]. Najviše izučavan TLR je TLR4 koji je izuzetno važan u reakciji na širok spektar egzogenih i endogenih liganada[3]. Aktivacija TLR4 vodi aktivaciji dva signalna puta, MyD88- i TRIF-zavisni putevi, koji dalje aktiviraju NF- κ B odnosno IFN β promotore[4].

NF- κ B je centralni regulator velikog broja gena uključenih u esencijalne ćelijske procese ali i u proces inflamacije[5]. Klasični put aktivacije NF- κ B može se pokrenuti širokim spektrom stimulusa, dok je za aktivaciju alternativnog puta poznat manji broj liganada[5]. Poremećaji u regulaciji ovog signalnog puta povezani su sa nastankom brojnih inflamatornih bolesti, uključujući reumatoidni artritis, inflamatorne bolesti creva, multiplu sklerozu, aterosklerozu, sistemski lupus eritematosus, ali i alergijske odgovore[5]. Alergijski odgovor je definisan kao hronična, inflamatorna reakcija imunskog sistema koja se karakteriše preteranim odgovorom na bezopasne antigene koji se nazivaju alergeni. Posmatranjem alergena, posebno se ističe njihova proteolitička aktivnost, koja se danas smatra jednim od ključnih faktora u izazivanju proalergenih i inflamatornih odgovora[6]. Ovi efekti ne proizilaze samo iz procesa prepoznavanja epitopa i paratopa, već i iz direktne stimulacije receptora urođene imunosti[6].

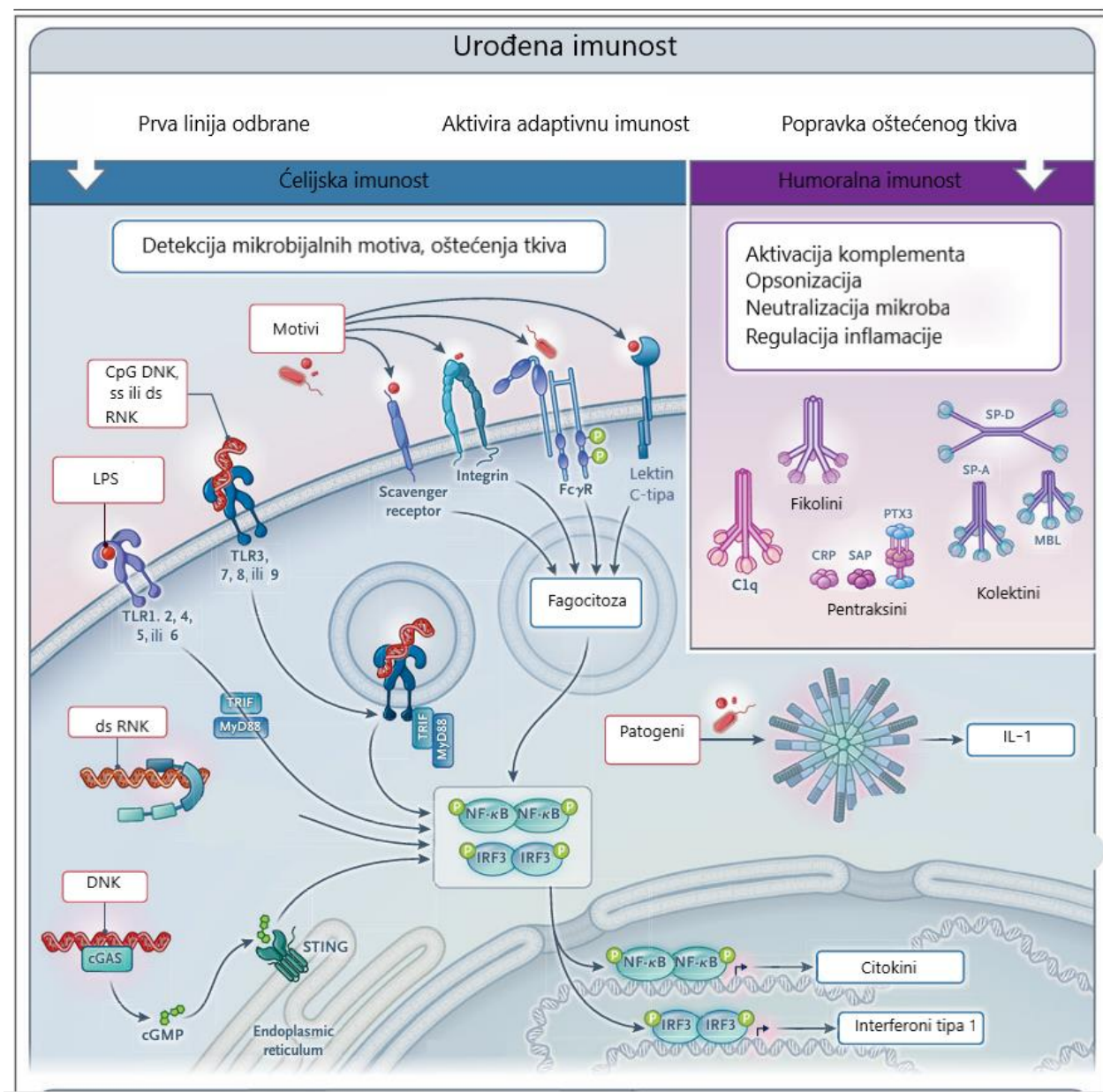
Zbog presudne uloge NF- κ B u inflamaciji i patogenezi mnogih različitih bolesti, ovaj signalni put predstavlja privlačnu metu za razvoj antiinflamatornih lekova[5]. Trenutno je poznato više od 800 inhibitora NF- κ B, a očekuje se dalji porast njihovog broja[7]. Njihov značaj u terapiji ogleda se u sposobnosti da kontrolišu prekomernu proizvodnju citokina i hemokina na mestima imunskog odgovora, što je posebno važno u terapiji inflamatornih bolesti, ali i u kontekstu vakcinacije i senzitivizacije, gde je poželjna stimulacija imuniteta uz izbegavanje sistemske inflamacije i neželjenih efekata[8]. Brojni prirodni proizvodi deluju inhibitory na NF- κ B signalni put. Sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju bogat izvor hemijski raznolikih bioaktivnih supstanci, a mnogi od njih se vekovima unazad koriste u tradicionalnoj medicini[8,9]. Među ovim jedinjenjima nalaze se fenoli, polifenoli, lignani, sekviterpeni, diterpeni i triterpeni[9]. Mali bioaktivni molekuli, pre svega iz prirodnih izvora, pored imunomodulatornog dejstva, često pokazuju i antioksidativni efekat[9].

2 Pregled literature

2.1 Urođeni imunski sistem

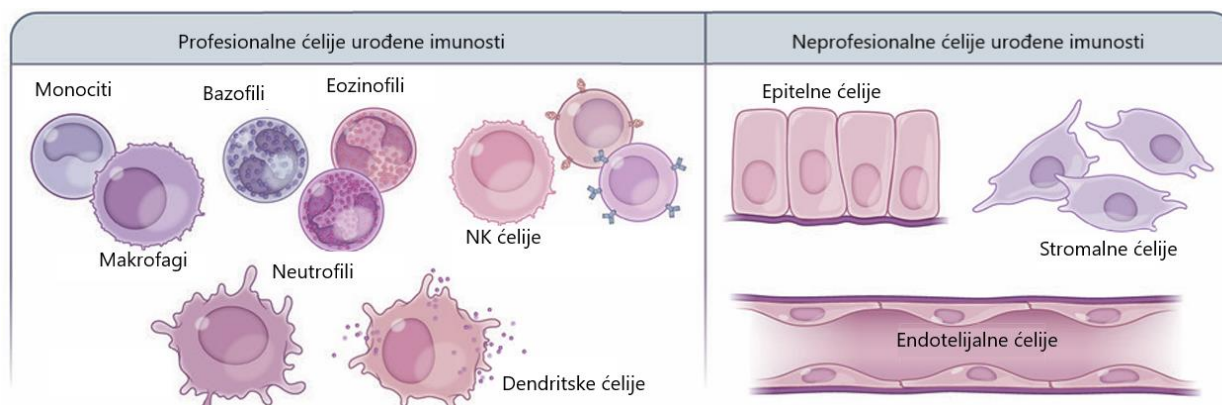
Komponente urođene imunosti igraju važnu ulogu u aktivaciji i pravilnom funkcionisanju imunskog sistema. Obeležja urođenog imunskog odgovora obuhvataju širok opseg dešavanja u organizmu. Čelije koje su deo urođenog imunskog sistema ili poseduju sposobnost da sa njim interaguju su široko zastupljene u celom organizmu[10]. Sposobnost da sintetišu i proizvode širok spektar citokina im omogućava da na adekvatan način moduliраju sveukupni imunski odgovor[1,10]. Aktivacija puteva urođene imunosti igra važnu ulogu i u sazrevanju i ekspresiji kostimulatornih molekula na antigen-prezentujućim ćelijama (APCs), a time i na prezentaciju antigena koja je neophodan korak u aktivaciji T ćelija. [10]

Sistem urođene imunosti predstavlja prvu liniju odbrane organizma. Čine ga fizičke i hemijske barijere, kao i više tipova imunskih ćelija koje eksprimiraju PRRs[1] preko kojih prepoznaju bakterijske motive i oštećeno tkivo. PRRs uključuju TLRs, NOD receptore, lektine C-tipa i skevendžer receptore. Njihova aktivacija vodi ka povećanoj ekspresiji citokina (pre svega interferona i hemokina), adhezivnih molekula, fagocitozi i aktivaciji transkripcionih faktora i njihovih promotera (kao što su NF- κ B i IFN β)[2]. Osim ćelija, urođeni imunski sistem obuhvata i druge klase molekula, kao što su pentraksini, kolektini i fikolini, koji imaju sposobnost da aktiviraju komplement i regulišu inflamaciju [2]. Primarni inflamatorni citokini (IL-1 β , IL-6 i TNF), pokreću proizvodnju sekundarnih medijatora kao što su hemokini, adhezivni molekuli, prostaglandini i NO[2]. Aktivacija urođene imunosti prethodi aktivaciji i regulaciji adaptivnog (antigen-specifičnog) imunskog odgovora [2].



Slika 1. Urođena imunost. [2]

Dendritske ćelije (DCs), makrofagi, monociti, neutrofili, eozinofili, bazofili, mastociti i ćelije prirodne ubice, se smatraju profesionalnim ćelijama urođene imunosti [2,11]. Kao neprofesionalne ćelije urođene imunosti navode se endotelne ćelije koje oblažu krvne sudove i epitelne ćelije disajnih, reproduktivnih i gastrointestinalnih puteva[12]. Za razliku od urođene imunosti, adaptivna imunost se oslanja na funkciju B i T ćelija[13].

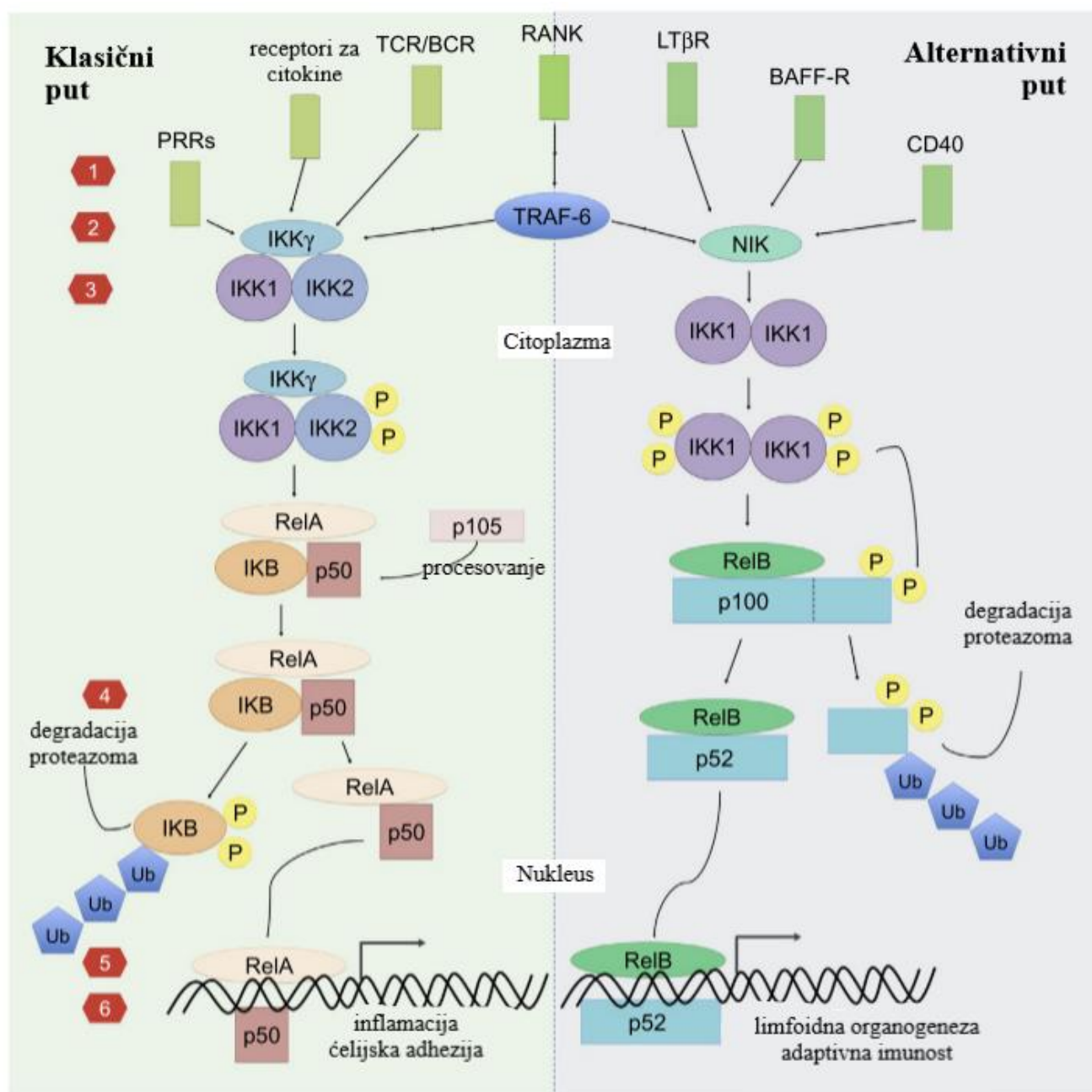


Slika 2. Ćelije urođene imunosti. [2]

2.2 NF- κ B signalni put

Proces inflamacije zavisi od različitih inducibilnih transkripcionih faktora, među kojima se nalazi i nuklearni faktor kappa B (NF- κ B)[14]. Transkripcioni faktori poput NF- κ B imaju ulogu u koordinisanju i podsticanju adaptivnog i urođenog imunskog odgovora[15]. U mnogim inflamatornim bolestima je pokazano da dolazi do aktivacije NF- κ B. Zbog ovih razloga, on je postao primamljiva meta u terapiji inflamatornih bolesti i interesovanje za ovaj signalni put ne prestaje da raste iako je o njemu već jako puno otkriveno. Upravo činjenica da ovaj signalni put reguliše i proinflamatorne i antiinflamatorne mehanizme predstavlja izazov ali i razlog razmatranja njegovog terapijskog potencijala preko inhibicije i modulacije aktivnosti NF- κ B komponenti[5,15].

NF- κ B nuklearni faktor je prvi put identifikovan u B ćelijama, gde je detektovana konstitutivna NF- κ B aktivnost kao i njegova mogućnost vezivanja za pojačivač kappa B mesta u imunoglobulinskom kappa lakom lancu[16]. Klasični i alternativni put aktivacije, iako različiti u signalnom mehanizmu, imaju bitne uloge u regulaciji inflamatornih odgovora[14].



Slika 3. Šematski prikaz puteva aktivacije NF-κB. Levo je prikazan klasični (kanonski) put, dok je desno prikazan alternativni put aktivacije. [17]

U fiziološkim uslovima, u ćelijama koje ne dobijaju nikakve stimuluse, NF-κB je predominantno u formi heterodimera sastavljenog od p50[14] i p65[5] subjedinica, koje se nalaze u citoplazmi u neaktivnoj formi i glavne su komponente klasičnog (kanonskog) puta. Neaktivne subjedinice su asosovane za neki od inhibitornih molekula NF-κB signalnog puta (IκBα, IκBβ, IκBγ,...) među kojima je IκBα najzastupljeniji[18,19]. Neaktivni NF-κB dimer/IκB kompleks biva aktiviran fosforilacijom dva konzervisana ostatka serina unutar N-terminalnog domena IκB proteina[14,18]. Fosforilacija ovih serina od strane IκB kinaze (IKK), kao odgovor na neki stimulus koji ćelija prima, vodi do trenutne poliubikvitinacije IκB proteina od strane SCF-β – TrCP kompleksa. Ova modifikacija dalje izaziva brzu

degradaciju asosovanog inhibitornog proteina od strane 26S proteazoma[5]. Degradacija inhibitorne komponente, dozvoljava translokaciju NF- κ B dimera u nukleus, gde se dešava indukcija transkripcije[5]. Nakon degradacije inhibitorne komponente i njenog odvajanja, izlaže se mesto na dimeru gde se nalazi peptidna signalna sekvenca za translokaciju[5]. Aktivirani NF- κ B dimer se vezuje za specifične DNK sekvence u ciljanim genima, označene kao κ B elementi, i reguliše njihovu transkripciju. U alternativnom putu aktivacije, citoplazmatsku formu NF- κ B čine RelB i p100 subjedinice. p100 je prekursor p52 subjedinice, koji takođe funkcioniše kao I κ B molekul jer vezuje RelB ili RelB/p50 i inhibira njihovu translokaciju u nukleus[20]. RelB može da formira dimere sa p52 ili p50 i da se translocira u nukleus gde vezivanjem za specifične sekvence DNK modulise ekspresiju ciljanih gena[5,14]. NF- κ B reguliše ekspresiju preko 500 različitih gena, uključujući gene za citokine, adhezivne molekule, proteine uključene u ćelijski ciklus, angiogenske faktore kao i proteine koji regulišu rast[21,22].

2.2.1 NF- κ B aktivacija u patogenezi inflamatornih bolesti i tumora

NF- κ B signalni put je uključen u regulaciju mnogih gena koji su deo ključnih ćelijskih procesa u celom organizmu[23]. Do aktivacije ovog signalnog puta mogu dovesti razni stimulusi, uključujući ligande koji aktiviraju receptore na B ćelijama i receptore za TNF (TNFR), inflamatorne citokine, virusne i bakterijske infekcije, oksidativni agense, UV svetlost i osmotski šok[23]. Širi spektar aktivatora podstiče signalizaciju preko klasičnog puta aktivacije, za razliku od alternativnog puta, gde je poznat manji broj liganada[14]. Najpoznatiji ligandi alternativnog puta su ligandi iz familije TNFR kao što su LT β R, CD40 i RANK, koji ne dovode do degradacije I κ B α komponente[14].

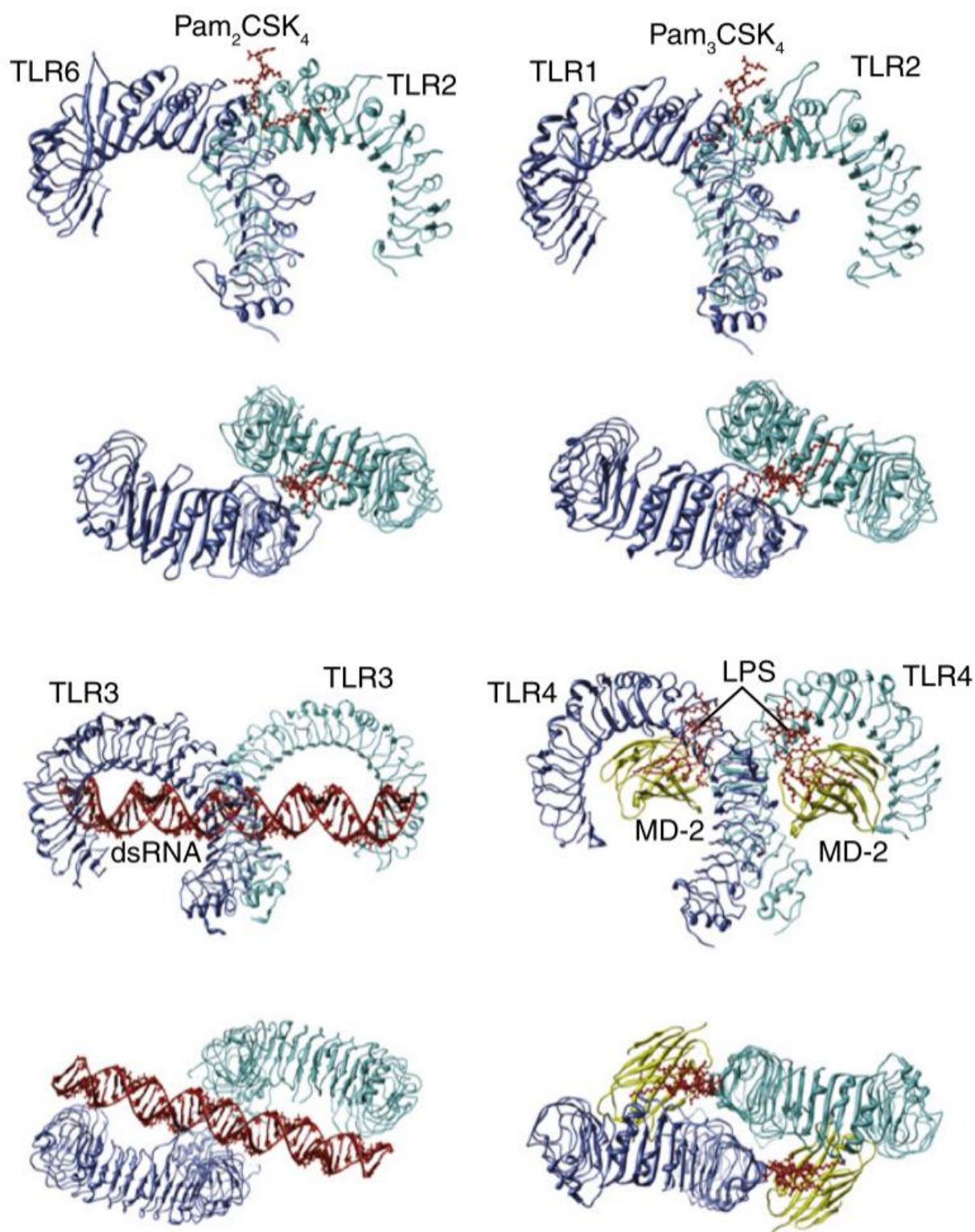
Aktivacija NF- κ B signalnog puta je uočena u patogenezi mnogih inflamatornih bolesti, kao što su reumatoidni artritis, inflamatorne bolesti creva, multipla skleroza, ateroskleroza, sistemski lupus eritematosus (SLE), dijabetes tip 1, hronična obstruktivna bolest pluća i alergijska astma[14,24,25]. NF- κ B promoviše ekspresiju citokina kao što su IL-1 α i β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 (koji deluje kao supresor inflamacije), IL-12, IL-17 i TNF[26]. Ovi proteini su neophodni za normalno funkcionisanje imunskog sistema u fiziološkim uslovima dok njihova prekomerna ekspresija dovodi do prekomerne inflamatorne reakcije i posledičnog razvoja patologije. Osim toga, aktivacija NF- κ B pojačava ekspresiju molekula neophodnih za ćelijsku adheziju kao što su E-selektin, ICAM-1 i VCAM-1[26]. Prekomerna ekspresija ovih molekula u endotelnim ćelijama dovodi do akumulacije makrofaga patološke inflamacije kao npr. kod ateroskleroze[14]. NF- κ B takođe reguliše širok spektar gena koji učestvuju u procesu formiranja i preživljavanja tumora[27]. Ovaj transkripcioni faktor promoviše preživljavanje ćelije i inhibira apoptozu preko nekoliko mehanizama[27]. Ovi mehanizmi podrazumevaju regulaciju ekspresije/aktivnosti ćelijskog inhibitora apoptoze 1 i 2 i XIAP, kao i Bcl-2 i Bcl-xL[28]. NF- κ B reguliše i ekspresiju mnoštva solubilnih medijatora koji doprinose inflamaciji koja promoviše tumore kao što su TNF, IL-1, IL-6, MCP1, COX2 i iNOS[28]. Aktivacija NF- κ B se nalazi u osnovi različitih bolesti upravo zbog sveukupne zastupljenosti i uloge u ekspresiji specifičnih gena od strane ovog signalnog puta u različitim ćelijama u organizmu, od kojih su neke navedene u Tabeli 1.

Tabela 1. Geni regulisani od strane NF- κ B u različitim tipovima ćelija u organizmu. [24]

Tip ćelije	Geni
Limfociti (Th1/Th2)	Eotaksin-1, Th1: IFN γ , IL-2; Th2: IL-4, IL-5, IL-13
Eozinofili	TNF, IL-8, međucelijski adhezivni molekul-1 (ICAM-1), antigen asociran sa leukocitnom funkcijom (LFA-1)
Neutrofili	IL-8, GM-CSF, IL-1
Makrofagi	IL-8, monocitni hemotaktički protein-1 (MCP-1)
Epitelne ćelije	TSLP, ICAM-1, vaskularni adhezivni molekul-1 (VCAM-1), IL-8, IL-6, GM-CSF, hemokinski ligand 1, MCP-1, eotaksin-1
Glatki mišići	TSLP, CD38, ICAM-1, VCAM-1, ciklooksigenaza-2, IL-6, IL-8, hemoatraktant za mastocyte (CXCL10), GM-CSF, MCP-1, neutrofil aktivirajući protein-2

2.3 Receptori slični Toll-u

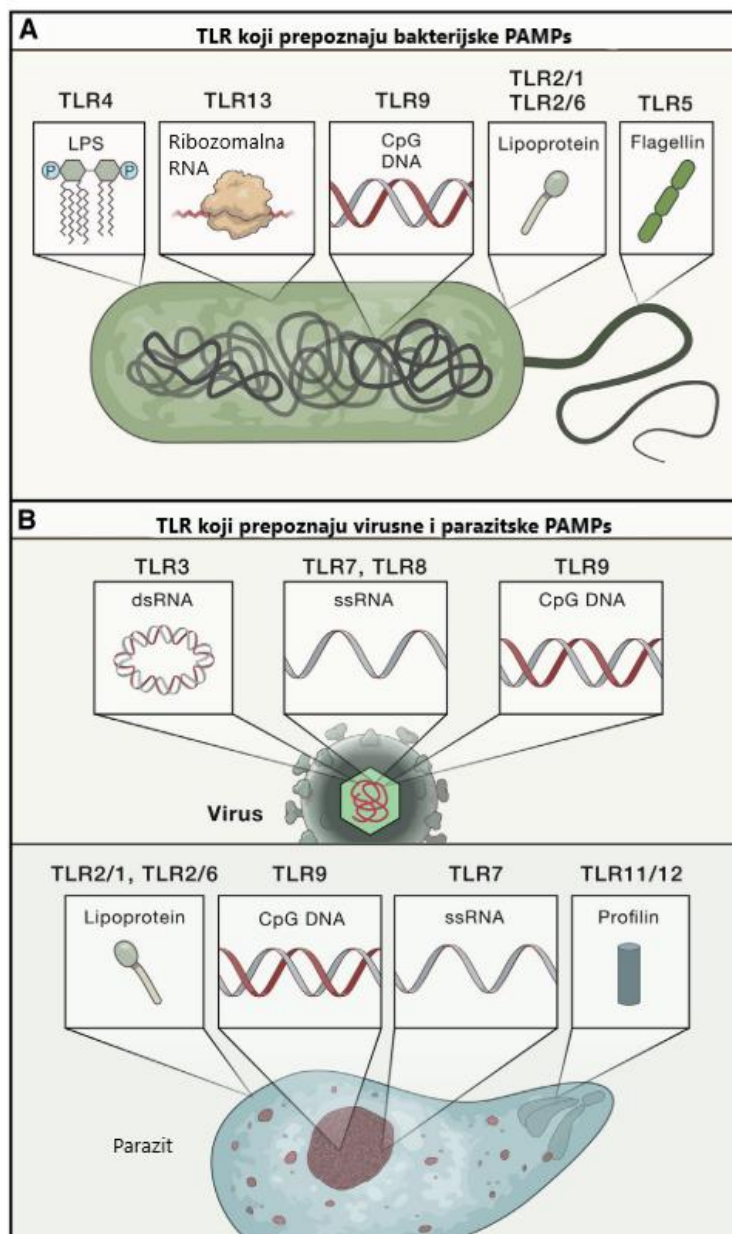
Patogeni koji napadaju organizam domaćina bivaju uočeni od strane urođenog imunskog sistema preko receptora koji prepoznaju obrasce patogena (PRRs), jedni od ključnih receptora za imunološko prepoznavanje i regulisanje imunskog odgovora[29]. Jedna od najrasprostranjenijih grupa PRRs su TLRs koji direktno prepoznaju strukturne komponente mikroba i aktiviraju imunski sistem[29]. TLR pripadaju tipu 1 integralnih membranskih glikoproteina koje karakteriše vanćelijski/intraendozomalni domen koji sadrži različit broj leucinom-bogatih motiva (LRRs) i citoplazmatski domen koji deli homologiju sa receptorom za IL-1 (IL-1R) koji se naziva Toll/IL-1R domen homologije (TIR)[29]. Mogu se nalaziti na površini (TLR1, 2, 4, 5 i 6), ili unutar ćelije kao deo endozomalnog odeljka (TLR3, 7, 8 i 9)[3,4,30,31]. TLR1 do 9 imaju visok stepen homologije između miševa i ljudi, dok se funkcionalan TLR10 nalazi kod ljudi a kod miševa je polovina gena za TLR10 zamenjena nefunkcionalnom sekvencom. Sa druge strane, mišji TLR11 je u potpunosti funkcionalan, dok se u humanom genu za TLR11 nalazi stop kodon koji onemogućava translaciju ovog gena[3]. Struktura TLR, iako u osnovi ista, se ipak razlikuje između različitih klasa TLR-ova. Ektodomeni TLR mogu biti homodimeri, kao kod TLR3, 4, 5, 8 i 9, ili heterodimeri kao kod TLR1 i 2, odnosno TLR2 i 6[32]. Do formiranja homo i heterodimera dolazi usled istovremenog vezivanja liganda u LRR regionima receptora[33].



Slika 4. Strukture TLR i interakcija sa ligandima.[33]

TLR imaju ulogu da prepoznaju širok spektar patogena i tako učestvuju u odbrani organizma. Svaki TLR ima svoje ligande koje prepoznaje, odnosno aktivatore u čijem prepoznavanju učestvuje.

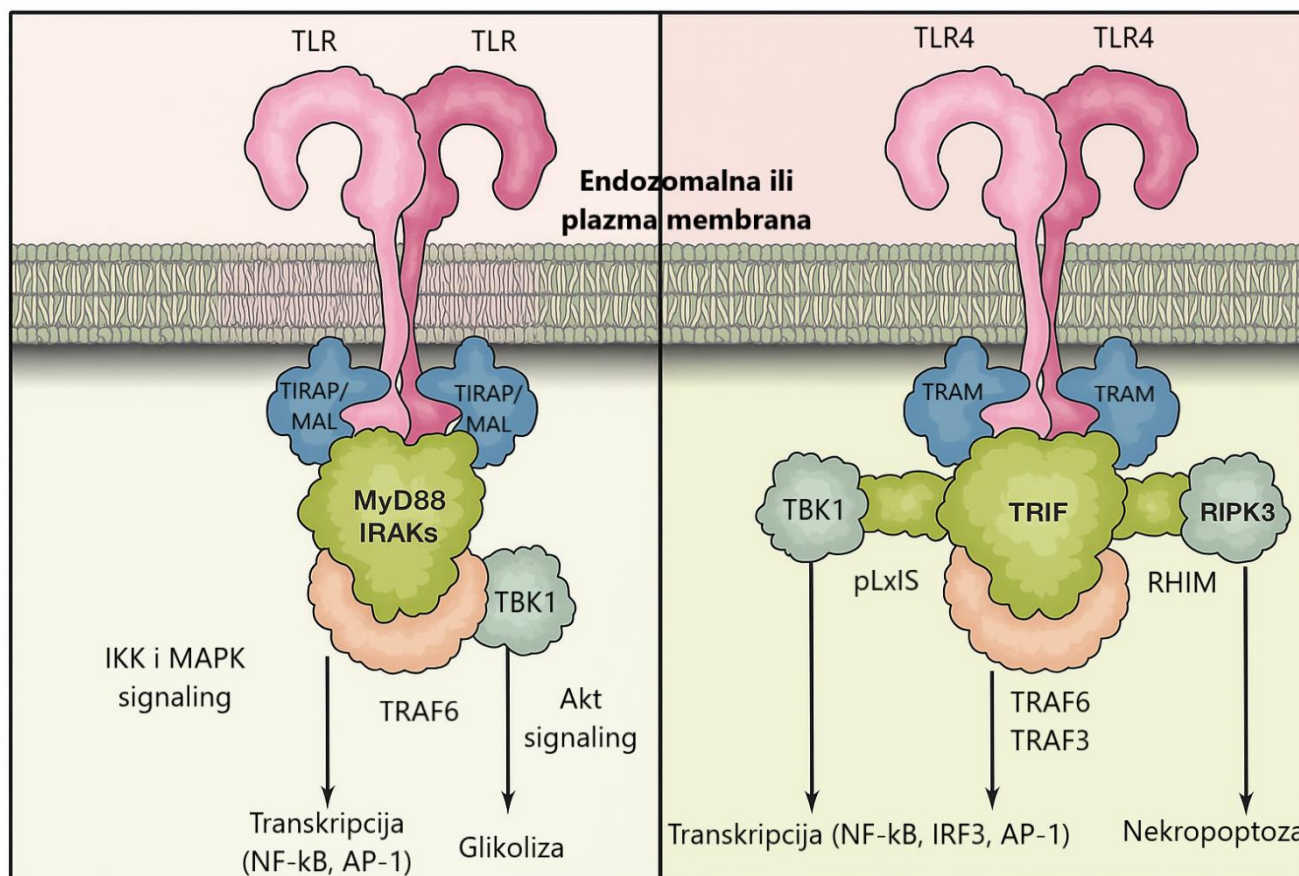
TLR4 prepoznaje LPS, strukturnu komponentu bakterijskog zida, TLR5 flagelin, dok TLR1, 2 i 6 prepoznaju bakterijske lipoproteine[32]. TLR u unutrašnjosti endozoma detektuju nukleinske kiseline, pa tako TLR3 prepoznaje dvolančanu RNK, TLR7 i 8 jednolančanu RNK, TLR9 nemetilovane CpG, i TLR13 bakterijsku ribozomalnu RNK. Ovi receptori se ne nalaze samo na ćelijama imunskog sistema, već su rasprostranjeni i na drugim ćelijama u organizmu. U epitelnim ćelijama, funkcije ovih receptora su posebno bitne zbog konstantne izloženosti patogenima[34]. Posredstvom TLR, aktiviraju se specifični mehanizmi odbrane od mikroorganizama i virusa koji dolaze u kontakt sa intestinalnom i respiratornom mukozom[34]. Ne samo na različitim ćelijama, već i aktivirani od strane raznolikih klasa jedinjenja, značaj TLRova nastavlja da raste. Pored njihove zaštitne uloge u imunosti, postaje jasnija i uloga TLRova u održavanju homeostaze organizma[35].



Slika 5. TLR i njihovi aktivatori[32]

2.3.1 TLR4

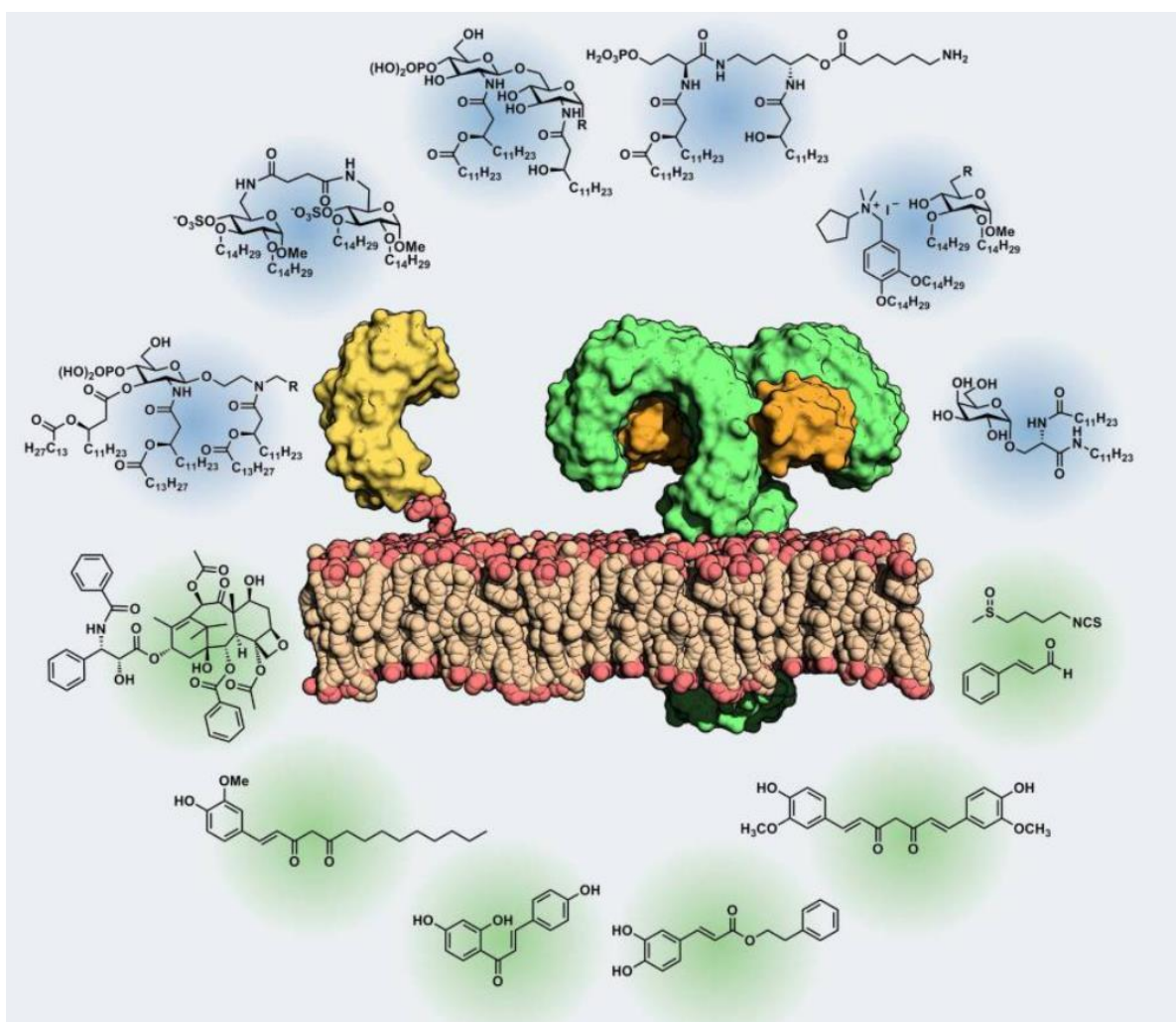
Najproučavaniji TLR, TLR4 je posebno značajan zbog svoje sposobnosti da inicira inflamaciju kao odgovor na veliki broj egzogenih i endogenih aktivatora[3]. Aktivacija TLR4 je prilično jedinstvena u poređenju sa aktivacijom ostalih TLR, jer uključuje aktivaciju dva različita signalna puta, MyD88 i TRIF-zavisne puteve[4,36]. MyD88-zavisni put dovodi do brze aktivacije NF- κ B i MAPK, što rezultira proizvodnjom proinflamatornih citokina[4,37]. Aktivacija TRIF-zavisnog puta dovodi do aktivacije IRF3 i ekspresije interferona tipa 1[4].



Slika 6. Signalna transdukcija preko TLR4. [32]

Da bi došlo do transdukcije signala preko TLR4, mora se uspostaviti kontaktna površina između TLR4 i ko-receptora MD2, događaj koji prati LPS-izazvanu dimerizaciju dva TLR4-MD2 dimera[33]. LPS istovremeno ostvaruje kontakt sa hidrofobnim džepom unutar MD2 i površinom TLR4[33]. MD2 je rastvorni protein koji je pre svega prepoznat kao neophodan da bi se ostvarila aktivacija TLR4 posredstvom LPS liganda[38,39], upravo zbog toga što sadrži dubok hidrofobni džep između dve β ploče[38]. Za razliku od TLR1, 2 i 3, koji se direktno vezuju za svoje ligande, to nije slučaj sa TLR4, gde nema direktnog kontakta sa LPS-om već se interakcija ostvaruje preko MD2[38]. Osim MD2, za aktivaciju TLR4 je neophodan i adaptorski protein CD14. CD14 je membranski protein koji se eksprimira na površini ćelije, i koji je neophodan za prepoznavanje LPS-a[38]. U nedostatku CD14, postoje ligandi koji ipak mogu aktivirati TLR4, kao Lipid A, međutim zabeležena aktivacija rezultuje signalizacijom samo preko MyD88 ali ne i TRIF signalnog puta[38].

LPS je snažan stimulator urođenog imunskog sistema, čije se prepoznavanje odvija preko TLR4 [40]. Priroda njihovih interakcija i aktivacija signalnih puteva u ćeliji je jako dobro okarakterisana, što doprinosi širokom korišćenju LPS-a kao model aktivatora imunskog sistema u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima [39]. Iako je LPS prepoznat kao tradicionalni i najviše proučavani ligand TLR4, neprestano se otkrivaju novi ligandi TLR4[41–44]. TLR4 pokazuje i sinergistički efekat sa drugim TLRovima, kao na primer kod aktivacije protozoma *Toxoplasma gondii*, gde dolazi do aktivacije i TLR4 i TLR2 koji sinergistički dovode do razvijanja imunskog odgovora i odbrane organizma od ovog patogena[45]. Osim bakterijskih liganda, TLR4 prepoznaje širok spektar liganda koji potiču od virusa (proteine kapsida virusa, RSV, MMTV), gljiva (manani, npr iz *Candida albicans*) ili mikoplazmi, a takođe može biti aktiviran i od strane endogenih faktora poznatih kao molekulski obrasci povezani sa oštećenjem (DAMPs)[29,46]. DAMPs koji se oslobađaju kao posledica povrede i inflamacije mogu igrati ulogu endogenih agonista TLR4[46]. U ovu grupu spadaju β -defenzin, HMGB1 protein, proteini toplotnog šoka (HSP, i to HSP60 i 70), fibrinogen, hijaluronska kiselina, heparin sulfat i mnogi drugi[46].



Slika 7. Struktura kompleksa TLR4, MD2 i CD14 koreceptora, sa strukturama prirodnih (zeleno) i sintetičkih (plavo) liganada. [46]

2.4 Alergeni kao aktivatori imunskog sistema

Alergije predstavljaju ozbiljan problem u razvijenim zemljama, gde broj alergičnih osoba iznosi oko 25%, i u konstantnom je porastu[47]. Alergijska inflamacija je ranije bila jednostavno opisana kao umrežavanje alergen-specifičnog IgE na mast ćelijama i bazofilima i aktivacija CD4⁺ T ćelija koja vodi proizvodnji Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-13)[6]. Međutim, danas je poznato da se ovaj proces odlikuje brojnim kompleksnim i međusobno povezanim interakcijama između APC i ćelija epitelnih barijera.

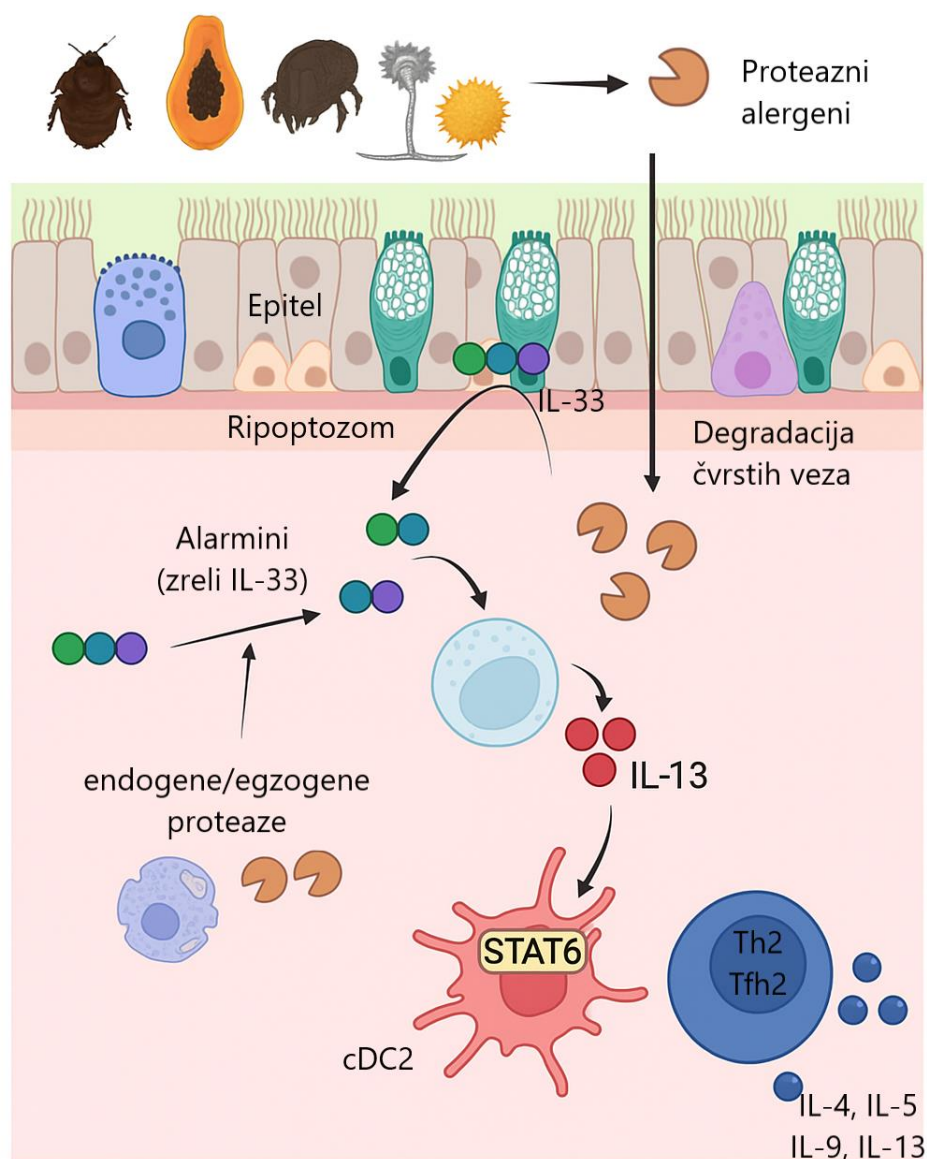
Proteolitička aktivnost je jedno od svojstava koje se danas prepoznaje kao ključno u izazivanju alergijske reakcije i inflamatornog odgovora[6]. Proteolitička aktivnost nema samo uticaj na sam alergen već i na druge nealergene proteine koji se potencijalno nalaze u smeši sa proteazom[6]. Inflamacija izazvana nealergenskim procesima može biti indukovana od strane proteaza, kao što su papain, Der p 1 i Der f 1[48,49]. Der p 1 dovodi do povećanog prisustva eozinofila kod pacijenata sa astmom. Proteazna aktivnost papaina izaziva narušavanje epitelne barijere i stres okolnog tkiva dovodeći do oštećenja i proizvodnje citokina IL-25, IL-33 i TSLP[48]. Ove proteaze mogu izazivati astmu nezavisnu od aktivnosti T-ćelija[48]. Neka istraživanja ukazuju na to da polarizacija Th2 ćelija pod uticajem papaina zahteva prisustvo dendritskih ćelija ali ne i bazofila[50].

Tabela 2. Proteazni alergeni i njihovi izvori. [6,51,52]

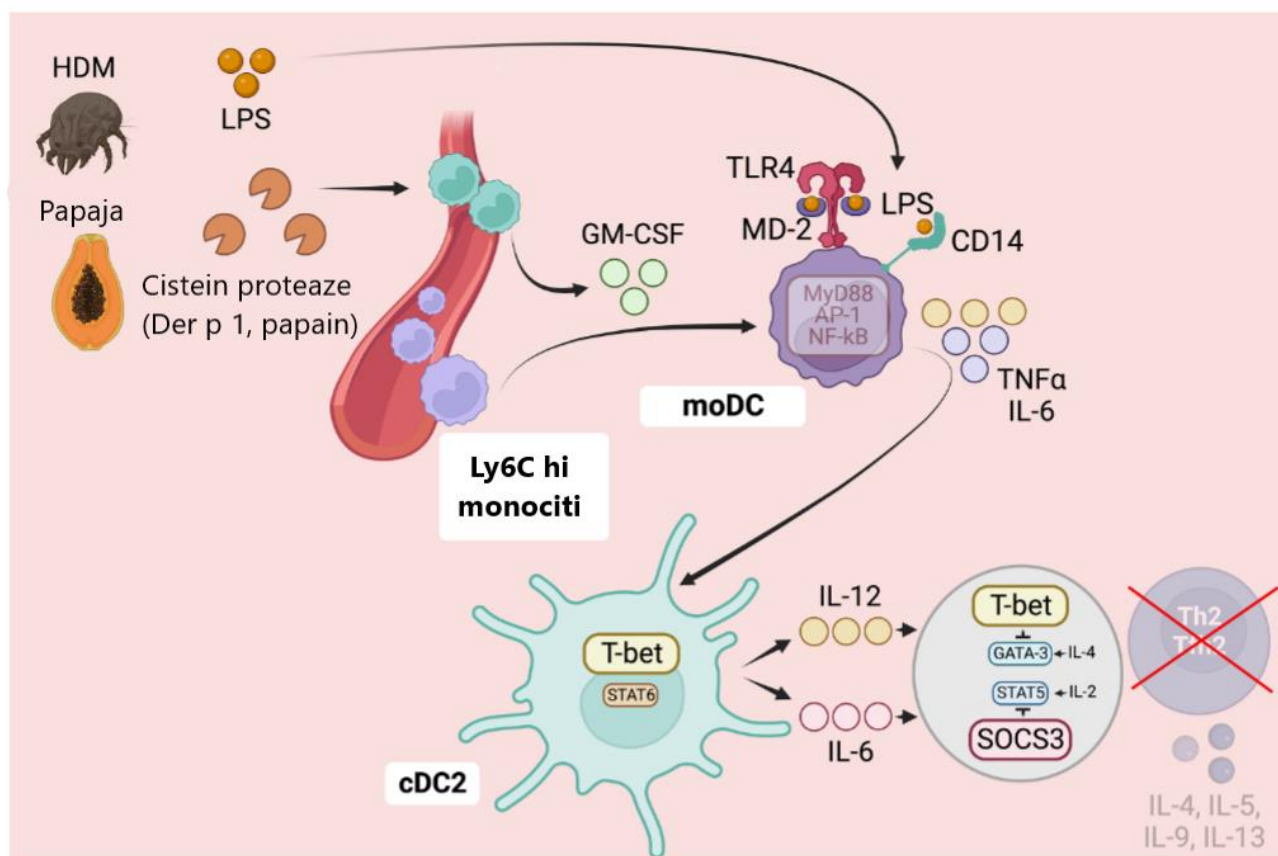
Izvor	Alergen	Tip proteaze	Efekat
Grinje kućne prašine (HDM)	Der p 1	Cistein	Sečenje proteina čvrstih veza
	Der f 1	Cistein	Aktivacija PAR2 Aktivacija TGFβ
Bubašvaba	Bla g 2	Inaktivna aspartat	Aktivacija PAR2
	Per a 10	Serin	Sazrevanje pro-MMP9
Gljive	<i>Aspergillus</i> grupa 13	Serin	Aktivacija PAR1 i 2 Sečenje proteina čvrstih veza
	<i>Penicillium</i> grupa 18	Serin	
	<i>Cladosporum</i> grupa 9	Serin	
Polen	<i>Phleum</i> grupa 1	Cistein	Sečenje proteina čvrstih veza
	<i>Lolium</i> grupa 1	Cistein	
Voće	Papain	Cistein	Sečenje proteina čvrstih veza Sazrevanje IL-33
	Bromelain	Cistein	
	Aktinidin	Cistein	

Prepoznavanje i preuzimanje alergena od strane APC se dešava preko različitih PRRs, pre svega preko TLR, manoznih receptora i visoko afinitetnih receptora za IgE[53]. Prepoznavanje alergena od strane epitelih ćelija se uglavnom dešava preko TLR, lektina C tipa ili receptora aktiviranih proteazama (PARs)[53]. PARs su transmembranski receptori kuplovani sa G proteinima koji su stimulisani uglavnom od strane serin proteaza[49]. Serin proteaze prvenstveno aktiviraju PAR1, PAR2 i PAR4, dok dostupni podaci ukazuju da cistein proteaze nisu u stanju da funkcionalno aktiviraju PARs[6,54,55]. PARs su eksprimirani na površini ćelija krvnih sudova, vezivnog tkiva, leukocita, epitelih ćelija, kao i ćelija koje oblažu respiratorne i gastrointestinalne puteve[49]. Nekoliko istraživanja je potvrdilo aktivaciju ovih receptora proteaznim alergenima. Pokazano je da cistein proteaza Der p 1 može da aktivira humani i mišji MRGPRC11 (Mas-uvezani-G-protein-kuplovani receptor), proteolizom njegovog N-terminalnog domena, što zatim dovodi do proizvodnje IL-6[56,57]. Pored toga, Der p 1 može da seče α-subjedinicu IL-2 receptora CD25 na T ćelijama, kao i CD23, čime podstiče sintezu IgE od strane B ćelija[58]. Proteaze široke specifičnosti mogu da aktiviraju TLR15 proteolizom njegovog

ektodomena, međutim isti efekat nije uočen sa serin i cistein proteazama uže specifičnosti kao što su tripsin i papain[42]. Što se tiče TLR4, iako njegova direktna aktivacija od strane proteaza nije još uvek dokumentovana, primećen je sinergistički efekat PAR i TLR4 gde dolazi do jedinstvene interakcije između ovih različito regulisanih receptora za prepoznavanje obrazaca koja dovodi do NF- κ B-posredovane inflamatorne reakcije[44,59]. Uloga MyD88 signalnog puta se takođe pokazala važnom u početnim fazama odgovora ćelija respiratornog epitela na papain[60]. Međutim, direktan efekat alergenijskih proteaza na TLR do sada nije detaljno ispitan i okarakterisan. Ovi procesi ukazuju da alergijska reakcija i inflamacija izazvane alergenijskim proteazama nisu rezultat isključivo prepoznavanja epitopa i paratopa već i posledica aktivacije specifičnih receptora urođenog imunskog sistema[6,61].



Slika 8. Uloga epitelnih ćelija u odgovoru na proteazne alergene. [54]



Slika 9. Uloga monocita u odgovoru na proteazne alergene. [54]

2.4.1 Cistein proteaze

Cistein proteaze su enzimi koji su deo ključnih ćelijskih procesa u biljkama, kao što su uklanjanje pogrešno uvijenih proteina, snabdevanje ćelija aminokiselinama, regulacija količine enzima koji učestvuju u metaboličkim putevima i sazrevanje proenzima i peptidnih hormona[62]. Cistein proteaze mogu u nekim slučajevima da služe i kao odbrana biljaka protiv insekata i gljiva. One su obično molekulske mase između 20 i 30 kDa, koriste cistein u svom katalitičkom mestu kako bi raskinule peptidnu vezu u proteinskim supstratima i imaju zajedničke fizičke i hemijske karakteristike ali različitu *pI* vrednost i molekulsku masu[63,64]. Osim biljnih alergena, papaina (Car p 1) iz papaje, bromelaina (Ana c 2) iz ananasa, i aktinidina (Act d 1) iz kivija, u ovu familiju se ubraja i alergen grinja kućne prašine, Der p 1, kao i alergen soje Gly m 1[62,65].

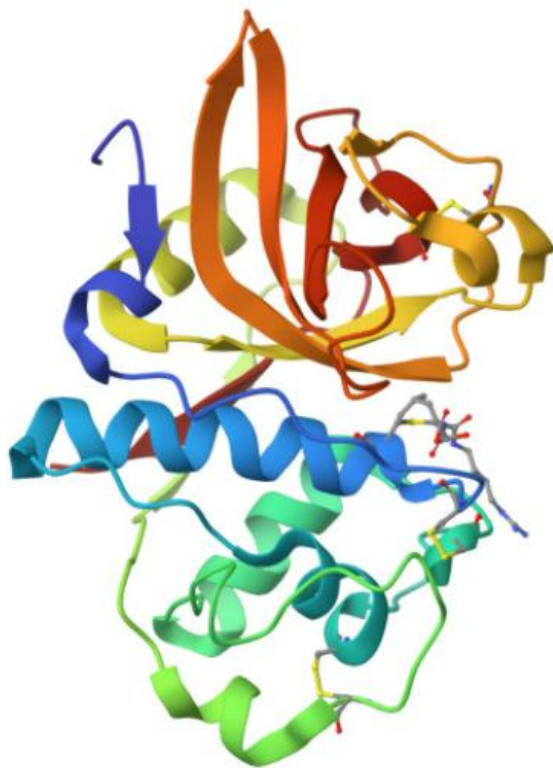
Inhibitor cistein proteaza, E64 (N-(N-(L-3-trans-karboksioksiran-2-karbonil)-L-leucil)agmatin) je prvo izolovan iz *Aspergillus japonicus*[66]. Okarakterisan je 1978. godine, kada je otkrivena njegova inhibitorna uloga. Ireverzibilno inhibira cistein proteaze iz papainske familije C1 peptidaza u koju spadaju aktinidin, papain, bromelain i ficin, tako što reaguje sa cisteinom iz aktivnog mesta enzima, što dovodi do promene konformacije proteina[66]. Kasnije su sintetisani i derivati E64, poput E64d ((2S,3S)-trans-epoksisukcinil-L-leucilamido-3-metilbutan etil estar), koji pre svega pokazuju veću mogućnost permeabilnosti u ćeliju. Ovaj molekul je pronašao i primenu u terapiji Alchajmerove bolesti[67].

2.4.2 Act d 1

Kivi (*Actinidia deliciosa*) pripada familiji *Actinidaceae* i poreklom je iz doline reke Jancegjang u Kini. Prvi prijavljeni slučaj alergijske reakcije na kivi datira iz 1981. godine[68]. Aktinidin (Act d 1) je identifikovan kao glavni alergen kivija u većini studija[69]. Glavni alergen je definisan kao molekul za koji se vezuju IgE antitela iz seruma preko 50% alergičnih pacijenata[70]. Pripada familiji C1 proteaza, odnosno cistein proteaza (EC 3.4.22.14)[71]. Sekvenca je u potpunosti poznata i čini je jedan polipeptidni niz od ukupno 380 aminokiselinskih ostataka i 3 disulfidna mosta koja stabilizuju njegovu strukturu. U okviru sekvence razlikujemo signalni peptid, propeptid i lanac zrele forme Act d 1. Na osnovu aminokiselinske sekvence pomoću bioinformatičkih alatki izračunata je teorijska pI vrednost zrele forme koja iznosi 4,37. Međutim, ekperimentalno određena vrednost se razlikuje od teorijske i iznosi 3,5[72]. Act d 1 pokazuje enzimsku aktivnost prema velikom broju raznovrsnih supstrata, i može se naći u plodu kivija i do 50% ukupnih proteina[73].

Tabela 3. Dužina aminokiselinske sekvence i molekulska masa Act d 1. Preuzeto sa UniProtKB (A5HII1).

	Pozicija u sekvenci	Broj aminokiselina	Molekulska masa (Da)
Signalna sekvenca	1-24	24	2616,26
Propeptid	25-126	102	12176,49
Lanac zrele forme	127-380	254	27415,29



Slika 10. 3D model strukture Act d 1 u kompleksu sa inhibitorom E64. Preuzeto sa PDB baze podataka (1AEC).

10	20	30	40	50	60
MGLPKSEFVSM	SLLFFSTLLI	LSLAFNAKNL	TQRTNDEVKA	MYESWLIKYG	KSYNSLGEWE
70	80	90	100	110	120
RRFEIFKETL	RFIDEHNADT	NRSYKVGLNQ	FADLTDEEFR	STYLGFTSGS	NKTKVSNRYE
130	140	150	160	170	180
PRVGQVLPSY	VDWRSAGAVV	DIKSQGECCG	CWAFSAIATV	EGINKIVTGV	LISLSEQELI
190	200	210	220	230	240
DCGRTQNTRG	CNGGYITDGF	QFIINNGGIN	TEENYPYTAQ	DGECNLDLQN	EKYVTIDTYE
250	260	270	280	290	300
NVPYNNEWAL	QTAVTYQPVV	VALDAAGDAF	KHYSSGIFTG	PCGTAIDHAV	TIVGYGTGG
310	320	330	340	350	360
IDYWIVKNSW	DTTWGEEGYM	RILRNVGGAG	TCGIATMPST	PVKYNNQNHP	KPYSSLINPP
370	380				
AFSMSKDGVP	GVDDGQRYSA				

Slika 11. Aminokiselinska sekvenca Act d 1. Preuzeto sa UniProtKB (A5HII1).

Act d 1 pokazuje snažan potencijal da izazove promene u gastrointestinalnom traktu, izazivajući morfološke ali i imunološke promene[74,75]. Svojstvo koje doprinosi potencijalu Act d 1 za senzitivizaciju je upravo njegova proteolitička aktivnost. Aktivni Act d 1 preživljava surove uslove gastrointestinalnog trakta i zadržava svoju proteolitičku aktivnost i nakon procesa digestije, što mu omogućava da netaknut i aktivan stigne do intestinalne mukoze[76].

U *in vitro* model sistemima na Caco-2 i T84 epitelnim ćelijama, kao i na *in vivo* mišjem modelu, je pokazano da ovaj alergen povećava propustljivost crevnog epitela, uglavnom degradacijom proteina koji ulaze u sastav čvrstih veza kao što su okludin i ZO-1[71,74,77–79]. U proteolitički aktivnoj formi on takođe utiče na povećanje ekspresije proalergenih citokina i proteina čvrstih veza, kao i na aktivaciju NF- κ B u epitelnim ćelijskim modelima *in vitro*[75]. Iako je njegov proinflamatorni efekat ispitan na epitelnim ćelijama, uticaj na drugim ćelijama imunskog sistema, konkretno antigen-prezentujućim ćelijama nije okarakterisan.

2.5 Mali molekuli kao modulatori NF- κ B posredovane inflamacije

S obzirom na važnu ulogu NF- κ B u inflamatornim procesima, on je postao atraktivna meta raznih antiinflamatornih agenasa. Veliki broj dokaza ukazuje na povezanost ovog signalnog puta sa patogeneom tumora, uključujući i čvste i tečne [19], čineći ga primamljivom metom za antitumorsku terapiju. Ovaj signalni put može biti blokiran u različitim koracima, uključujući i njegovu aktivaciju preko različitih stimulusa, translokaciju u nukleus i njegovo vezivanje za DNK[5]. Zaprvo, često korišćene supstance kao što su aspirin i drugi nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) blokiraju NF- κ B[5,16]. Oni inhibiraju IKK β zavisnu fosforilaciju I κ B α , time sprečavajući njegovu degradaciju i aktivaciju NF- κ B transkripcionog faktora[5]. Glukokortikoidi poput prednizona su jedni od najpotentnijih antiinflamatornih agenasa koji se koriste u terapiji, i oni dovode do transkripcione represije citokina i adhezivnih molekula. Osim toga, često se koriste i monoklonska antitela, citokini, vakcine i same ćelije imunskog sistema za terapiju[5,80]. Iako oni ne ciljaju nužno komponente NF- κ B signalnog puta, pokazalo se da je ostvarivanje njihovog efekta ipak povezano sa ovim signalnim putem [5,16].

Rezultati dobijeni u eksperimentima izvedenim na *knock out* miševima ili *in vitro* ćelijskim linijama, ukazuju na centralni značaj IKK komponente i njen uticaj na aktivaciju i održanje inflamatornog odgovora[5]. Zbog toga se smatra da su ova komponenta, ali i neke druge komponente NF- κ B signalnog puta, veoma dobre mete za modulaciju aktivnosti NF- κ B signalnog puta. Poslednjih godina je ova tema postajala sve zanimljivija. Došlo se do otkrića mnogih različitih modulatora, ali mali broj njih je zapravo odobren za humanu upotrebu od strane regulatornih tela, pre svega zbog i dalje nerazjašnjenog delovanja ovih supstanci na ostale signalne puteve i celokupno na organizam. Iako je NF- κ B signalni put detaljno proučen i dalje se ne može zasigurno znati kako će modulacija njegove aktivnosti uticati na ostale procese u ćeliji. Pristupi u terapiji koji ciljaju NF- κ B, moraju prvenstveno uzeti u obzir i njegove razne uloge i u drugim procesima u organizmu i mogućnosti da se oni nesmetano odvijaju[81]. Negativni regulatori NF- κ B često utiču i na procese koji su neophodni u pravilnom odvijanju regulacije inflamacije, zbog toga što NF- κ B aktivacija funkcioniše po principu povratnog mehanizma, pružajući signal neophodan za pravilnu regulaciju njene aktivacije i održavanje homeostaze[82]. Zbog toga svaki pomeraj ove ravnoteže može imati značajne biološke posledice po organizam[82]. Potencijalni pristupi u inhibiciji NF- κ B uključuju inhibiciju specifičnih receptora koji vode aktivaciji ovog signalnog puta, kao što je aktivacija TLR4 posredstvom LPS liganda, gde se koriste mali molekuli za ometanje vezivanja liganda za receptor, odnosno za pojedine komponente TLR4/LPS signalne kaskade[83].

Danas, postoji preko 800 prijavljenih inhibitora NF- κ B signalnog puta i bez sumnje će još mnogi biti otkriveni u budućnosti [5,7]. Značaj ovih modulatora NF- κ B signalnog puta se ogleda u prevenciji prekomerne sinteze hemokina i citokina na mestima gde dolazi do imunskog odgovora, u terapiji određenih bolesti ili pri vakcinaciji, gde je poželjno aktivirati imunski sistem ali izbeći sistemsku inflamaciju i neželjene efekte [7,15].

Tabela 4. Molekuli koji ciljaju NF- κ B signalni put. [16]

Inhibitori NF- κ B	Molekul	Mehanizam
I κ B proteini otporni na proteolizu	I κ B mutant	Zadržava NF- κ B protein u citoplazmi i sprečava translokaciju
Glukokortikoidi	Deksametazon	Izaziva ekspresiju I κ B α
	Prednizon	Održava NF- κ B u neaktivnom obliku
NSAID	Aspirin	Specifična inhibicija vezivanja ATP za IKK β
	Na-salicilat	
Imunosupresivni agensi	CsA	Nekompetitivni inhibitor 20S proteazoma
	Tacrolimus (FK-506)	Blokira translokaciju c-Rel u nukleus
CyPG		Modifikuje cistein na aktivacionoj petlji IKK β
Inhibitori proteazoma	Laktacistin	Aciluje Thr na subjedinici proteazoma
	Peptidi boronske kiseline	Potentni inhibitori funkcije proteazoma
Prirodni proizvodi	Flavonoidi	Inhibiraju NF- κ B aktivnost i indukuju apoptozu

2.5.1 Prednosti malih molekula

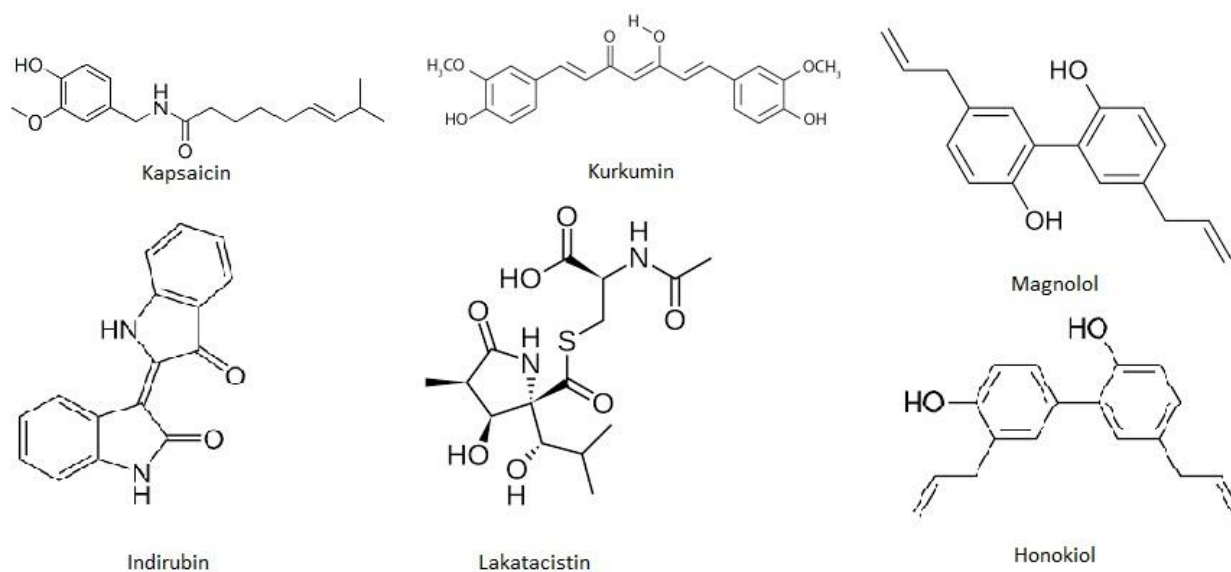
Zbog ogromnog značaja regulacije NF- κ B u inflamatornim i malignim oboljenjima, danas postoji puno strukturno i funkcionalno različitih vrsta inhibitora. Koriste se monoklonska antitela, oligonukleotidi, male ometajuće RNK, mali molekuli i peptidi[80]. Svaka klasa inhibitora, naravno, ima svoje prednosti i mane. Molekuli kao što su oligonukleotidi i RNK imaju jako mali poluživot i

bioraspoloživost, dok antitela zahtevaju komplikovan i skup proces proizvodnje i nemaju uvek specifično dejstvo na NF- κ B[5]. U poslednje vreme, velika pažnja se poklanja peptidima, tako da danas postoje razni ćelijski permeabilni peptidi koji selektivno ciljaju NF- κ B komponente i pokazuju zadovoljavajuće rezultate u kontroli inflamacije. Peptidi kao što su SN50 i PTD-p65, su jako skupi i svoj optimalni efekat ispoljavaju ukoliko se primene u velikoj količini, što opet povećava cenu tretmana[8]. Proizvodnja ovakvih peptida na velikoj skali se pokazala jako zametnom, naravno i jako skupom, što ograničava njihovu primenu u terapijske svrhe u kliničkom okruženju[5]. Peptidi jako često imaju i veliku masu, što ih čini jako dobrim imunogenima, što smanjuje njihovu efikasnost[5]. Zbog svih ovih razloga, bilo bi idealno ispitivati male molekule koji nemaju problem dostavljanja u ćeliju jer su većina ćelijski permeabilni i imaju relativno dobro vreme poluživota[80]. Takođe, zbog svoje veličine nisu dobri imunogeni i ne bivaju često ciljani za razgradnju od strane ćelijskih mehanizama[5]. Za razliku od njih nukleinske kiseline i peptidi bivaju brzo razgrađeni od strane ćelijskih nukleaza i proteazoma [5,8]. Problem koji se često susreće sa malim molekulima je njihova rastvorljivost, jer su često, zbog svoje lipidne prirode, slabo rastvoljivi u vodenim rastvorima pa se moraju koristiti alternativni rastvarači[8].

2.5.2 Mali molekuli izolovani iz prirodnih proizvoda

Postoji dosta molekula poreklom iz prirodnih proizvoda za koje je poznato da imaju efekat na NF- κ B signalni put. Sekundarni metabolizam biljaka generiše gotovo neiscrpan izvor hemijski raznolikih bioaktivnih i farmakološki aktivnih supstanci[46]. Biljni ekstrakti predstavljaju veliki izvor prirodnih imunomodulatora, od kojih se mnogi koriste u tradicionalnoj medicini vekovima unazad[46]. Mali molekuli izvedeni iz biljaka uključuju više različitih klasa jedinjenja kao što su fenoli i polifenoli, lignani, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni[9]. Ovi molekuli često ispoljavaju i antioksidativna svojstva[9]. Neki od njih su kofeinska kiselina, feniletil estar, kapsaicin, kurkumin, magnolol, honokiol, resveratrol, kvercetin i laktacistin[5,9]. Prva dva blokiraju aktivaciju NF- κ B posredovanu TNF, dok laktacistin inhibira 20S i 26S proteazome koji su odgovorni za degradaciju I κ B komponente. Kapsaicin, magnolol, honokiol i kurkumin su jedni od najbolje istraženih, sa dokazanim antioksidativnim i imunomodulatornim efektima[84–86]. Osim direktne inhibicije NF- κ B, ekstrakti biljaka kao i pojedinačni izolovani molekuli pokazuju efekat na TLR4 aktivaciju i prenos signala u ćeliju. Neki od njih uključuju ekstrakte zelenog čaja, *Glycyrrhiza uralensis*, *Magnolia officinalis*, đumbira i kurkume, dok su kao pojedinačni molekuli definisani kurkumin, morfin, nalokson, kofeinska kiselina, cinamaldehyd i drugi[46].

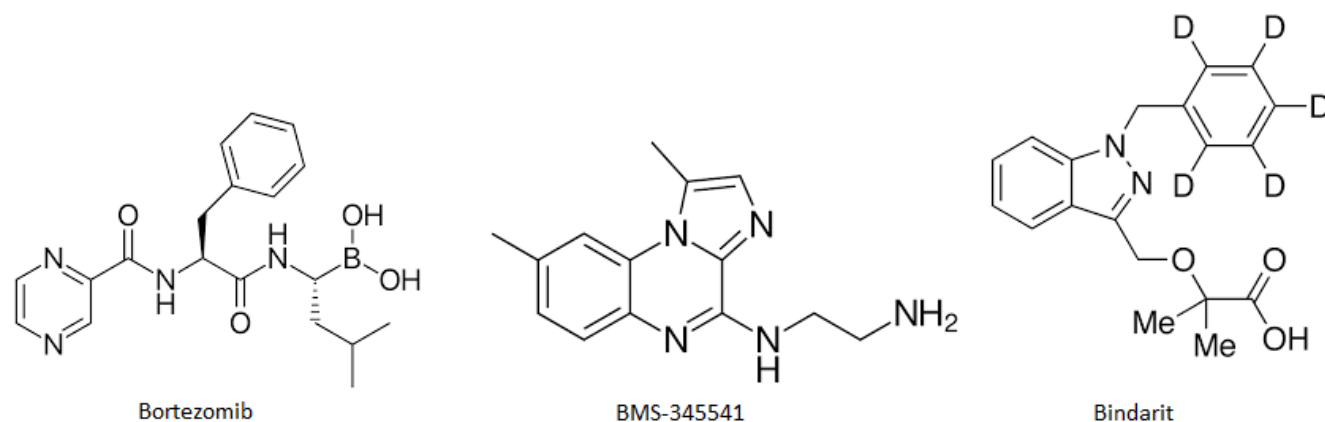
Prednost navedenih molekula je upravo njihovo poreklo. Iako izolovanje pojedinačnih komponenti može biti veoma teško, u pojedinim slučajevima niska cena i pristupačnost ovih prirodnih proizvoda nadmašuje potencijalni problem izolovanja. Međutim, u mnogim slučajevima kada postoji prirodni ekstrakt koji pokazuje fiziološka dejstva, teško je utvrditi tačno koja supstanca iz te komplikovane smeše je odgovorna za željeni efekat. Iako se dosta istraživača fokusiralo na sintetičke inhibitore, poslednjih godina se mnogo veća pažnja posvećuje malim molekulima iz prirodnih proizvoda i njihovoj potencijalnoj primeni u terapiji inflamatornih bolesti. [87]



Slika 12. Struktura inhibitora NF-κB poreklom iz prirodnih proizvoda.

2.5.3 Sintetički mali molekuli

Usled porasta interesovanja za molekule koji ispoljavaju inhibitoro dejstvo na NF-κB signalni put, došlo je i do porasta sitetičkih inhibitora. Prednost ovakvog pristupa je da ovi molekuli mogu da se modifikuju tako da dobiju neke željene osobine, kao što je duži polужivot, veća čistoća dobijenog preparata ili veća specifičnost odnosno selektivnost za pojedine NF-κB komponente[5,23]. Mana ovog pristupa je naravno nivo zahtevnosti rada i cena, koja je u svakom slučaju veća nego kada su u pitanju inhibitori poreklom od prirodnih proizvoda. Često je meta sintetički dobijenih inhibitora IKKβ komponenta i njena selektivna inhibicija. Iako se ova komponenta uspešno inhibira, efekat je uglavnom delimičan[5,19]. Bortezomib je jedan od sintetičkih inhibitora koji uspešno inhibira proteazom 26S[88].



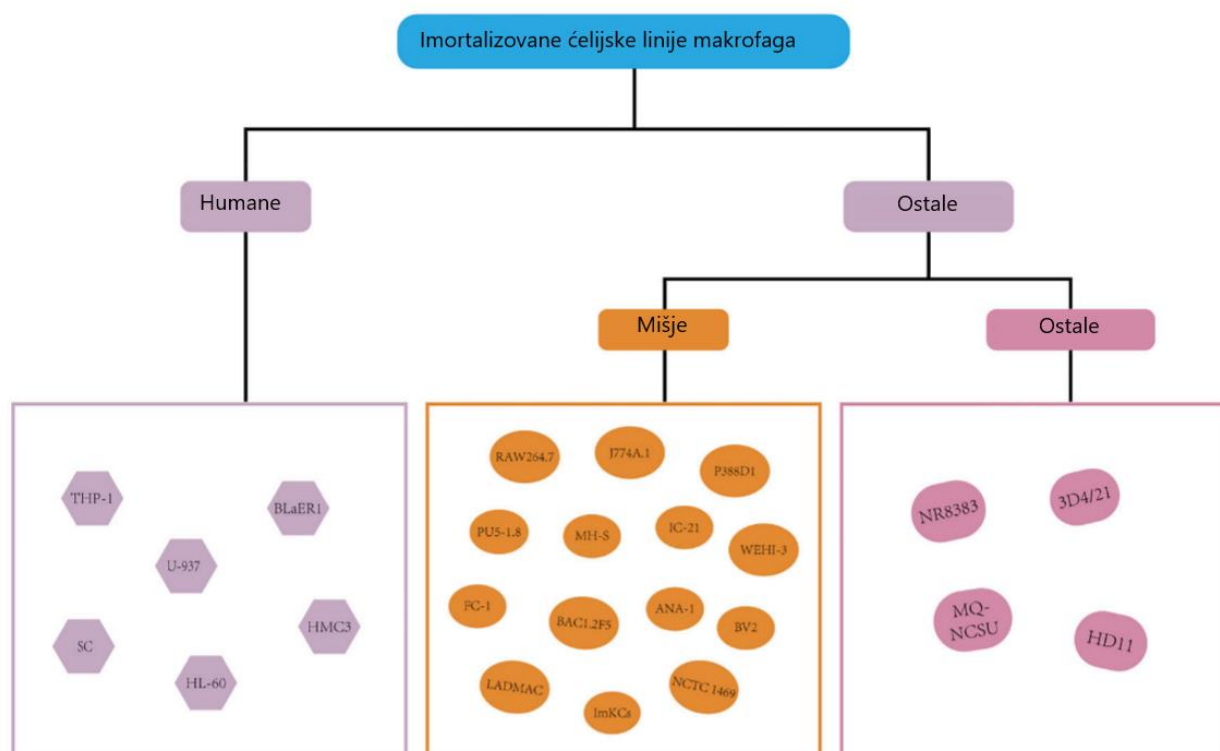
Slika 13. Struktura sintetičkih inhibitora NF-κB.

2.6 *In vitro* model sistemi urođenih ćelija imunskog sistema

Antigen-prezentujuće ćelije su važan deo sistema urođene imunosti i uključene su u inflamatorne procese, sa ključnom sposobnošću da proizvode širok spektar različitih citokina kao odgovor na

stimuluse. Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMCs) su heterogena populacija ćelija koje predstavljaju primarni izvor imunskih ćelija koje se koriste u *in vitro* istraživanjima. Mogu se diferencirati u makrofage, i pokazano je da stabilno eksprimiraju površinske markere neophodne za prezentaciju antigena kao i da pod uticajem stimulusa menjaju svoj citokinski profil[89]. Iako bi istraživanje na primarnim makrofagima izolovani iz krvi ili tkiva donora imalo najveći fiziološki značaj, njih je teško realizovati jer se primarni makrofagi ne mogu umnožavati *ex vivo* i nisu lako dostupni. Zbog niske zastupljenosti makrofaga potrebno je obezbediti veliku količinu krvi kao polaznog materijala ili ih izolovati iz specifičnih tkiva što uglavnom podrazumeva veoma invazivne procedure[90]. Ograničen broj ćelija koje se mogu izolovati iz biološkog materijala predstavlja poseban izazov i nameće potrebu za radom na imortalizovanim ćelijskim linijama koje se mogu propagirati *in vitro*[90]. Monocitne ćelijske linije i različiti postupci diferencijacije se često koriste kako bi se dobile ćelije koje bi oslikavale funkciju makrofaga *in vitro*[90]. Pored neograničenog broja ćelija, ćelijske linije nude ključne prednosti, kao što su genetska uniformnost i reproduktivnost[91].

Mišji makrofagi dobijeni diferencijacijom ćelija koštane srži miševa se koriste u mnogim laboratorijama kao standardna praksa za različita imunološka istraživanja[89]. Iako se suočavaju sa sve većim etičkim ograničenjima, kao i komplikovanim procedurama, dobijanje makrofaga izvedenih iz koštane srži (BMDMs) i dalje ima ključni značaj, posebno u istraživanjima koja koriste miševe deficijentne za određene gene, posebno za komponente signalnih puteva značajnih u transdukciji signala i neokarakterisanih stimulusa[89]. RAW264.7 je imortalizovana ćelijska linija mišjih makrofaga izolovanih iz BALB/c miša koja pokazuje snažnu sposobnost fagocitoze i uspešno se koristi za *in vitro* istraživanja u polju inflamacije, apoptoze i tumorske imunosti[89]. Iako se ova ćelijska linija pokazala odličnom za preliminarna istraživanja, pri tumačenju rezultata treba uzeti u obzir da se intenzivnim pasažiranjem može promeniti njihova funkcionalnost u odnosu na primarne humane makrofage[89].



Slika 14. Imortalizovane ćelijske linije makrofaga. [89]

Od humanih model sistema, THP-1 ćelijska linija monocita humane akutne leukemije, našla je široku primenu u *in vitro* izučavanju imunskih odgovora monocita, makrofaga i dendritskih ćelija [92]. Za diferencijaciju THP-1 monocita u makrofage mogu se koristiti različiti agensi, uključujući forbol-12-miristat-13-acetat (PMA), $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D3 (vD3) i faktor stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF)[91]. Funkcionalne karakteristike zavise od tipa agensa koji se koristi za diferencijaciju makrofaga. Tako se u prisustvu vD3 diferenciraju makrofagi sa smanjenim fagocitnim sposobnostima i smanjenom proizvodnjom proinflamatornih citokina. Do sada, THP-1 monociti su uspešno diferencirani u naivne makrofage pod dejstvom PMA, koji su sposobni da se dalje polarizuju u M1 ili M2 fenotip pod dejstvom istih stimulusa koji *in vivo* podstiču polarizaciju makrofaga[93,94]. Pokazano je da makrofagi dobijeni diferencijacijom pomoću PMA stabilno ekspimiraju 49 površinskih markera, uključujući receptore za komplement, lektine C tipa i skevendžer receptore[95]. Takođe, oni ekspimiraju većinu TLR i uspešno su korišćene za proučavanje aktivacije raznih signalnih puteva, uključujući NF- κ B i MyD88[91]. Pored diferencijacije u makrofage, THP-1 monociti se uspešno mogu *in vitro* diferencirati u ćelije nalik dendritskim ćelijama, pokazujući jasne razlike u ekspresiji citokina ali i komponenti signalnih puteva neophodnih za funkcionisanje oba tipa APC[96]. Pored THP-1 ćelija, U937 ćelije limfoma su humani monociti koji se takođe mogu diferencirati u makrofage pomoću PMA i koristiti kao *in vitro* model sistem. Razlika između ove dve ćelijske linije je u poreklu i zrelosti ćelija[89,91]. U937 su poreklom iz solidne mase histocitnog limfoma i pokazuju viši nivo zrelosti, i iako se na sličan način kao i THP-1 mogu diferencirati u makrofage, pokazuju ključne razlike u odgovorima na iste stimulse [91,97].

Razvoj stabilnih modela antigen-prezentujućih ćelija podstaknut je potrebom za njihovim proučavanjem i ograničenjima istraživanja na životinjama, posebno na makrofagima koji su ključni za urođeni imunski sistem. Kako svaki model sistem ćelija ima svoje prednosti i mane, prilikom odabira model sistema neophodno je pažljivo razmotriti njihovu funkcionalnost kao i primenljivost, da bi se dobila optimalna, fiziološki relevantna mikrosredina[89].

3 Ciljevi

Aktivacija NF- κ B signalnog puta i otključavanje gena povezanih sa ovim transkripcionim faktorom su od ključnog značaja u procesu inflamacije i uspostavljanju imunskog odgovora. S obzirom da predstavljaju prvu liniju odbrane organizma, od posebnog je značaja aktivacija NF- κ B signalnog puta u ćelijama urođenog imunskog sistema, kao što su makrofagi i epitelne ćelije. Karakterizacija stimulusa koji dovode do razvijanja imunskog odgovora na optimizovanim model sistemima otvara vrata za ispitivanje imunomodulatornih efekata raznih molekula, pre svega malih bioaktivnih molekula, lako dostupnih iz prirodnih proizvoda.

Predmet rada ove doktorske disertacije je ispitivanje i karakterizacija prirode odgovora ćelija urođenog imunskog sistema na proinflamatorne stimuluse Act d 1, cistein proteaze i glavnog alergena kivija, i njegovo poređenje sa odgovorom na stimulaciju nižim koncentracijama LPS-a, dobro definisanim proinflamatornim stimulusom. U prvom delu ove doktorske disertacije definisani su sledeći ciljevi:

- Izolovanje i prečišćavanje enzimski aktivnog alergena Act d 1 iz ploda kivija
- Karakterizacija proinflamatornog efekta Act d 1, u poređenju sa LPS-om, u epitelnim ćelijama i makrofagima *in vitro*
- Analiza molekulskog mehanizma aktivacije NF- κ B i TLR4 od strane Act d 1
- Ispitivanje uloge proteolitičke aktivnosti Act d 1 u procesu aktivacije NF- κ B i TLR4

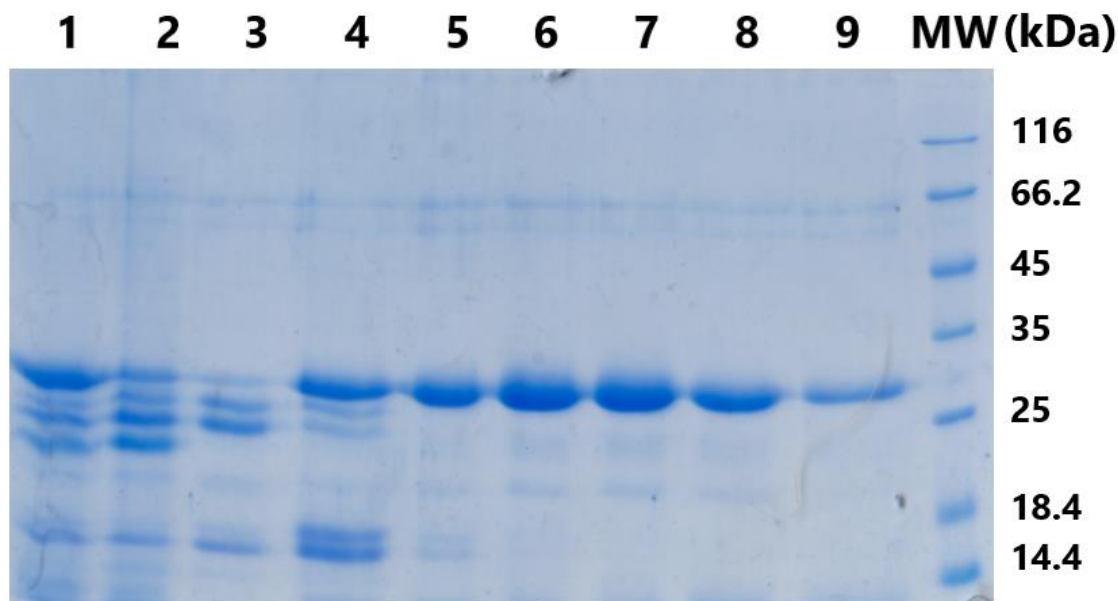
Nakon karakterizacije i definisanja molekulskog mehanizma kojim Act d 1 izaziva proinflamatorni efekat, ispitiće se imunomodulatorni potencijal odabranih bioaktivnih malih molekula, u model sistemu THP-1 makrofaga. U drugom delu ove doktorske disertacije definisani su sledeći ciljevi:

- Upostavljanje stabilne kulture THP-1-diferenciranih makrofaga i njena morforloška i fenotipska karakterizacija
- Ispitivanje imunomodulatornog efekta odabranih malih molekula na proizvodnju i ekspresiju proinflamatornih citokina, aktivaciju NF- κ B signalnog puta i njegovih specifičnih komponenti
- Uticaj odabranih malih molekula na promenu fenotipa i polarizaciju THP-1-diferenciranih makrofaga
- Analiza antioksidativnog potencijala odabranih malih molekula na modelu THP-1-diferenciranih makrofaga

4 Naši radovi

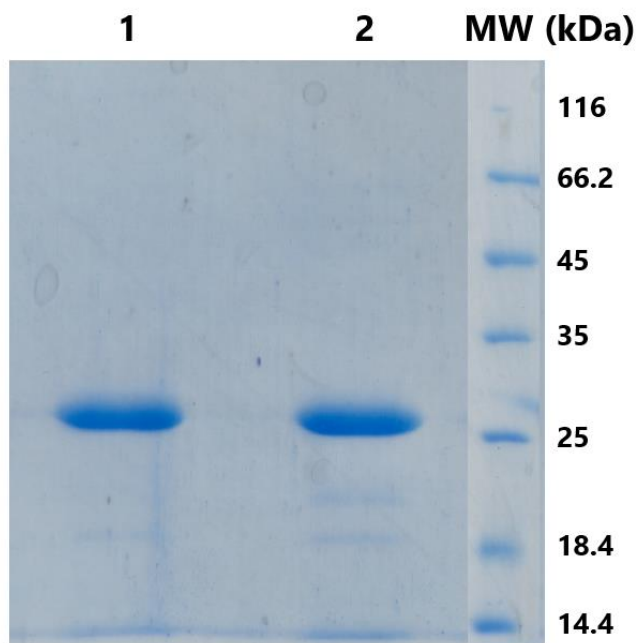
4.1 Izolovanje Act d 1

Nakon pripreme ekstrakta zelenog kivija po opisanom postupku, Act d 1 je iz ekstrakta izolovan kombinacijom dve različite jonoizmenjivačke hromatografije. Korišćeni su matriksi QAE-Sephadex A-50 i SP-Sephadex C-50. Alikvoti iz svakog koraka prečišćavanja, analizirani su pomoću SDS PAG elektroforeze u redukujućim uslovima, kako bi se potvrdilo prisustvo i čistoća ciljnog proteina. Frakcije sakupljene nakon elucije sa QAE-Sephadex kolone su pokazale prisustvo prečišćenog proteina pri eluciji sa NaCl koncentracije 0,3-0,5 M, gde se uočava prisustvo dominantne trake molekulske mase oko 25 kDa, u skladu sa molekulskom masom Act d 1 (Slika 15).



Slika 15. SDS PAG elektroforegram prečišćavanja Act d 1 jonoizmenjivačkom hromatografijom na QAE-Sephadex koloni (gustina gela za razdvajanje 12%). 1) Ekstrakt nanesen na QAE-Sephadex matriks, 2) nevezani proteini, 3) frakcija eluirana sa 0,1 M NaCl, 4) frakcija eluirana sa 0,2 M NaCl, 5) i 6) frakcije eluirane sa 0,3 M NaCl, 7) i 8) frakcije eluirane sa 0,4 M NaCl, 9) frakcija eluirana sa 0,5 M NaCl, MW) proteinski markeri naznačenih molekulskih masa u kDa (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Frakcije gde je potvrđeno prisustvo prečišćenog Act d 1 su spojene, nakon čega je Act d 1 liofilizovan i skladišten na -20°C. Stabilnost liofilizovanog Act d 1 je potvrđena analizom na SDS PAGE nakon rastvaranja u PBS-u pH 7,4 do početne koncentracije (Slika 16). Iz 500 g kivija dobijeno je 120 mg prečišćenog Act d 1.

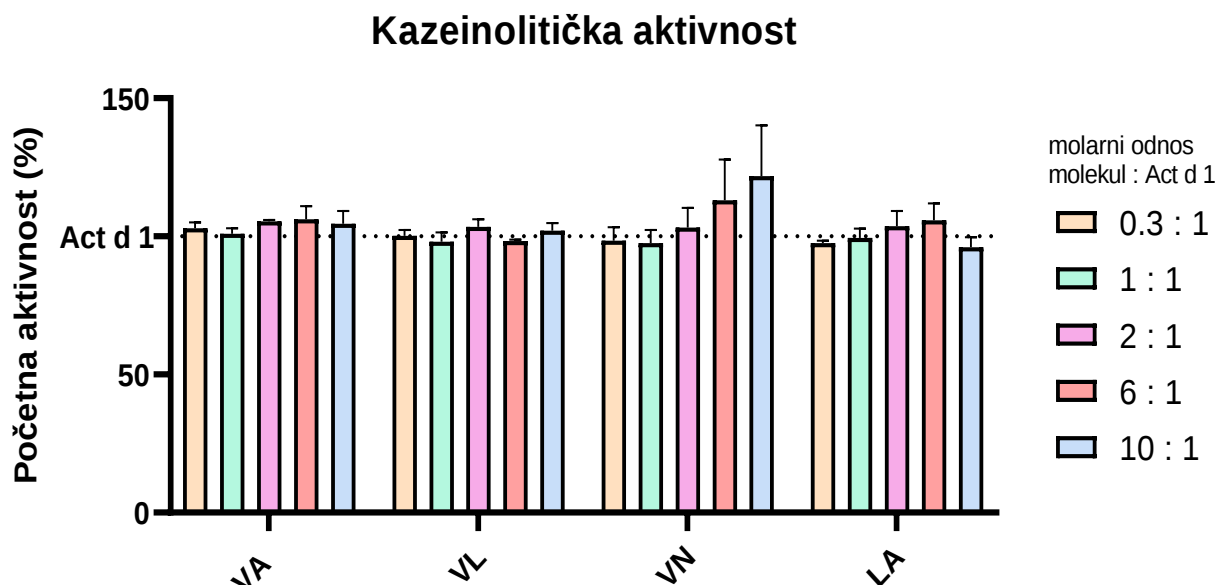


Slika 16. SDS PAG elektroforegram prečišćenog Act d 1. 1) spojene frakcije prečišćenog Act d 1, 2) Act d 1 nakon liofilizacije rastvoren u PBS-u pH 7,4, MW) proteinski markeri naznačenih molekulskih masa u kDa (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2 Karakterizacija prečišćenog Act d 1

Uzorcima prečišćenog proteina pre liofilizacije određena je koncentracija pomoću BCA i spektrofotometrijski, kao i sadržaj endotoksina. Koncentracija proteina je iznosila 0,75 mg/mL, dok je koncentracija endotoksina bila niža od 0,16 ng/mL odnosno 0,8 EU/mL korišćenog rastvora proteina koncentracije 1 mg/mL u svim analiziranim uzorcima.

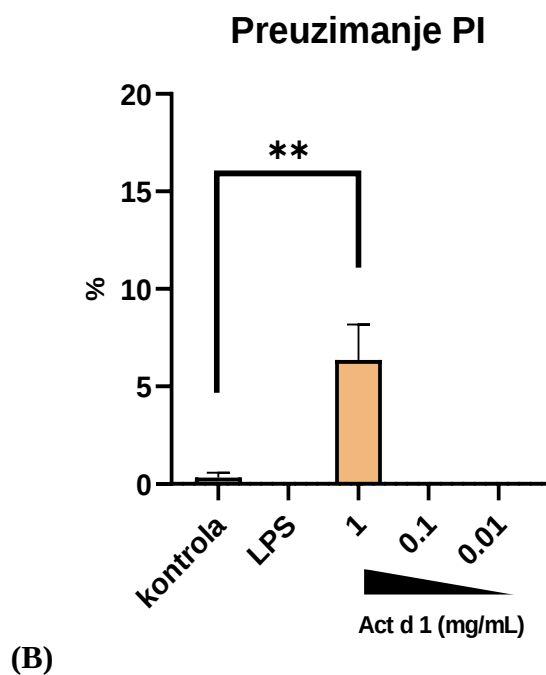
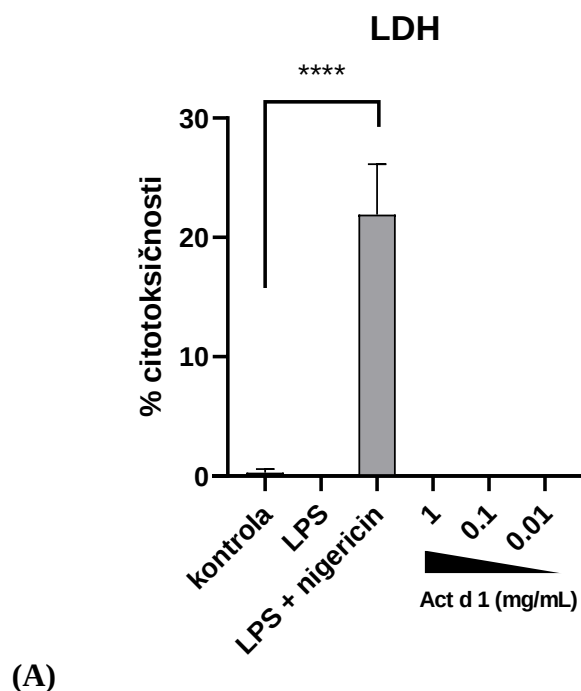
Proteolitička aktivnost Act d 1 je određivana pomoću kazeinolitičkog testa. Pre izvođenja testa, uzorci su inkubirani 1 h na 37°C u prisustvu 2 mM L-cisteina, kako bi se enzim aktivirao. Jedna jedinica kazeinolitičke aktivnosti je određena kao količina enzima koja rezultuje promeni apsorbance od 0,1 na 280 nm po minutu. Enzimska aktivnost aktiviranog uzorka Act d 1 određena je u odsustvu i prisustvu različitih vaniloida (VA, VN i VL) i laurinske kiseline, testiranih u više molarnih odnosa. Enzimska aktivnost je izražena kao procenat početne, 100%, aktivnosti aktiviranog uzorka Act d 1. Dobijeni rezultati pokazuju da nijedan od ispitivanih malih molekula, bez obzira na molarni odnos, nije značajno uticao na promenu enzimske aktivnosti Act d 1. Ovi rezultati ukazuju da testirani molekuli ne poseduju sposobnost da inhibiraju enzim niti da promene njegova enzimska svojstva (Slika 17).



Slika 17. Kazeinolitička aktivnost Act d 1 u prisustvu malih molekula u različitim molarnim odnosima. Početna aktivnost Act d 1 bez prisustva ikakvih inhibitora uzeta je kao 100% (isprekidana linija na grafiku) i prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM.

4.3 Efekat Act d 1 i malih molekula na vijabilnost ćelija

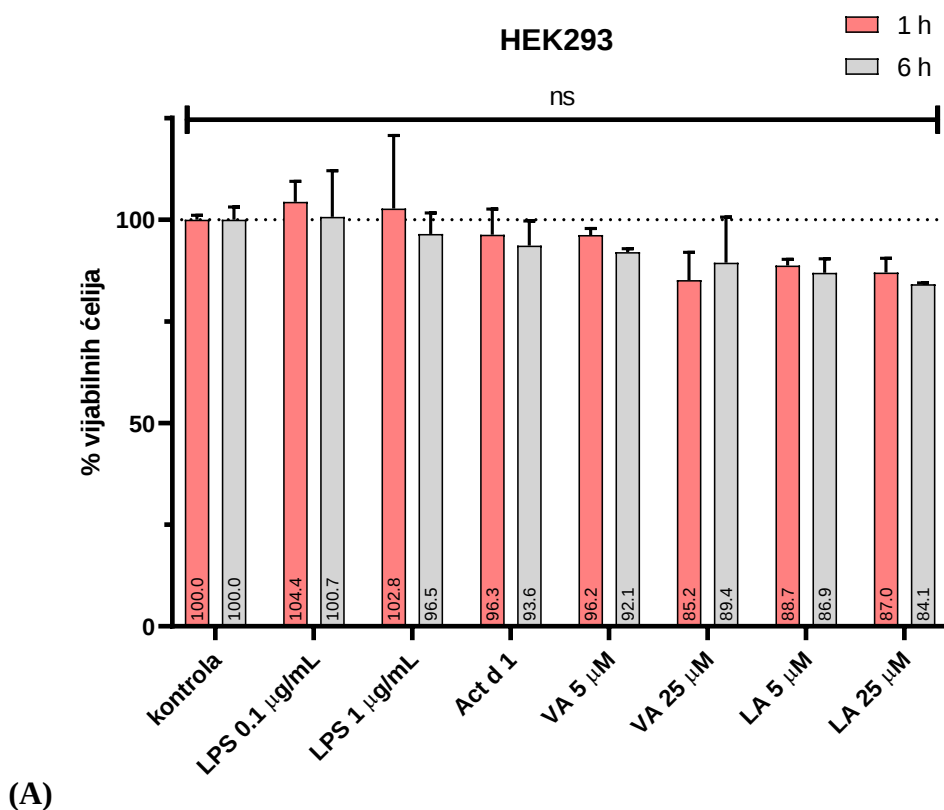
Uticaj Act d 1 na različite ćelijske linije je ispitivan primenom 3 različita testa, uključujući CCK-8, LDH i test preuzimanja propidijum jodida (PI). Ni LPS ni Act d 1 u tri različite koncentracije (1, 0,1 i 0,01 mg/mL), nisu pokazali citotoksičnost prema mišjim BMDMs u LDH testu (Slika 18). U PI testu, najviša koncentracija Act d 1 je izazvala povećanje preuzimanja PI od oko 6%, što, iako statistički značajno, ne ukazuje na biološki značajnu citotoksičnost uzimajući u obzir ukupnu ćelijsku populaciju (Slika 18). Kako je koncentracija endotoksina bila zanemarljiva u analiziranim uzorcima proteina (niža od 0,16 ng/mL odnosno 0,8 EU/mL korišćenog rastvora proteina koncentracije 1 mg/mL u svim analiziranim uzorcima), nije očekivano da bi značajno mogla doprineti njegovoj citotoksičnosti.

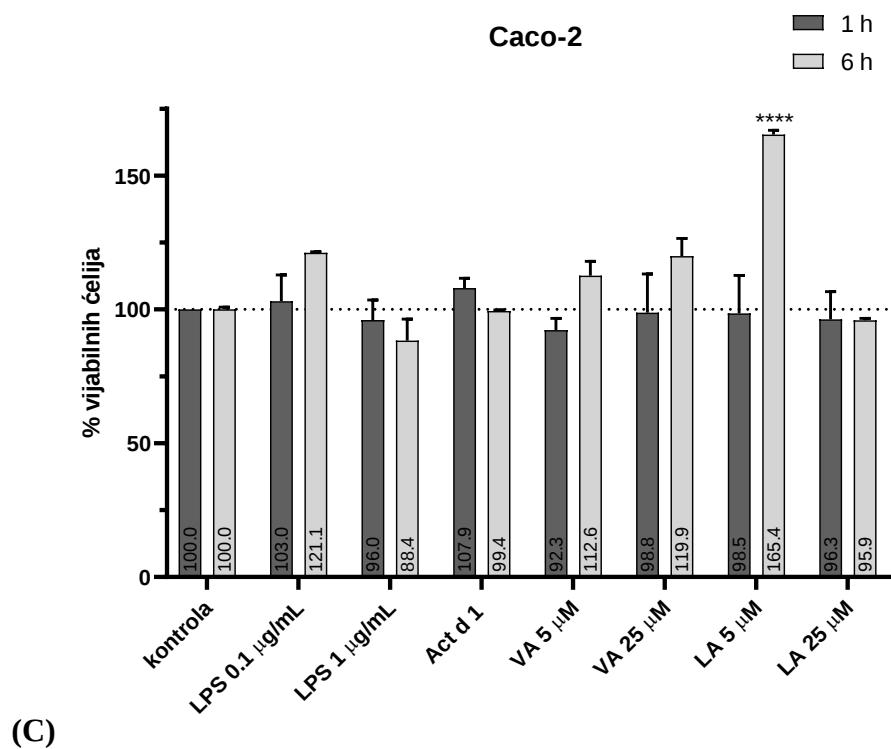
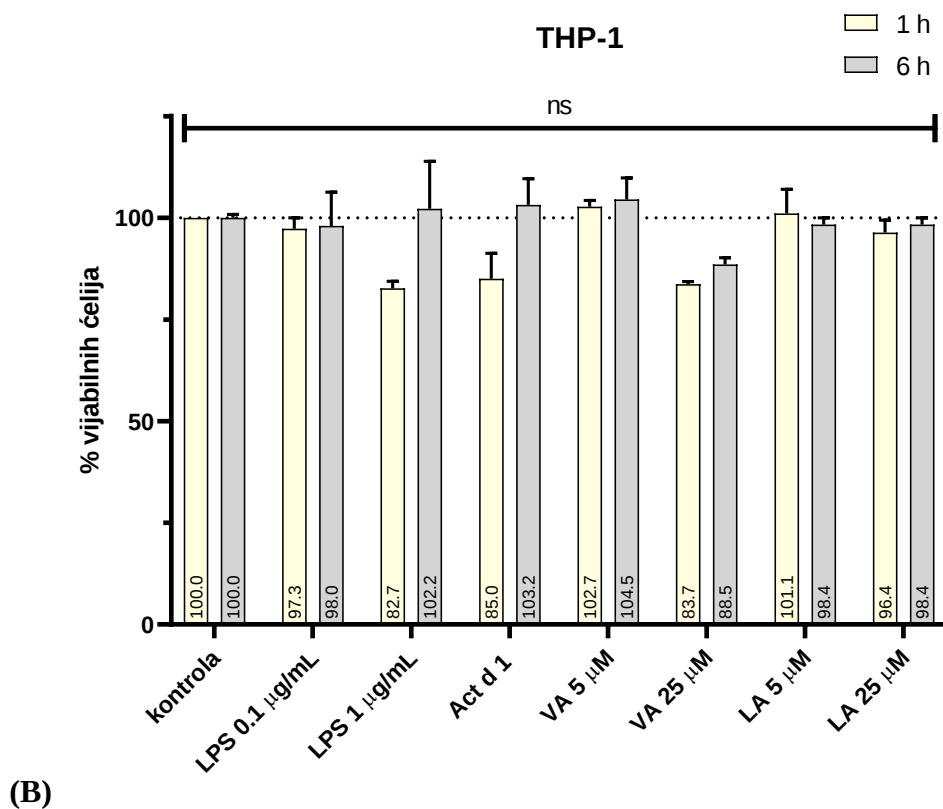


Slika 18. Procena citotoksičnog efekta Act d 1 i LPS na mišjim BMDMs. A) Vijabilnost BMDMs nakon 4 h tretmana LPS-om (1 μ g/mL) bez i sa nigericinom (10 μ M, 1 h) kao pozitivnom kontrolom, i Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL). B) Preuzimanje PI nakon 24 h tretmana Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL) i LPS-om (1 μ g/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Dodatno, da bi se analizirao efekat Act d 1, LPS-a i malih molekula, u svim korišćenim koncentracijama, na THP-1, Caco-2 i HEK293 ćelijama, korišćen je CCK-8 test citotoksičnosti.

Nezavisno od primenjenog stimulatora, rezultati pokazuju odsustvo citotoksičnog dejstva nakon 1 h i 6 h tretmana u sve tri ispitivane ćelijske linije. Odsustvo uticaja na ćelijsku vijabilnost je ključno za tumačenje efekata Act d 1 i malih molekula na inflamatorni odgovor ćelija, jer potvrđuje da potencijalne promene nisu posledica citotoksičnosti primenjenih stimulusa (Slika 19). Jedina statistički značajna promena je zabeležena kod Caco-2 ćelija nakon tretmana sa 5 μ M LA, gde se primećuje povećanje vijabilnosti, odnosno proliferativni efekat ovog molekula (Slika 19). Međutim, kako ovaj efekat nije primećen kod HEK293 i THP-1 ćelijskih linija, može se razmatrati isključivo u kontekstu Caco-2 ćelijske linije, bez genralnih zaključaka.





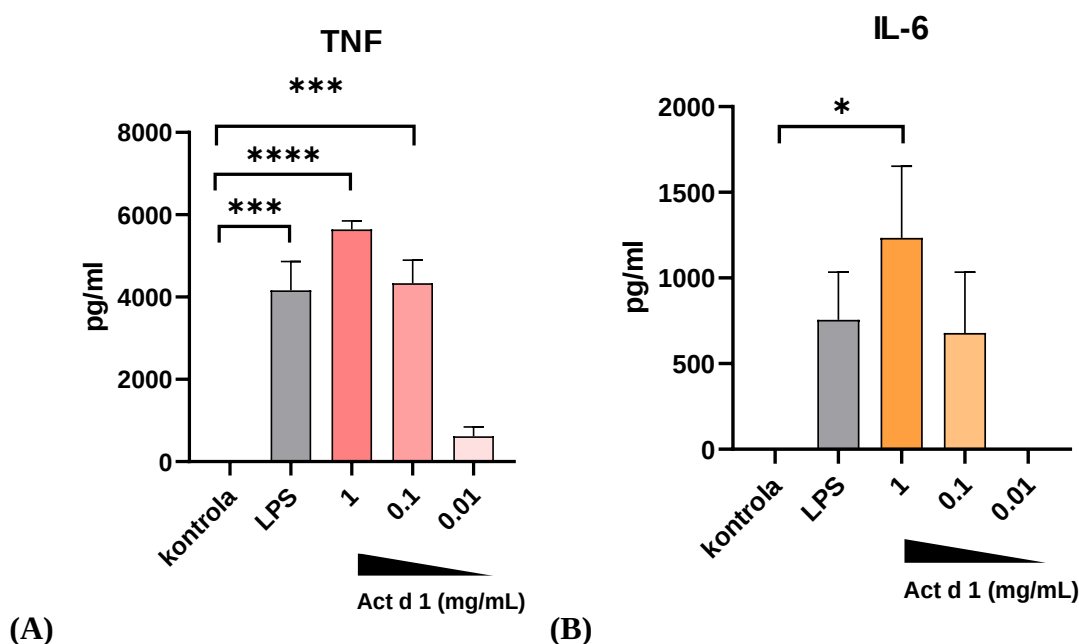
Slika 19. Efekat LPS, Act d 1 i odabranih malih molekula na vijabilnost ćelija. Vijabilnost A) HEK293 ćelija, B) THP-1 makrofaga i C) Caco-2 ćelija nakon 1 h i 6 h tretmana LPS-om (0,1 i 1 µg/mL), Act d 1 (1 mg/mL), VA i LA (5 i 25 µM). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM.

Statistička značajnost (two-way ANOVA): ns – $p > 0.05$, bez statističke značajnosti, **** $p < 0.0001$, u poređenju sa kontrolom nestimulisanih ćelija.

4.4 Ispitivanje prirode proinflamatornog efekta Act d 1

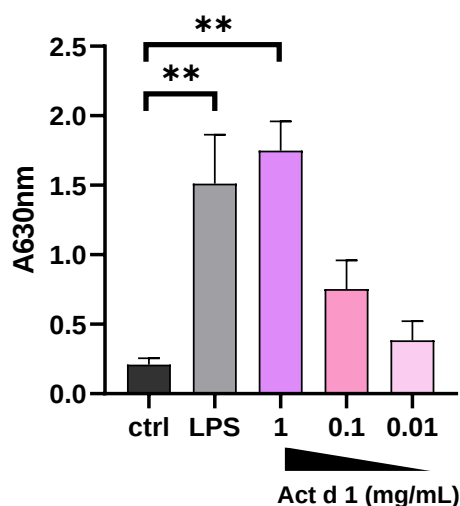
4.4.1 Act d 1 izaziva proizvodnju proinflamatornih citokina aktivacijom NF- κ B signalnog puta

Alergeni koji poseduju proteaznu aktivnost imaju potencijal da indukuju proinflamatorni odgovor u različitim ćelijskim sistemima *in vitro*. Da bi se ispitala priroda odgovora ćelijskih modela na Act d 1 analizirana je proizvodnja proinflamatornih citokina ELISA metodom i aktivacija NF- κ B signalnog puta. U mišjim BMDMs je nakon tretmana Act d 1 tokom 4 h zabeležena povećana proizvodnja proinflamatornih citokina TNF i IL-6 koja je pratila povećanje koncentracije korišćenog alergena (Slika 20). Act d 1 u najvišoj koncentraciji (1 mg/mL) je izazvao proinflamatorni odgovor uporediv sa odgovorom koji je indukovao 1 μ g/mL LPS-a, ukazujući na njegov značajan proinflamatorni potencijal. Povećana proizvodnja TNF je primećena sa sve tri korišćene koncentracije Act d 1 (Slika 20), dok najniža koncentracija Act d 1 (0,01 mg/mL) nije izazvala primetno povećanje proizvodnje citokina IL-6 (Slika 20).



Slika 20. Proizvodnja proinflamatornih citokina u imortalizovanim mišjim makrofagima. Koncentracija (A) TNF i (B) IL-6 u supernatantima iBMDMs nakon 4 h tretmana sa LPS (1 μ g/mL) i Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

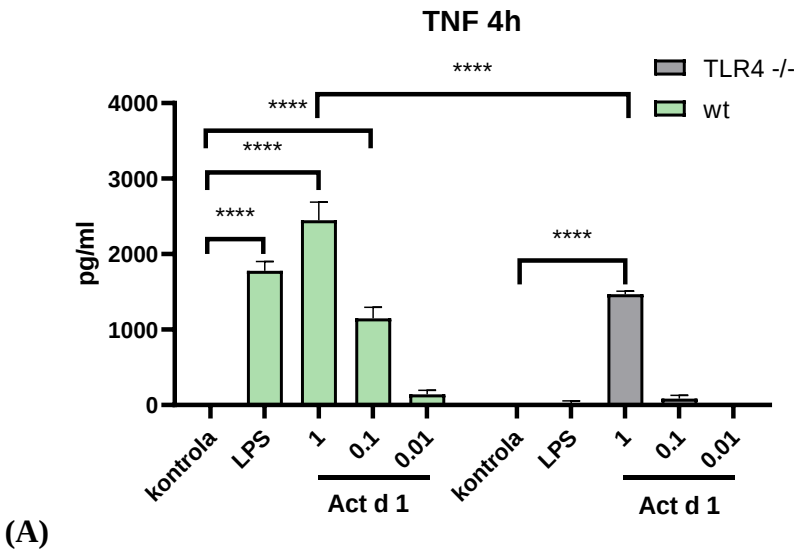
Povećanje sinteze proinflamatornih citokina je regulisano aktivacijom različitih signalnih puteva, poput NF- κ B signalnog puta. Analizom aktivacije NF- κ B u mišjoj reporterskoj liniji RAW Blue™ potvrđena je aktivacija ovog signalnog puta na koncentraciono-zavisan način, gde najveća testirana koncentracija alergena (1 mg/mL) dovela do najintenzivnijeg nivoa aktivnosti koja je bila uporediva sa aktivnošću nakon tretmana sa 100 ng/mL LPS-a (Slika 21).

NF- κ B aktivnost

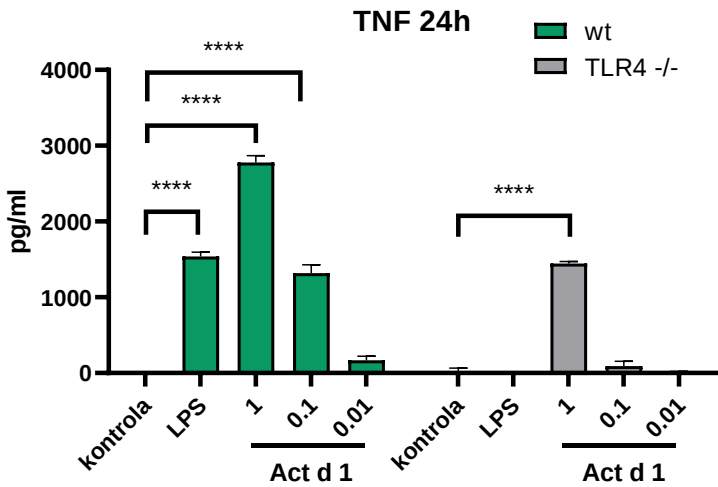
Slika 21. Aktivacija NF- κ B u RAW Blue™ ćelijskoj liniji mišjih makrofaga. Tretman makrofaga je rađen tokom 24 h koristeći LPS (100 ng/mL) i Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): ** $p < 0.01$.

4.4.2 Proinflamatorni efekat Act d 1 je zavisen od TLR4

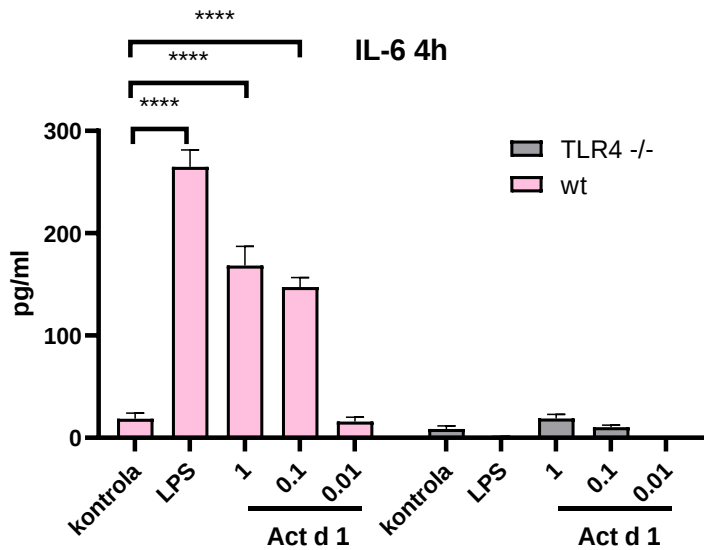
Uzevši u obzir snažan proinflamatorni odgovor koji Act d 1 izaziva u iBMDMs već nakon 4 h, koji je uporediv sa odgovorom izazvanim od strane LPS-a, ispitana je uloga TLR4 u posredovanju ovog efekta. Primarne mBMDMs, wild-type i TLR4^{-/-} (ćelije iz kojih je izbačen gen za TLR4), su tretirane LPS-om i Act d 1 u rastućim koncentracijama tokom 4 i 24 h, nakon čega je analizirana koncentracija proinflamatornih citokina TNF i IL-6 u supernatantima koristeći ELISA metodu. Pokazano je da je u wild-type mBMDMs, Act d 1 izazvao koncentraciono-zavisno povećanje proizvodnje oba citokina u oba vremenska intervala (Slika 22), ukazujući na postojani proinflamatorni efekat. Nasuprot tome, u TLR4^{-/-} mBMDMs, proizvodnja IL-6 je potpuno bila odsutna u oba vremenska intervala, ukazujući na strogu zavisnost od TLR4 (Slika 22). U slučaju proizvodnje TNF je uočeno samo delimično smanjenje koncentracije u odsustvu TLR4 pri korišćenoj koncentraciji Act d 1 od 1 mg/mL, dok je pri nižim koncentracijama alergena, proizvodnja TNF potpuno izostala (Slika 22).



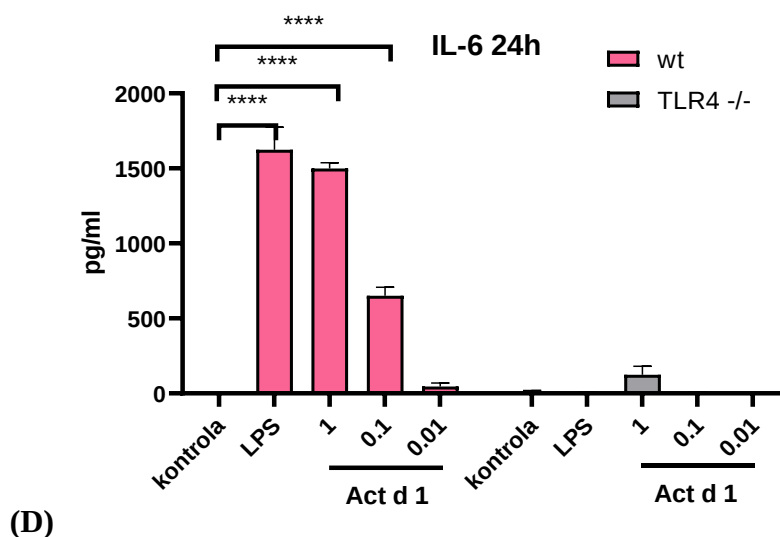
(A)



(B)



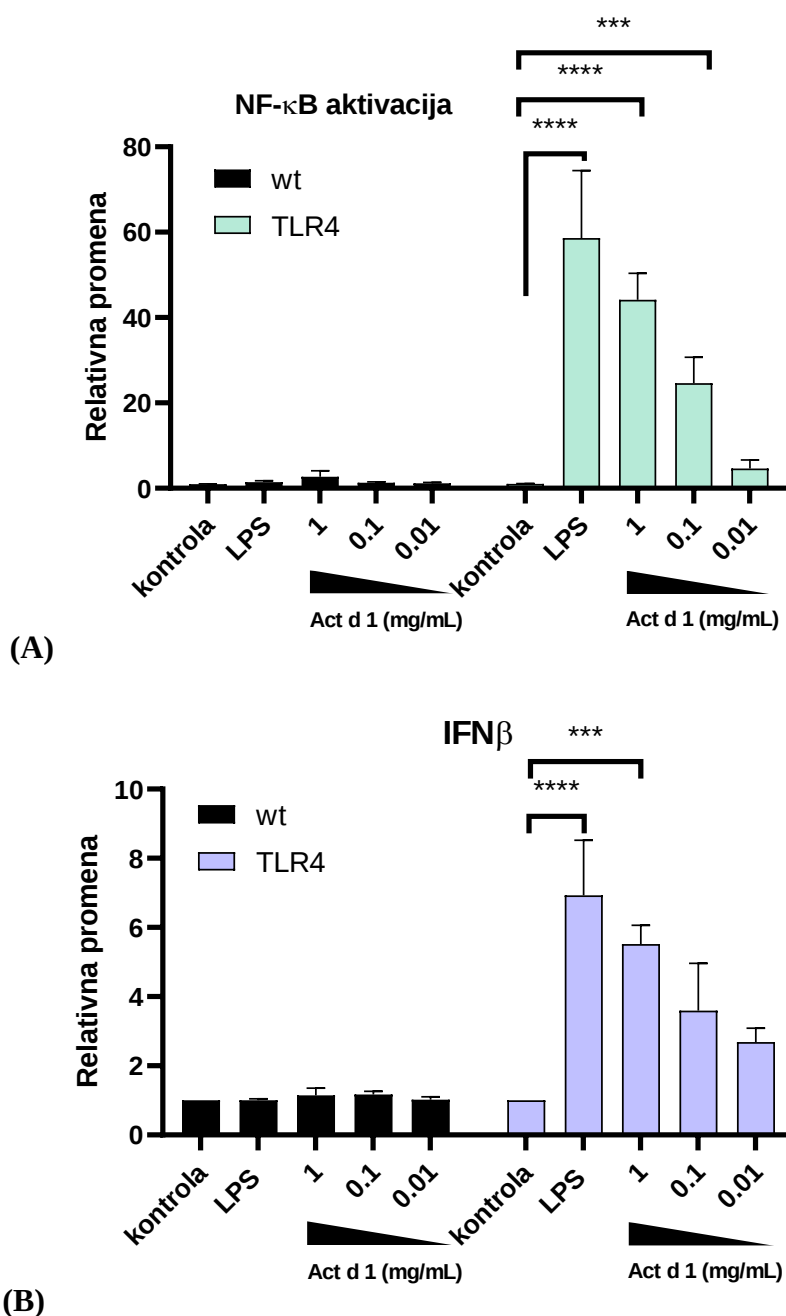
(C)



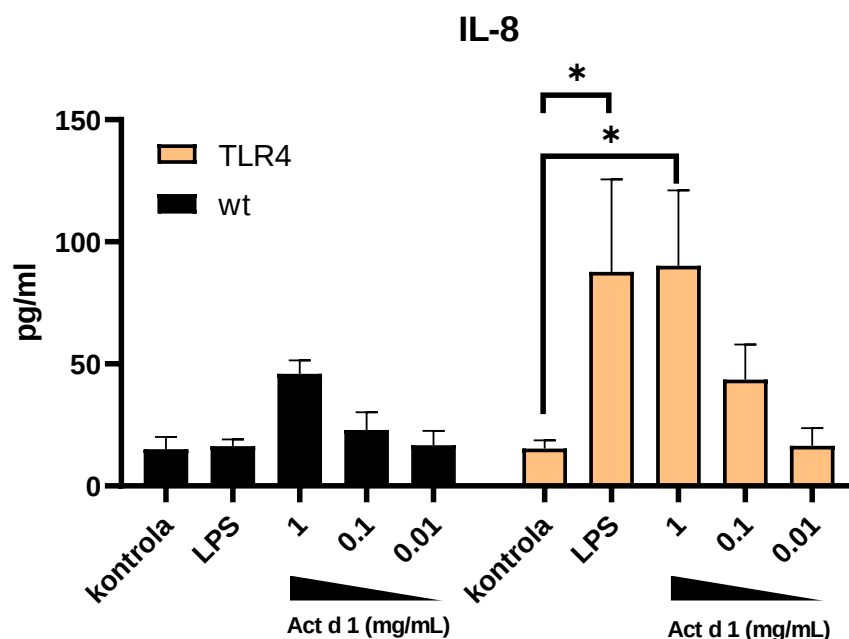
Slika 22. TLR4-posredovana proizvodnja proinflammatoryh citokina u primarnim mBMDMs. Proizvodnja TNF nakon 4 h (A) i 24 h (B) i IL-6 nakon 4 h (C) i 24 h (D) u wild-type i TLR4-/- primarnim mBMDMs u odgovoru na LPS (1 μ g/mL) i Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (two-way ANOVA): *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.4.3 Act d 1 aktivira TLR4-zavisne promotere NF- κ B i IFN β

Kako bi se definisala uloga signalnih puteva povezanih sa TLR4 u proinflammatorym efektu Act d 1, korišćena je HEK293 ćelijska linija koja ne eksprimira TLR4. HEK293 ćelije su stabilno transfektovane plazmidima koji kodiraju TLR4 kostimulatorne molekule MD2 i CD14 i humani TLR4. Kao kontrola su korišćene HEK293 ćelije transfektovane praznim vektorom (wild-type, wt). Praćenjem aktivnosti dva TLR4-zavisna promotera, promotore NF- κ B i IFN β gena, zapaženo je da Act d 1 dovodi do aktivacije oba promotera u prisustvu TLR4, ali ne i u wtHEK293 ćelijama (Slika 23). Za oba promotora uočen je isti trend povećanja aktivnosti u zavisnosti od koncentracije Act d 1. Sekretacija humanog IL-8 u supernatantima ćelija tretiranih Act d 1 je takođe bila značajno povećana u prisustvu TLR4, prateći trend aktivacije oba promotera (Slika 24).



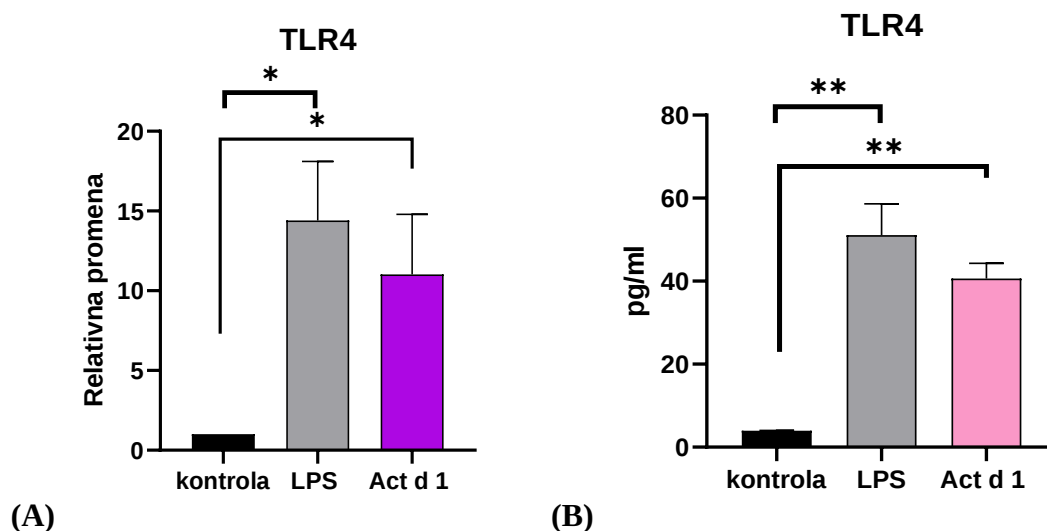
Slika 23. Aktivacija TLR4-zavisnih promotera u stabilno transfektovanim HEK293 ćelijama. Aktivacija (A) NF- κ B i (B) IFN β promotera nakon tretmana sa LPS (100 ng/mL) i Act d 1 (1, 0,1, 0,01 mg/mL) tokom 24 h. Pre tretmana ćelije su transfektovane plazmidima koji kodiraju MD2, CD14, i renila luciferazu čija je ekspresija pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora i firefly luciferazu koja se eksprimira pod kontrolom NF- κ B ili IFN β inducibilnog promotora, zajedno sa humanim TLR4 ili praznim vektorom (wt) tokom 24 h. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (two-way ANOVA): *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



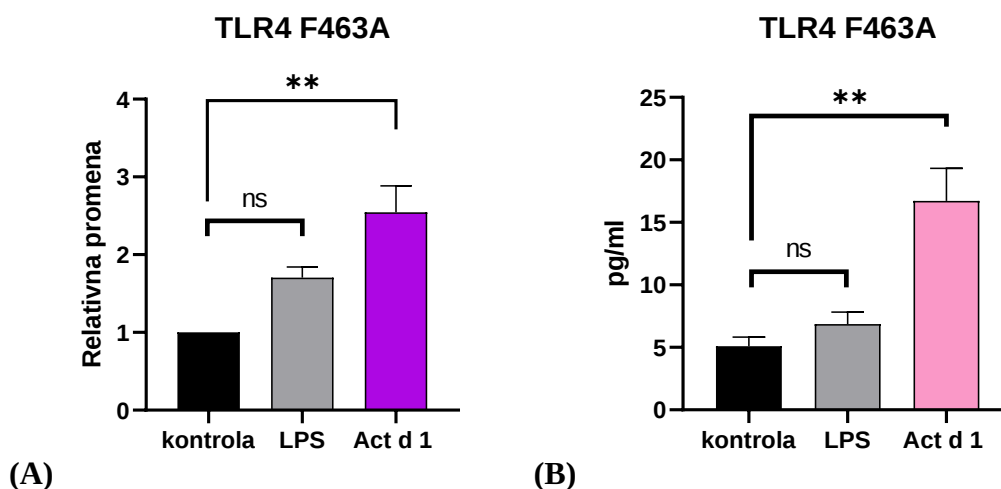
Slika 24. Analiza koncentracije humanog IL-8 u supernatantima HEK293 ćelija nakon tretmana sa LPS (100 ng/mL) i Act d 1 (1, 0,1, 0,01 mg/mL) tokom 24 h. Pre tretmana ćelije su transfektovane sa MD2, CD14, renila luciferazom pod kontrolom konstitutivnog promotera i firefly luciferazom pod kontrolom NF- κ B ili IFN β promotera, zajedno sa humanim TLR4 ili praznim vektorom (wt) tokom 24 h. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (two-way ANOVA): * $p < 0.05$.

4.4.4 Act d 1 selektivno aktivira mutante humanog TLR4 F463A i F440A

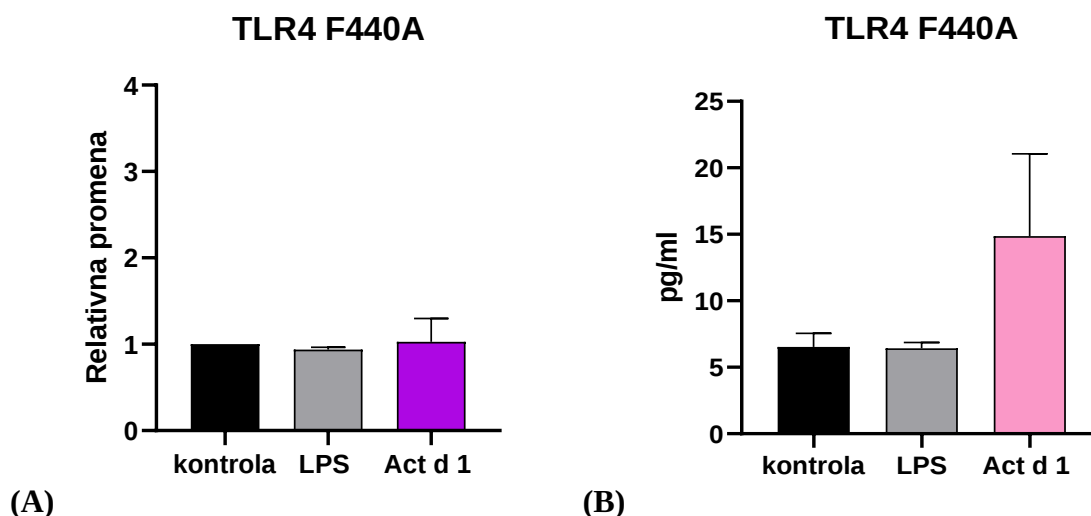
Kako bi se utvrdila razlika u mehanizmu aktivacije TLR4 od strane Act d 1 i LPS-a, analiziran je efekat ova dva stimulusa na dva mutanta humanog TLR4 u HEK293 ćelijama. Praćena je NF- κ B aktivnost pod inducibilnim promoterom za firefly luciferazu i proizvodnja humanog IL-8 u ćelijskim supernatantima. Mutirani TLR4 sadrže F463A i F440A mutacije unutar sekundarnog hidrofobnog mesta u ektodomenu što ometa njihovu interakciju sa lipidnim komponentama poput LPS-a, čime je onemogućena ili smanjena aktivacija TLR4. LPS nije doveo do značajnog povećanja aktivacije NF- κ B ni proizvodnje IL-8 u ćelijama koje eksprimiraju bilo koji od dva mutirana TLR4, dok je očekivano aktivacija NF- κ B i povećanje IL-8 primećeno u ćelijama sa wild-type TLR4 (Slika 25). Nasuprot tome, iako su nivoi NF- κ B aktivacije i proizvodnje IL-8 bili niži u poređenju sa wild-type TLR4, ćelije sa eksprimiranim F463A mutantom su pokazale značajan odgovor na Act d 1 (1 mg/mL) (Slika 26). Act d 1, međutim, nije doveo do značajnih povećanja aktivacije NF- κ B u ćelijama sa F440A mutantom, iako je primećeno blago povećanje nivoa IL-8 (Slika 27).



Slika 25. Aktivacija wild-type humanog TLR4. (A) Aktivacija NF- κ B i (B) proizvodnja IL-8 nakon tretmana sa Act d 1 (1 mg/mL) i LPS (100 ng/mL) tokom 24 h u HEK293 ćelijama stabilno transfektovanim sa MD2, CD14, humani wild-type TLR4, renila luciferaza (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferazom (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): *p < 0,05, **p < 0,01.



Slika 26. Aktivacija TLR4 F463A. (A) Aktivacija NF- κ B i (B) proizvodnja IL-8 nakon tretmana Act d 1 (1 mg/mL) i LPS (100 ng/mL) tokom 24 h u HEK293 ćelijama stabilno transfektovanim sa MD2, CD14, TLR4 F463A mutant, renila luciferaza (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferazom (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): **p < 0,01, ns – nije statistički značajno.



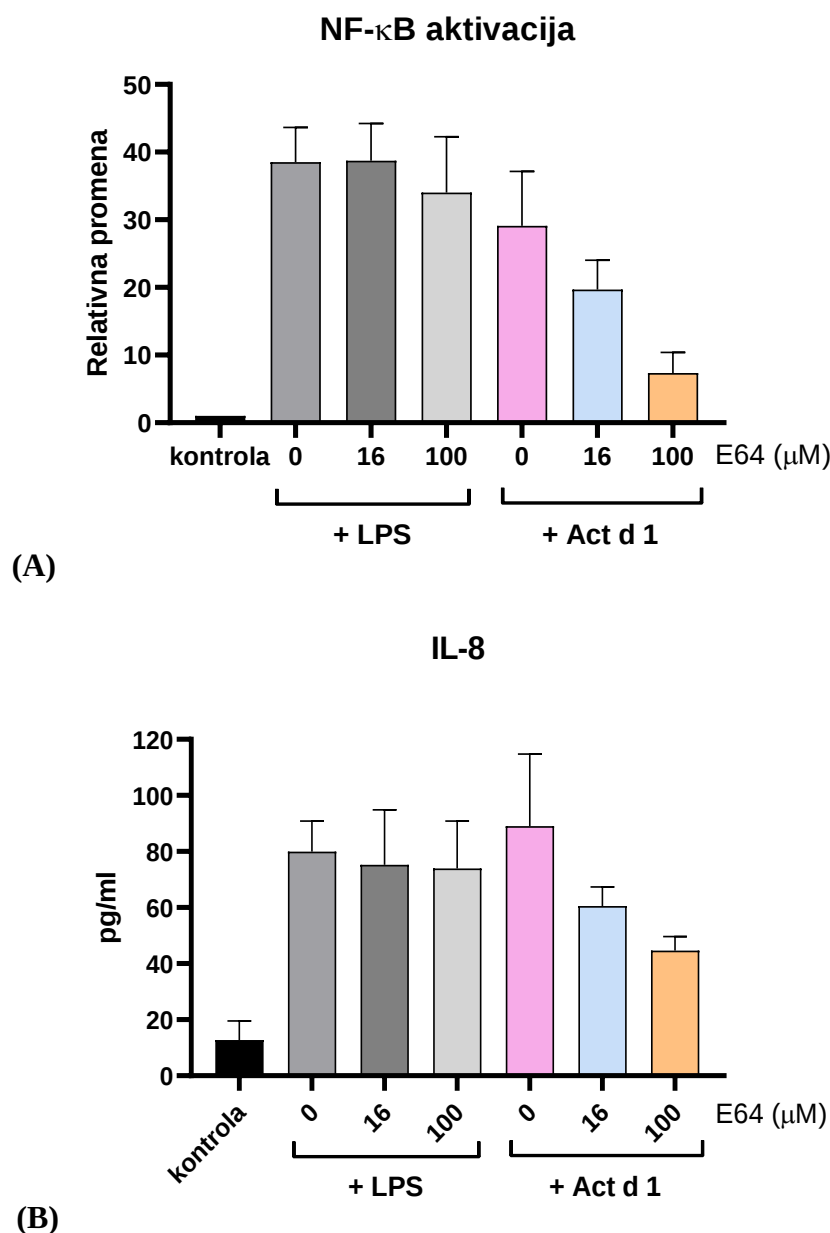
Slika 27. Aktivacija TLR4 F440A. (A) Aktivacija NF- κ B i (B) proizvodnja IL-8 nakon tretmana Act d 1 (1 mg/mL) i LPS (100 ng/mL) tokom 24 h u HEK293 ćelijama stabilno transfektovanim sa MD2, CD14, TLR4 F440A mutant, renila luciferaza (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferazom (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05 , bez statističke značajnosti, u poređenju sa kontrolom.

4.5 Proinflamatorni efekat Act d 1 zavisi od njegove proteolitičke aktivnosti

4.5.1 Uloga proteolitičke aktivnosti Act d 1 u izazivanju proinflamatornog odgovora

Proteolitička aktivnost alergena je prepoznata kao jedan od važnih faktora u inicijaciji imunskog odgovora. Kako bi se definisala uloga proteolitičke aktivnosti Act d 1 u aktivaciji NF- κ B i proizvodnji proinflamatornih citokina, korišćene su HEK293 ćelije stabilno transfektovane plazmidima koji kodiraju MD2, CD14, humani TLR4 i renila luciferazu tako da njihova ekspresija bude pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora i firefly luciferazu tako da ekspresija bude pod kontrolom inducibilnog promotora NF- κ B gena. Korišćena su dva nezavisna pristupa za inhibiciju proteolitičke aktivnosti Act d 1: inhibicija specifičnim cistein-proteaznim inhibitorom E64 i inaktivacija aktinidina Act d 1 toplotom. Ekvimolarne koncentracije ovog inhibitora (16 μ M) su i prethodno pokazane da dovode do značajne inhibicije enzimske aktivnosti Act d 1 u eksperimentima sa poznatim supstratima [98]. Isto je pokazano i za toplotni tretman gde se Act d 1 značajno inaktivira na temperaturi od 95°C [74].

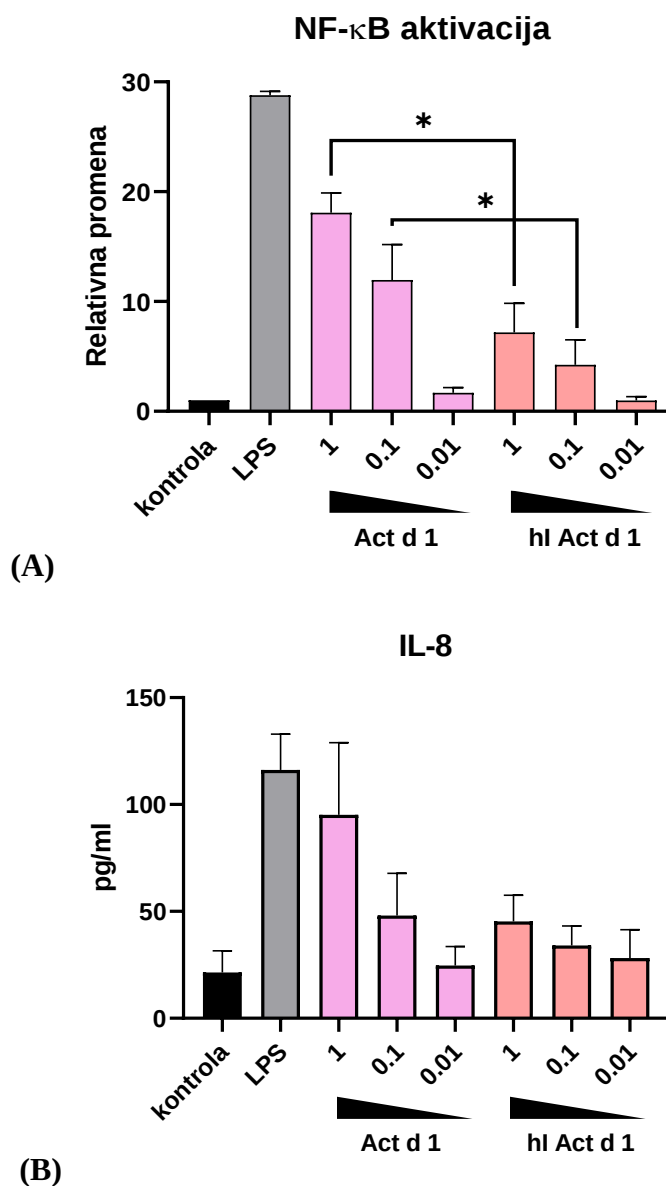
U prvom pristupu, pre tretmana ćelija, Act d 1 (1 mg/mL) je inkubiran 1 h na 37°C sa dve koncentracije (16 μ M i 100 μ M) specifičnog cistein-proteaznog inhibitora E64. Ovako opisan tretman enzima je doveo do smanjene aktivacije NF- κ B i proizvodnje IL-8 u odnosu na nativni Act d 1 (Slika 28). Inhibitor E64 nije imao značajan uticaj na LPS-izazvanu aktivaciju NF- κ B pri obe testirane koncentracije (Slika 28). U slučaju Act d 1, povećanjem koncentracije E64 je direkto proporcionalno smanjena aktivnosti NF- κ B (Slika 30).



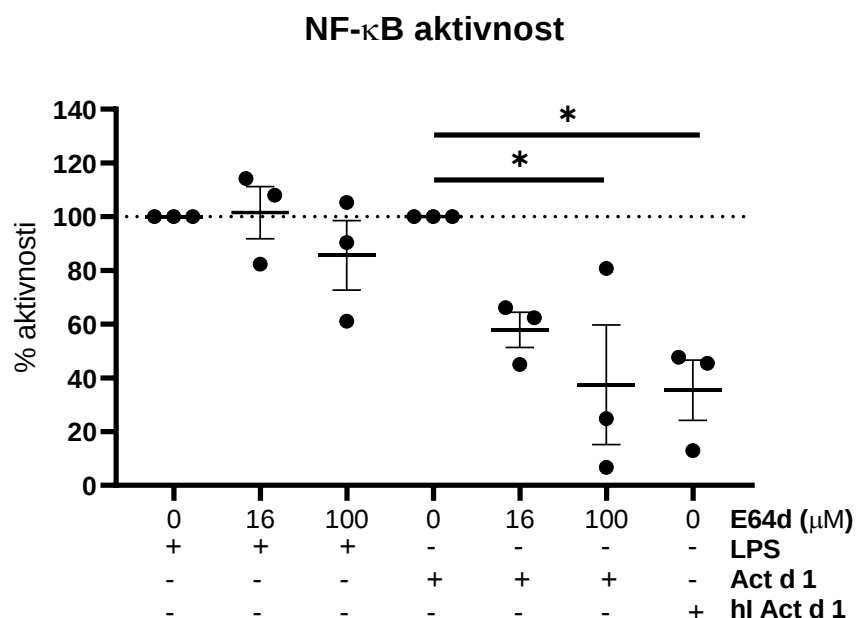
Slika 28. Uticaj proteolitičke aktivnosti Act d 1 na aktivaciju NF- κ B. (A) Aktivacija NF- κ B i (B) proizvodnja IL-8 nakon tretmana Act d 1 (1 mg/mL) ili LPS (100 ng/mL), nativnim ili prethodno inkubiranim 1 h na 37°C u prisustvu inhibitora E64 (16 ili 100 μ M) u HEK 293 ćelijama. Ćelije su stabilno transfektovane plazmidima koji kodiraju MD2, CD14, humani TLR4, renila luciferazu (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferazu (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05 , bez statističke značajnosti, u poređenju sa kontrolom.

U drugom pristupu, Act d 1 (1, 0,1 i 0,01 mg/mL) je inaktiviran toplotnim tretmanom, inkubacijom na 95°C pre tretmana ćelija. Inaktivacija enzima je dovela do smanjenja NF- κ B aktivacije pri svim korišćenim koncentracijama u odnosu na nativni enzim, sa gubitkom aktivnosti do 70% u

poređenju sa aktivnom formom alergena pri koncentraciji od 1 mg/mL (Slika 29 i 30). Promena u proizvodnji IL-8 je pratila isti obrazac, iako ne sa istom statističkom značajnošću (Slika 29).



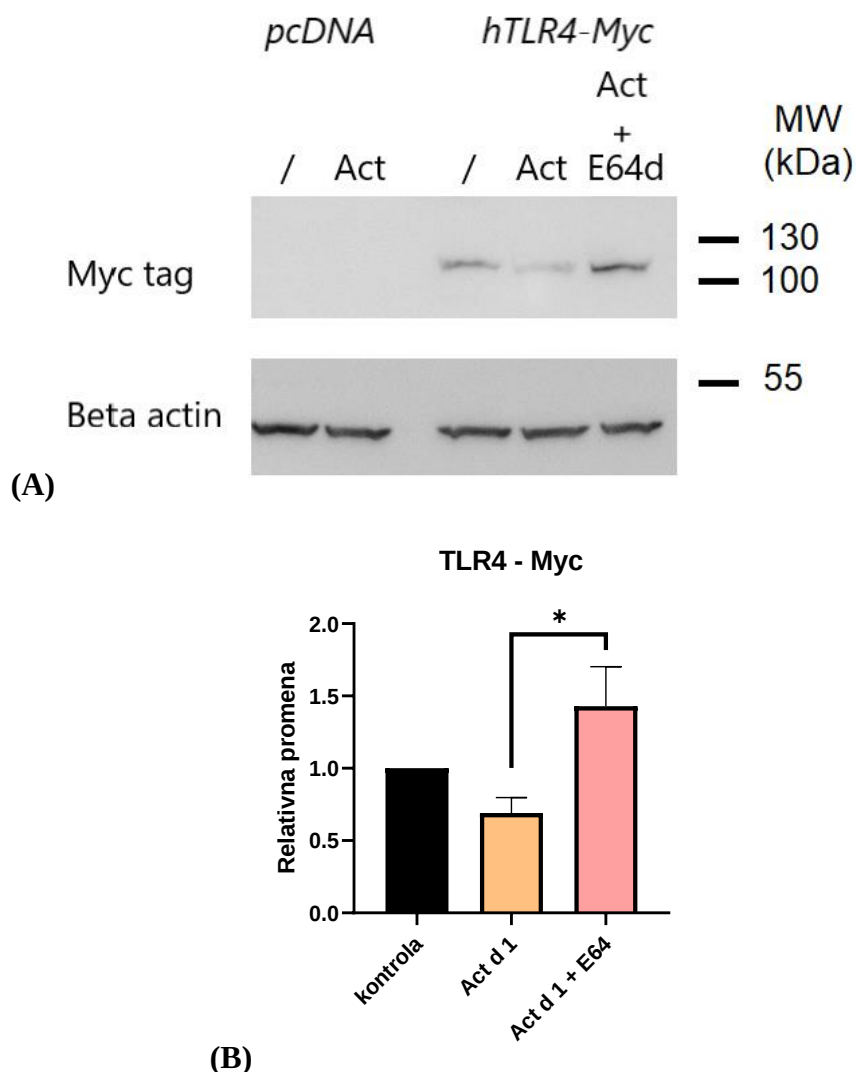
Slika 29. Uticaj proteolitičke aktivnosti Act d 1 na aktivaciju NF- κ B. (A) Aktivacija NF- κ B i (B) proizvodnja IL-8 nakon tretmana LPS (100 ng/mL), ili Act d 1 (1, 0,1 ili 0,01 mg/mL) nativnim ili prethodno inkubiranim 1 h na 95°C u HEK 293 ćelijama. Ćelije su stabilno transfektovane plazmidima koji kodiraju MD2, CD14, humani TLR4, renila luciferazu (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferazu (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0,05$, hI Act d 1 – Act d 1 inaktiviran toplotnim tretmanom.



Slika 30. Promena NF- κ B aktivnosti nakon stimulacije LPS-om i Act d 1 preinkubiranim sa E64 i toplotom inaktiviranim Act d 1. Promena aktivnosti NF- κ B je izražena u procentima u odnosu na aktivnost postignutu nakon tretmana sa LPS (100 ng/mL) odnosno nativnim Act d 1 (1 mg/mL) koji nije inkubiran u prisustvu inhibitora E64. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0,05$, hI Act d 1 – Act d 1 inaktiviran toplotnim tretmanom.

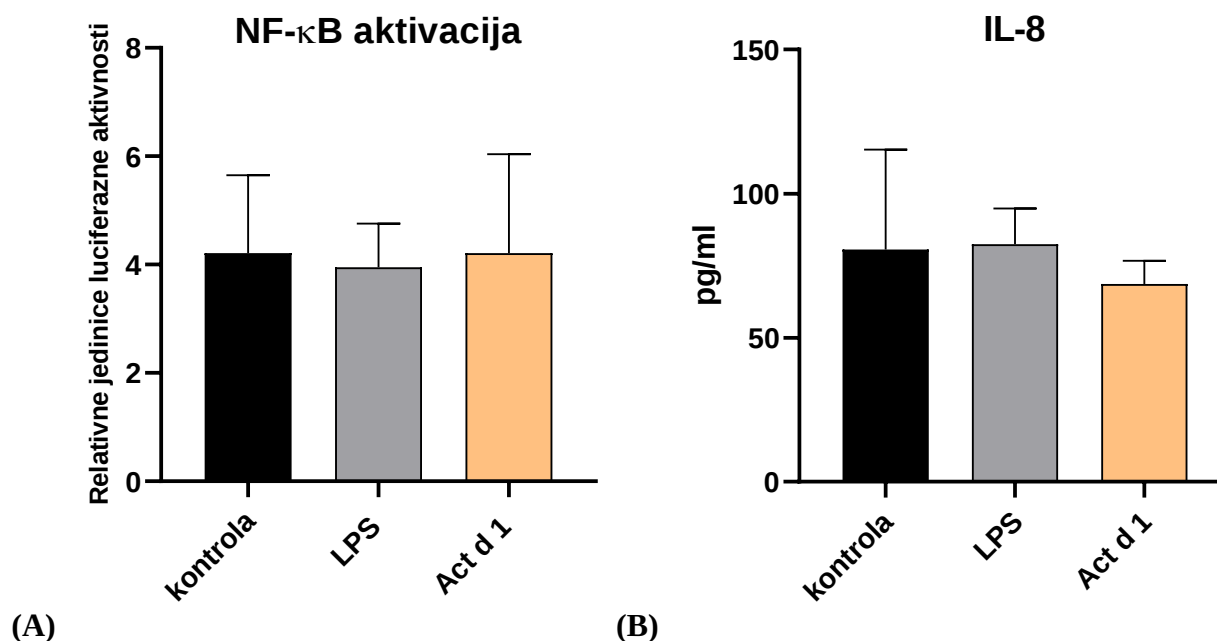
4.5.2 Mehanizam aktivacije TLR4 aktinidinom

Da bi se dodatno razjasnila uloga proteolitičke aktivnosti u aktivaciji NF- κ B koja je posredovana TLR4, ispitan je efekat Act d 1 na degradaciju ektodomena TLR4, koji je zadužen za aktivaciju ovog receptora. Korišćene su HEK293 ćelije stabilno transfektovane plazmidom koji kodira humani TLR4 koji sadrži c-Myc tag na N-terminalnom domenu. Na imunoblotu razvijenom u prisustvu anti-c-Myc antitela, u ćelijama tretiranim aktivnim Act d 1 (1 mg/mL) uočen pad intenziteta trake koja odgovara humanom TLR4 u poređenju sa netretiranim ćelijama, što ukazuje na degradaciju ektodomena TLR4 (Slika 31). Ovo smanjenje signala nije zabeleženo u ćelijama tretiranim sa Act d 1 (1 mg/mL) prethodno inhibiranim u prisustvu 100 μ M E64 (Slika 31).



Slika 31. Ekspresija TLR4-Myc konstrukta u HEK293 ćelijama. (A) Detekcija c-Myc taga i β -aktina u imunoblotu proteina HEK293 ćelija koje su stabilno trasfektovane plazmidima za humani TLR4 koji sadrži c-Myc tag na N-terminalnom domenu uz plazmide za MD2 i CD14, nakon tretmana sa nativnim Act d 1 (1 mg/mL) i Act d 1 (1 mg/mL) inhibiranim sa 100 μ M E64. (B) Denzitometrijska analiza nivoa ekspresije TLR4-Myc. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): *p vrednost < 0,05.

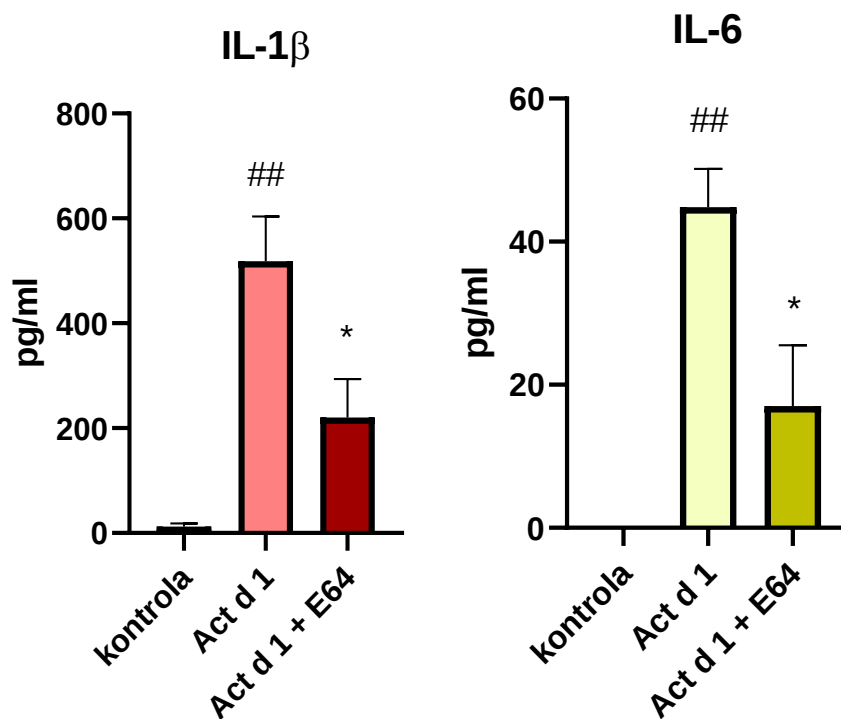
Kako je pokazano da skraćivanje ektodomena TLR4 dovodi do konsitativne aktivacije ovog receptora, u ovom radu je korišćen konstrukt TLR4 Δ 1-563, koji zadržava oko 8 kDa ektodomena, što je dovoljno za pokretanje konstitutivne aktivacije. U HEK293 ćelijama koje ekprimiraju TLR4 Δ 1-563, nakon tretmana sa 1 mg/mL Act d 1 i 100 ng/mL LPS, nije doveo do dodatnog povećanja NF- κ B aktivacije niti proizvodnje IL-8 u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 32).



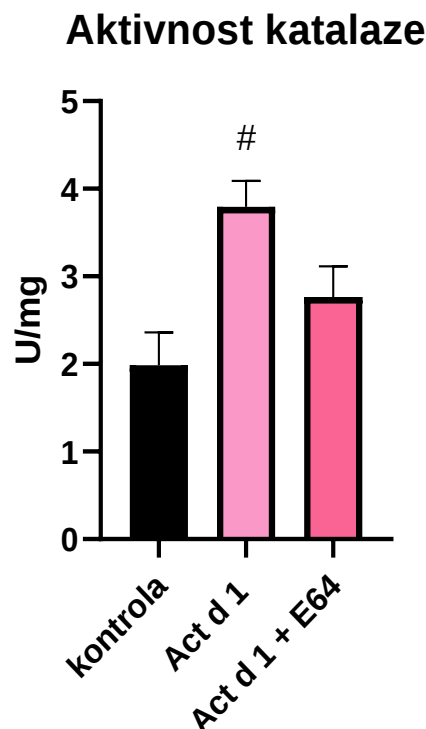
Slika 32. Aktivacija TLR4 Δ 1-563 konstrukta. (A) NF- κ B aktivacija i (B) proizvodnja IL-8 u HEK293 ćelijama nakon tretmana sa 1 mg/mL Act d 1 i 100 ng/mL LPS. HEK293 ćelije su stabilno transfektovane plazmidima za TLR4 Δ 1-563, uz plazmide za MD2, CD14, renila luciferaza (ekspresija pod konstitutivnim promotorom) i firefly luciferaza (ekspresija pod kontrolom inducibilnog NF- κ B promotora). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05 , bez statističke značajnosti, u poređenju sa kontrolom.

4.5.3 Inhibicijom Act d 1 dolazi do smanjenja inflamacije u THP-1 makrofagima

Kako bismo analizirali značaj proteolitičke aktivnosti Act d 1 u izazivanju inflamatornog odgovora THP-1 makrofaga, korišćena je ELISA za određivanje koncentracije humanih IL-6 i IL-1 β citokina iz ćelijskih supernatanata i enzimska metoda za određivanje aktivnosti katalaze u ovim ćelijama. Act d 1 je korišćen za tretman ćelija u svom nativnom obliku u koncentraciji od 1 mg/mL, sam ili u prisustvu inhibitora cistein proteaze E64 (16 μ M). Proizvodnja oba analizirana citokina pokazala se značajno smanjenom u ćelijama koje su tretirane Act d 1 u prisustvu inhibitora E64 (Slika 33), što dodatno potvrđuje značaj proteazne aktivnosti u izazivanju proinflamatornog odgovora. Takođe je i aktivnost enzima katalaze, antioksidativnog enzima koji ima ulogu u kontroli oksidativnog stresa, značajno smanjena u ćelijama koje su tretirane E64-inhibiranim Act d 1 u odnosu na ćelije tretirane nativnim Act d 1 (Slika 34).



Slika 33. Koncentracija proinflamatornih citokina u THP-1 makrofagima. Čelije su stimulirane sa nativnim Act d 1 (1 mg/mL) i inhibiranim Act d 1 u prisustvu cistein proteaznog inhibitora E64 (16 μ M). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, ## p vrednost < 0.01, # u poređenju sa netretiranom kontrolom, * u poređenju sa Act d 1.



Slika 34. Aktivnost katalaze u THP-1 makrofagima. Čelije su stimulisane sa nativnim Act d 1 (1 mg/mL) i inhibiranim Act d 1 u prisustvu cistein proteaznog inhibitora E64 (16 μ M). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): # p vrednost < 0.05, # u poređenju sa kontrolom.

4.6 Uspostavljanje model sistema THP-1 makrofaga za procenu imunomodulatornih efekata

U cilju procene imunomodulatornog potencijala malih molekula na proinflamatorni efekat LPS-a i Act d 1 i posledično aktivaciju NF- κ B, uspostavljen je stabilan model sistem makrofaga dobijenim diferencijacijom THP-1 monocita. Kako bi se okarakterisao ovaj *in vitro* model makrofaga i optimizovao postupak diferencijacije korišćene su različite metode. Nakon uspostavljanja optimalnih uslova diferencijacije, optimizovano je i vreme tretmana Act d 1 i LPS-om kako bi se uspostavio protokol za indukovanje proinflamatornih efekata primenom ovih stimulatora.

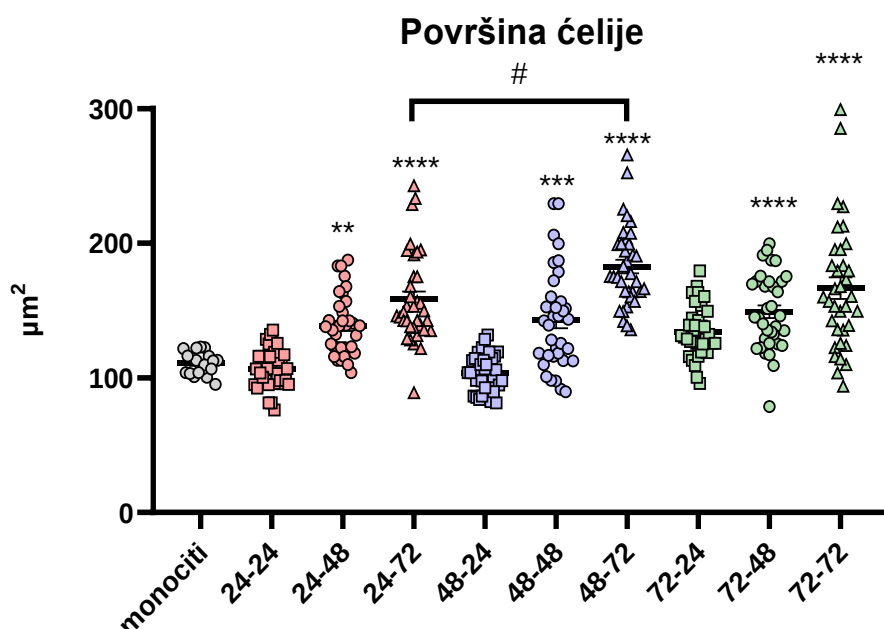
4.6.1 Optimizacija postupka diferencijacije

Za optimizaciju postupka diferencijacije varirani su vreme tokom kojeg su ćelije inkubirane u medijumu koji sadrži 100 ng/mL PMA (24 h, 48 h i 72 h) i vreme ćelijskog odmora u medijumu koji ne sadrži PMA (24 h, 48 h i 72 h). Ukupno je testirano 9 različitih kombinacija ovih vremena (pogledati Tabelu 11 u poglavlju 7.7.1).

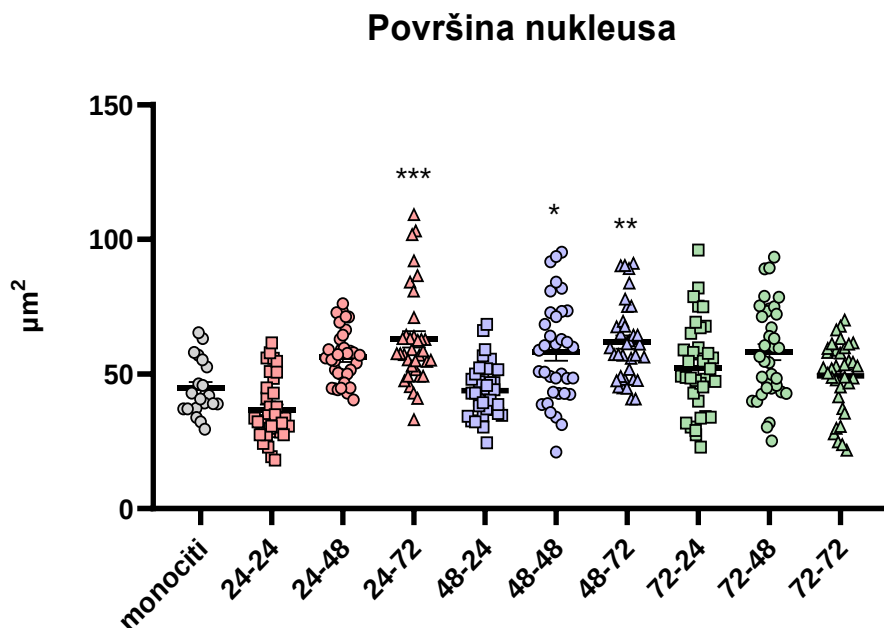
Da bi se vizuelizovale promene u morfologiji i diferencijacija THP-1 monocita u makrofage, ćelije su analizirane fluorescentnom mikroskopijom. Primećene morfološke razlike u veličini bile su u direktnoj korelaciji sa vremenom inkubacije u medijumu bez PMA (Slika 35). Produžavanje vremena odmora u ovom medijumu preko 48 sati je dovelo do značajnog povećanja površine ćelija, bez obzira na vreme diferencijacije u medijumu sa PMA. Najveća površina ćelija je postignuta nakon 72 h u medijumu bez PMA (Slika 35). Ćelije diferencirane tokom 24 h u ovom medijumu nisu pokazale značajno povećanje površine u poređenju sa monocitima.

Površina ćelijskih nukleusa je pratila isti trend vremenski zavisnog povećanja u medijumu bez PMA. U grupama koje su inkubirane 24 h u medijumu bez PMA, površina nukleusa je ostala nepromenjena u odnosu na monocite, dok je kod ćelija inkubiranih 24 h i 48 h u prisustvu PMA vreme odmora od 48 i 72 h dovelo do njenog povećanja (Slika 36). U poslednjoj grupi ćelija, koje su diferencirane u prisustvu PMA tokom 72 h, nisu zabeležene značajne razlike u veličini nukleusa, čak ni sa promenom vremena odmora (Slika 36).

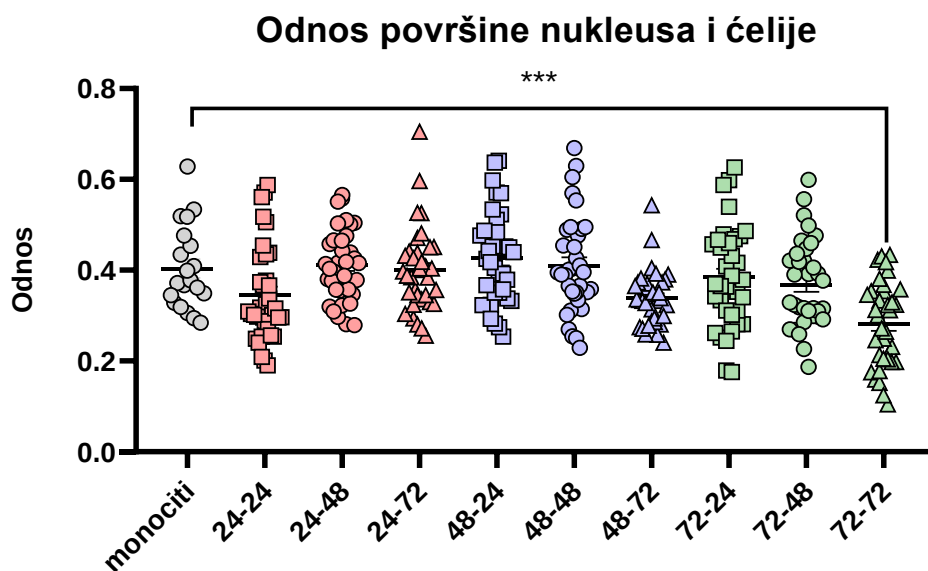
Kako bi promena veličine eukariotskih ćelija trebalo da prati i promenu veličine nukleusa, da bi se dodatno stekao uvid u promene tokom diferencijacije, izračunati su odnosi površine nukelusa i ćelije za sve uslove diferencijacije. Jedina značajna razlika upoređenju sa monocitima je zabeležena kod ćelija koje su diferencirane sa PMA tokom 72 h i inkubirane u medijumu bez PMA tokom 72 h (Slika 37).



Slika 35. Poređenje ćelijskih površina diferenciranih makrofaga sa monocitima. Površina je prikazana u μm^2 . Primenjeni tretmani su naznačeni na x osi u format vreme diferencijacije sa PMA (h) – vreme diferencijacije bez PMA (h). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti sa prosečnom vrednošću, $\pm$ SEM, (15 vrednosti po nezavisnom eksperimentu). Statistička značajnost (one-way ANOVA): # $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$, * u poređenju sa monocitima.

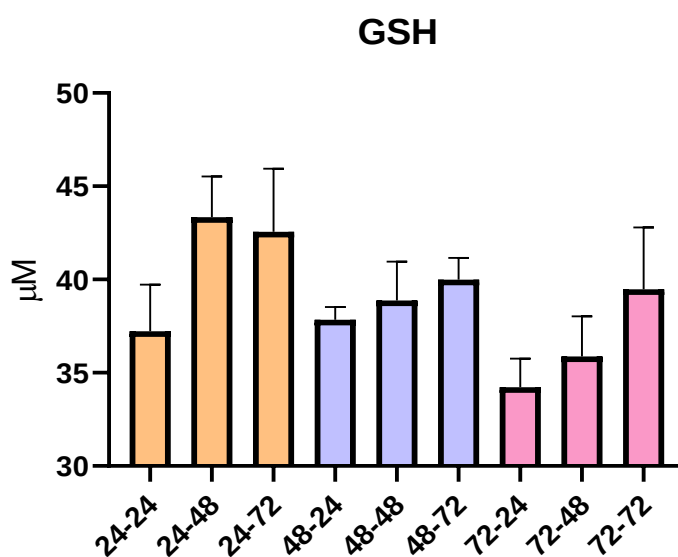


Slika 36. Poređenje površine nukleusa diferenciranih makrofaga sa nukleusima monocita. Površina je prikazana u μm^2 . Primenjeni tretmani su naznačeni na x osi u format vreme diferencijacije sa PMA (h) – vreme diferencijacije bez PMA (h). Rezultati su prikazani na grafiku kao pojedinačne vrednosti sa prosečnom vrednošću, $\pm$ SEM (15 vrednosti po nezavisnom eksperimentu). Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, * u poređenju sa monocitima.



Slika 37. Odnos površine nukleusa i ćelije diferenciranih makrofaga sa monocitima. Primenjeni tretmani su naznačeni na x osi u format vreme diferencijacije sa PMA (h) – vreme diferencijacije bez PMA (h). Rezultati su prikazani na grafiku kao pojedinačne vrednosti, sa prosečnom vrednošću, $\pm$ SEM (15 vrednosti po nezavisnom eksperimentu). Statistička značajnost (one-way ANOVA): *** $p < 0,001$.

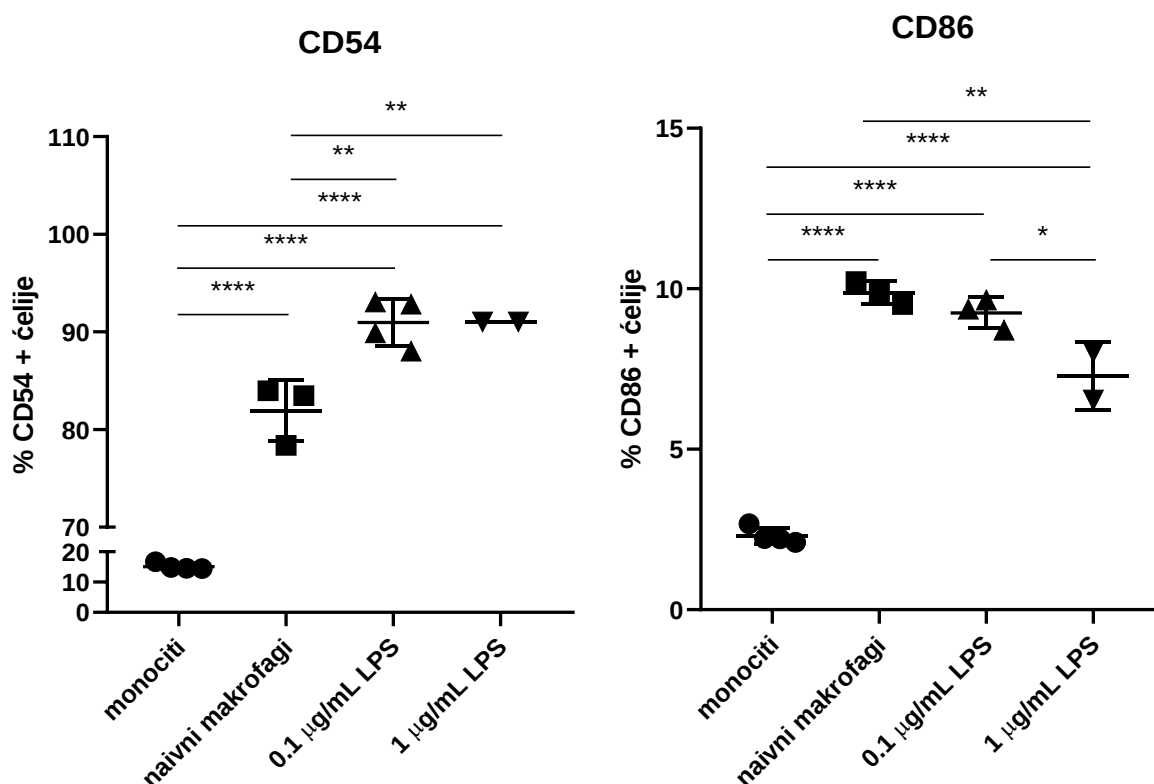
Usled dugih vremena inkubacije u procesu diferencijacije, može doći do promena u oksidativnom stanju u samoj ćeliji. Da bi se procenio uticaj provedenog vremena makrofaga u kulturi na unutarćelijski oksidativni status, analiziran je sadržaj redukovano glutationa (GSH). Iako je pri svim postupcima diferencijacije koncentracija GSH ostala statistički nepromenjena, zabeleženi smanjenja u koncentraciji u sva tri vremena diferencijacije sa PMA, su u korelaciji sa njegovim proinformativnim svojstvom, a produženo vreme odmora u medijumu bez PMA je blago povećalo sadržaj GSH (Slika 38). Generalno, koncentracija GSH ostala je u opsegu od 30-45 μM , ukazujući na ograničen uticaj trajanja stimulacije sa PMA, vremena odmora i ukupnog vremena provedenog u kulturi na unutarćelijski sadržaj GSH.



Slika 38. Koncentracija GSH u THP-1 makrofagima diferenciranim različitim tretmanima. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05 , bez statističke značajnosti.

Na osnovu prikazanih rezultata, optimalna diferencijacija THP-1 monocita u makrofage postignuta je tretmanom koji je obuhvatao 48 h inkubacije u medijumu sa 100 ng /mL PMA praćene sa 72 h inkubacije u medijumu bez PMA (režim 48-72). Makrofagi diferencirani primenom režima 48-72 imaju veću površinu ćelije i nukleusa u poređenju sa monocitima, nepromenjen odnos površine nukleusa u odnosu na monocite, kao i nepromenjen nivo GSH. Ovako diferencirani makrofagi su analizirani protočnom citometrijom gde je, u poređenju sa monocitima, pokazano povećanje ekspresije površinskih markera koji se povezuju sa pravilnom funkcijom makrofaga, CD54 (ICAM-1) i CD86 (B7). U poređenju sa kulturom THP-1 monocita, procenat CD54+ i CD86+ ćelija u kulturi značajno se povećao nakon diferencijacije primenom režima 48-72 - procenat CD54+ ćelija je bio oko 80% (vs. 15% u kulturi monocita) (Slika 39). Tretman LPS-om (0,1 i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) je značajno povećao zastupljenost CD54+ u poređenju sa kulturom netretiranim THP-1 makrofagima (Slika 39).

Svi dalji eksperimenti u ovom radu sprovedeni su na THP-1 makrofagima dobijenim primenom 42-72 režima diferencijacije.

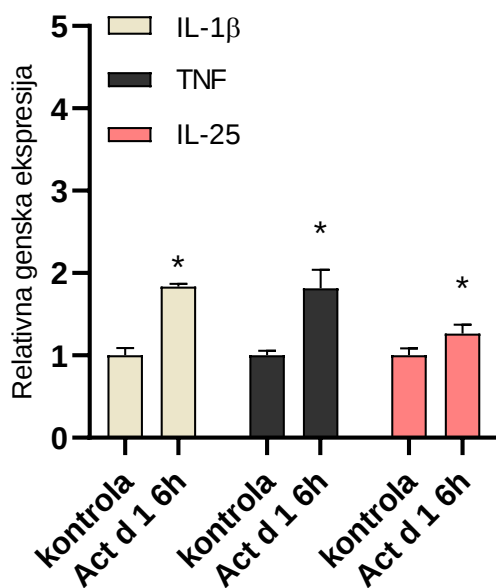


Slika 39. Ekspresija površinskih markera CD54 i CD86. THP-1 monociti, naivni makrofagi i makrofagi tretirani LPS-om (0,1 i 1 µg/mL) analizirani su protočnom citometrijom nakon inkubacije sa anti-CD54-FITC i anti-CD86-FITC antitelima i prikazan je procenat FITC pozitivnih ćelija. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

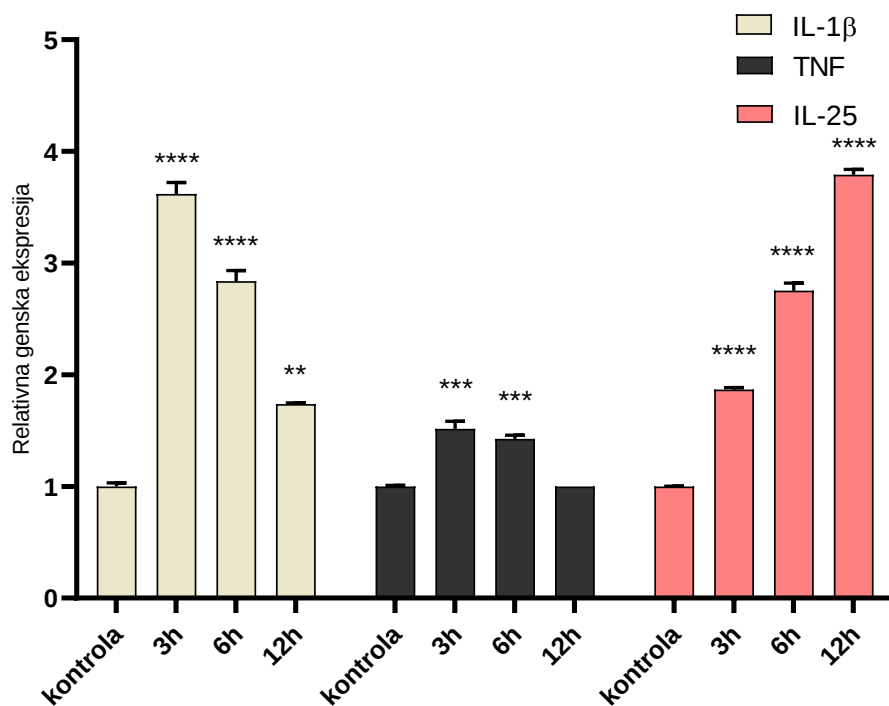
4.6.2 Optimizacija dužine trajanja tretmana

Nakon optimizacije postupka diferencijacije, optimizovano je trajanje tretmana sa Act d 1 i LPS koje je neophodno da izazove proinflamatorni efekat u THP-1 makrofagima. Prethodni radovi sa alergenom Act d 1 na epitelnim ćelijama su pokazali da je koncentracija Act d 1 od 1 mg/mL dovoljna da nakon 6 h izazove ekspresiju proinflamatornih citokina. Nakon 6 h tretmana Act d 1 uočeno je značajno povećanje ekspresije svih analiziranih citokina u THP-1 makrofagima (Slika 40).

Pored Act d 1 korišćen je i LPS (100 ng/mL) za tretman THP-1 makrofaga u tri različita vremenska intervala, 3, 6 i 12 h. Genska ekspresija *IL-1 β* , *IL-25* i *TNF* je analizirana PCR-om. Kinetika ekspresije analiziranih citokina varira, a analiza promene relativne genske ekspresije pokazuju da je ekspresija *IL-1 β* i *TNF* gena najveća nakon 3 h, zatim blago opada posle 6 i 12 h tretmana (Slika 41). Kada je reč o *IL-25*, njegova ekspresija postepeno raste tokom vremena, dostižući pik na 12 h (Slika 41). Iako pokazuju različitu kinetiku ekspresije, genska ekspresija svih analiziranih citokina je značajno povišena nakon 6 h. Vreme tretmana Act d 1 od 6 h takođe daje primetne promene u genskoj ekspresiji analiziranih citokina (Slika 40).



Slika 40. Genska ekspresija citokina u THP-1 makrofagima. Čelije su tretirane sa Act d 1 (1 mg/mL) tokom 6 h i genska ekspresija je analizirana PCR-om. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (two-way ANOVA): * $p < 0,05$.



Slika 41. Genska ekspresija citokina u THP-1 makrofagima. Čelije su tretirane LPS-om (100 ng/mL) tokom 3, 6 i 12 h i genska ekspresija je analizirana PCR-om. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne

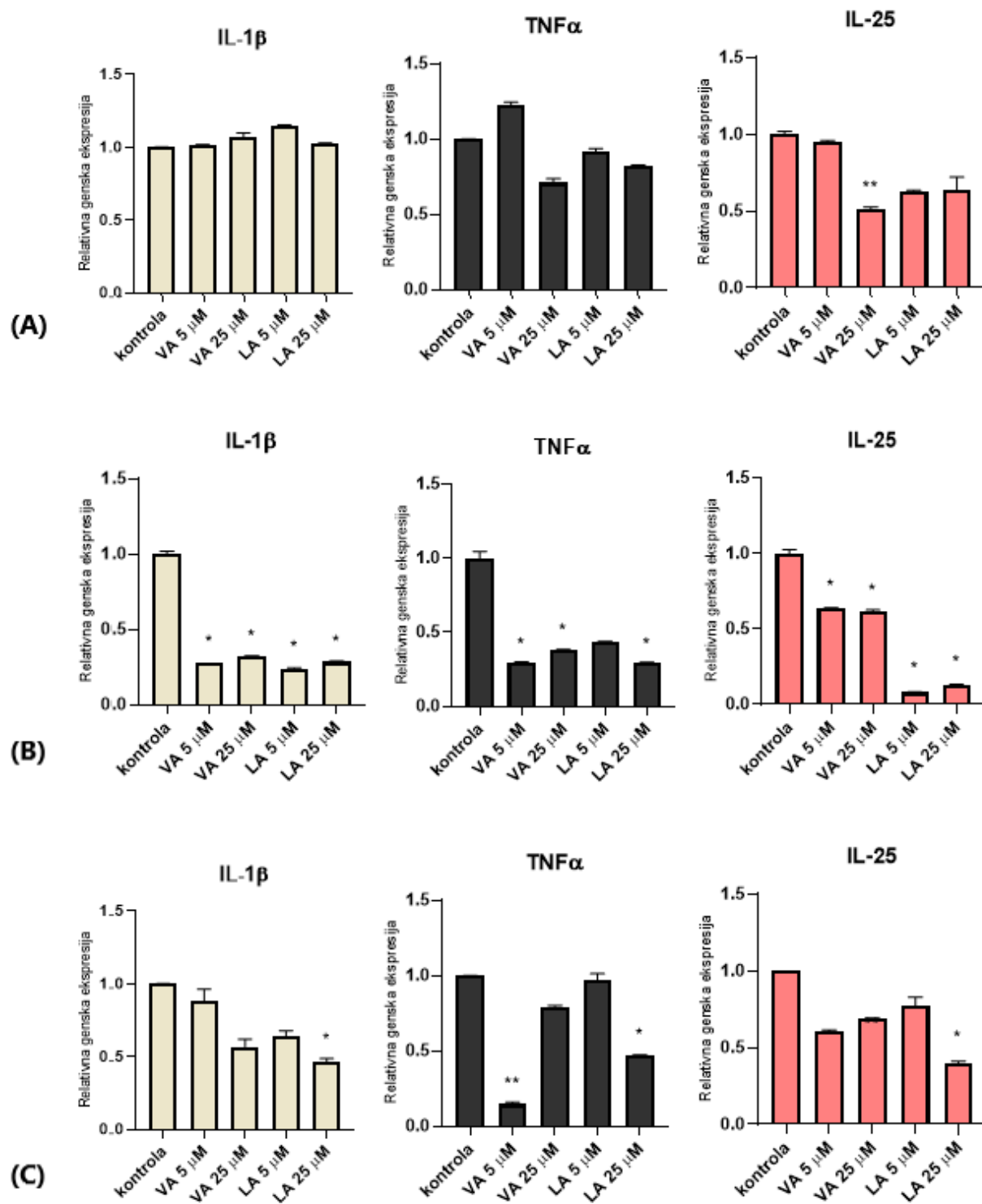
vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (two-way ANOVA): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, * u poređenju sa kontrolom.

4.7 Uticaj malih molekula na proinflamatorne citokine

Potencijal odabranih malih molekula da utiče na proizvodnju i gensku ekspresiju proinflamatornih citokina je testran *in vitro* u različitim ćelijskim linijama (Caco-2, HEK293, THP-1). Nakon tretmana, analizirana je genska ekspresija PCR metodom i sekrecija citokina u ćelijskom supernatantu ELISA metodom.

4.7.1 Mali molekuli ne pokazuju proinflamatorni efekat

Ekspresija gena za *IL-1 β* , *IL-25* i *TNF* analizirana je nakon tretmana ćelijskih linija sa vanilil alkoholom (VA) i laurinskom kiselinom (LA) u dve različite koncentracije (5 i 25 μ M), kako bi se ispitalo da li ovi molekuli imaju efekte na ekspresiju gena bez prethodnog tretmana proinflamatornim stimulusima. Korišćene su 3 ćelijske linije: THP-1 makrofagi, Caco-2 i HEK293 epitelne ćelije. Ni u jednoj ćelijskoj liniji nije zabeleženo statistički značajno povećanje ekspresije citokina usled VA i LA tretmana. U THP-1 makrofagima ekspresija *IL-1 β* i *TNF* gena je ostala nepromenjena, dok je ekspresija *IL-25* gena bila značajno niža nakon tretmana sa 25 μ M VA (Slika 42). U Caco-2 ćelijama uočen je pad ekspresije *TNF* nakon tretmana sa VA (5 μ M), kao i LA (25 μ M), gde je zabeležen značajan pad ekspresije sva tri analizirana citokina (Slika 42). U HEK293 ćelijama, ekspresija svih citokina je smanjena nakon tretmana sa VA i LA u obe koncentracije, ukazujući na njihov antiinflamatorni potencijal (Slika 42).



Slika 42. Uticaj malih molekula na ekspresiju citokina. Ekspresija gena za *IL-1 β* , *IL-25* i *TNF* je analizirana nakon 6 h tretmana sa VA i LA u (A) THP-1, (B) HEK293 i (C) Caco-2 ćelijama. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * u poređenju sa netretiranom kontrolom.

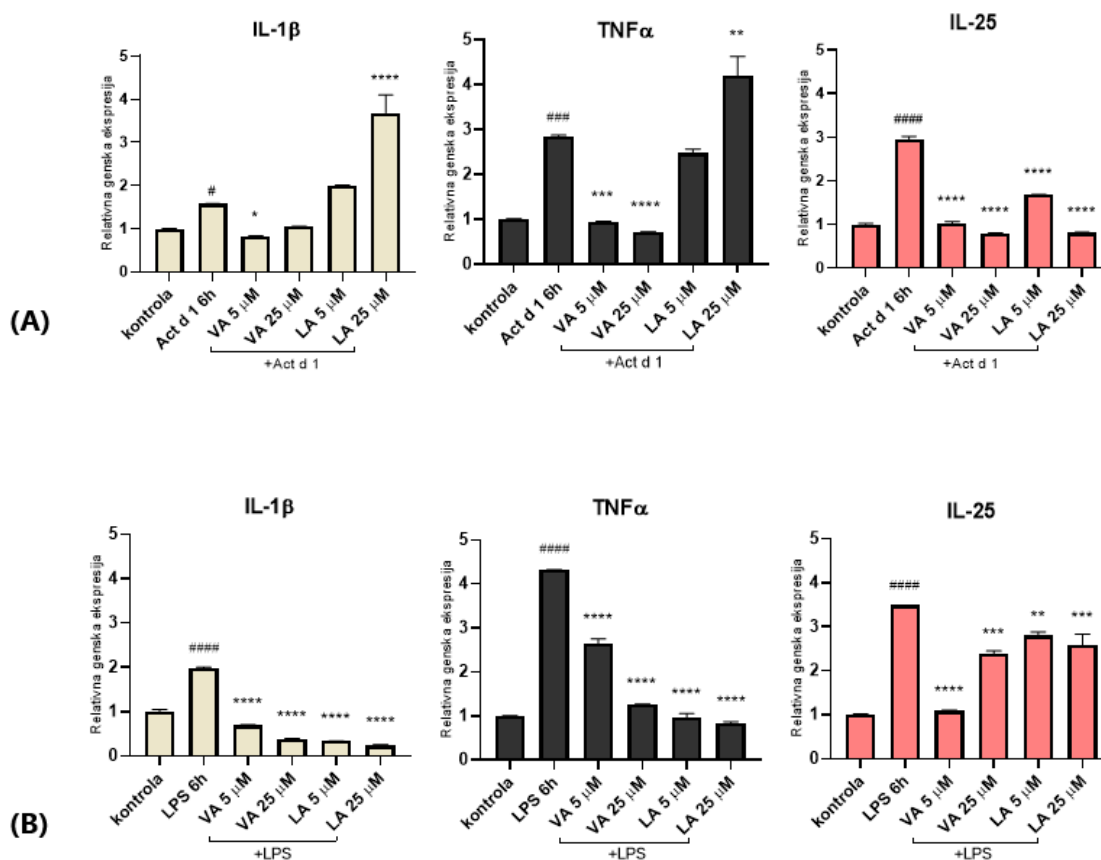
4.7.2 Mali molekuli utiču na gensku ekspresiju proinflamatornih citokina

Kako bi se ispitao uticaj VA i LA u imunskom odgovoru na odabrane proinflamatorne stimuluse, ćelije su tretirane sa 0,1 µg/mL LPS ili 1 mg/mL Act d 1, bez ili nakon pretretmana sa dve različite koncentracije VA i LA (5 i 25 µM).

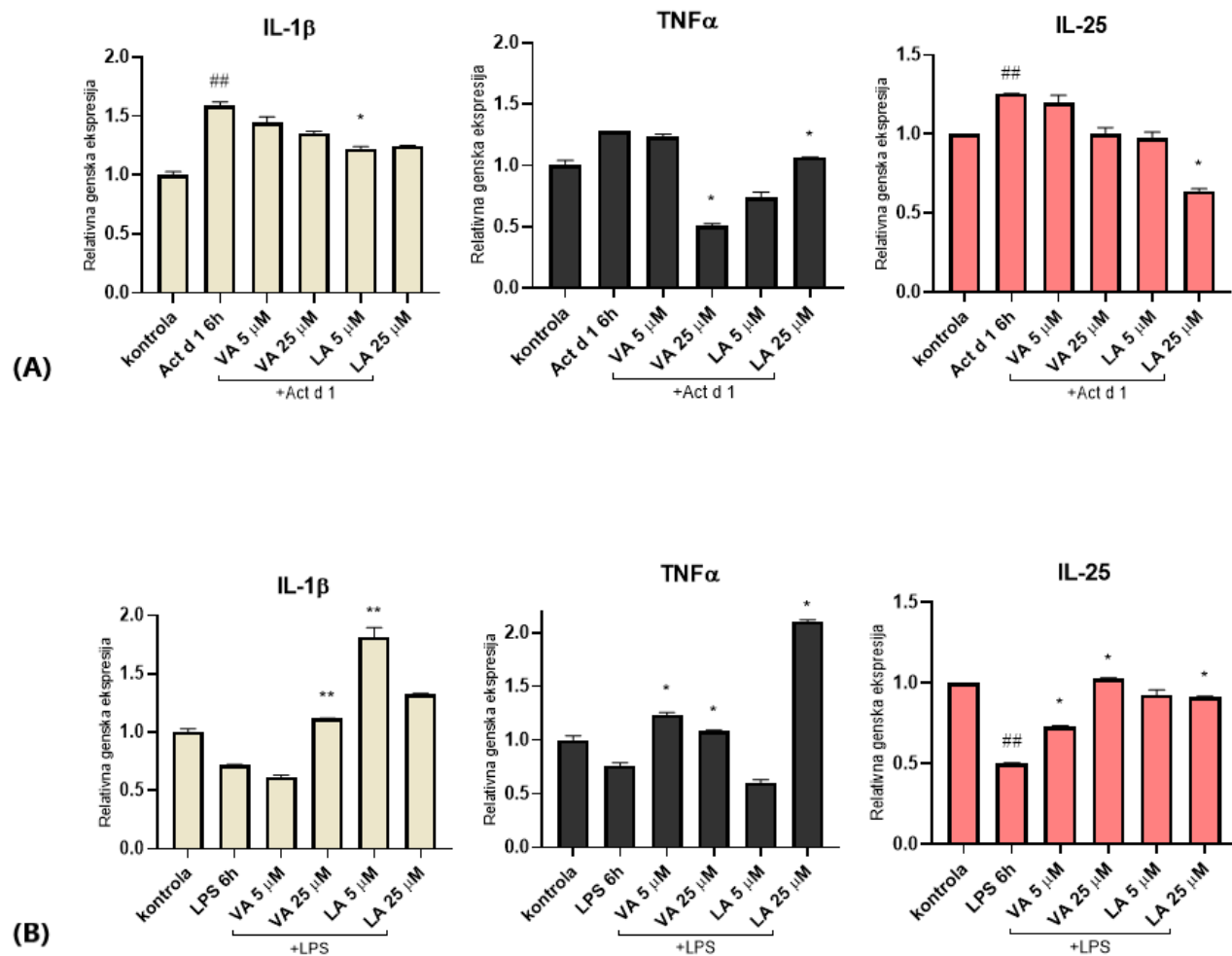
Nakon stimulacije sa Act d 1 i sa LPS, THP-1 makrofagi su pokazali očekivanu povećanu ekspresiju sva tri analizirana gena (*IL-1β*, *IL-25* i *TNF*). Pretretman sa obe koncentracije VA smanjio je Act d 1-indukovanu ekspresiju *IL-1β*, *IL-25* i *TNF* u THP-1 makrofagima. Međutim, LA nije doveo do značajnog smanjenja ekspresije *IL-1β* i *TNF*, već samo *IL-25* (Slika 43). LPS-izazvana ekspresija sva tri citokina bila je značajno umanjena i sa VA i sa LA (Slika 43).

U HEK293 ćelijama, Act d 1 je doveo do povećanja ekspresije *IL-1β* i *IL-25* ali ne i *TNF* (Slika 44). Modulatorni potencijal malih molekula se pokazao manje izraženim u ovom ćelijskom modelu nego u THP-1 makrofagima, i bio je primetan samo pri višoj dozi od 25 µM (Slika 44). Odsustvo odgovora na LPS u HEK293 ćelijama je verovatno posledica veoma niske ekspresije TLR4 na ovim ćelijama.

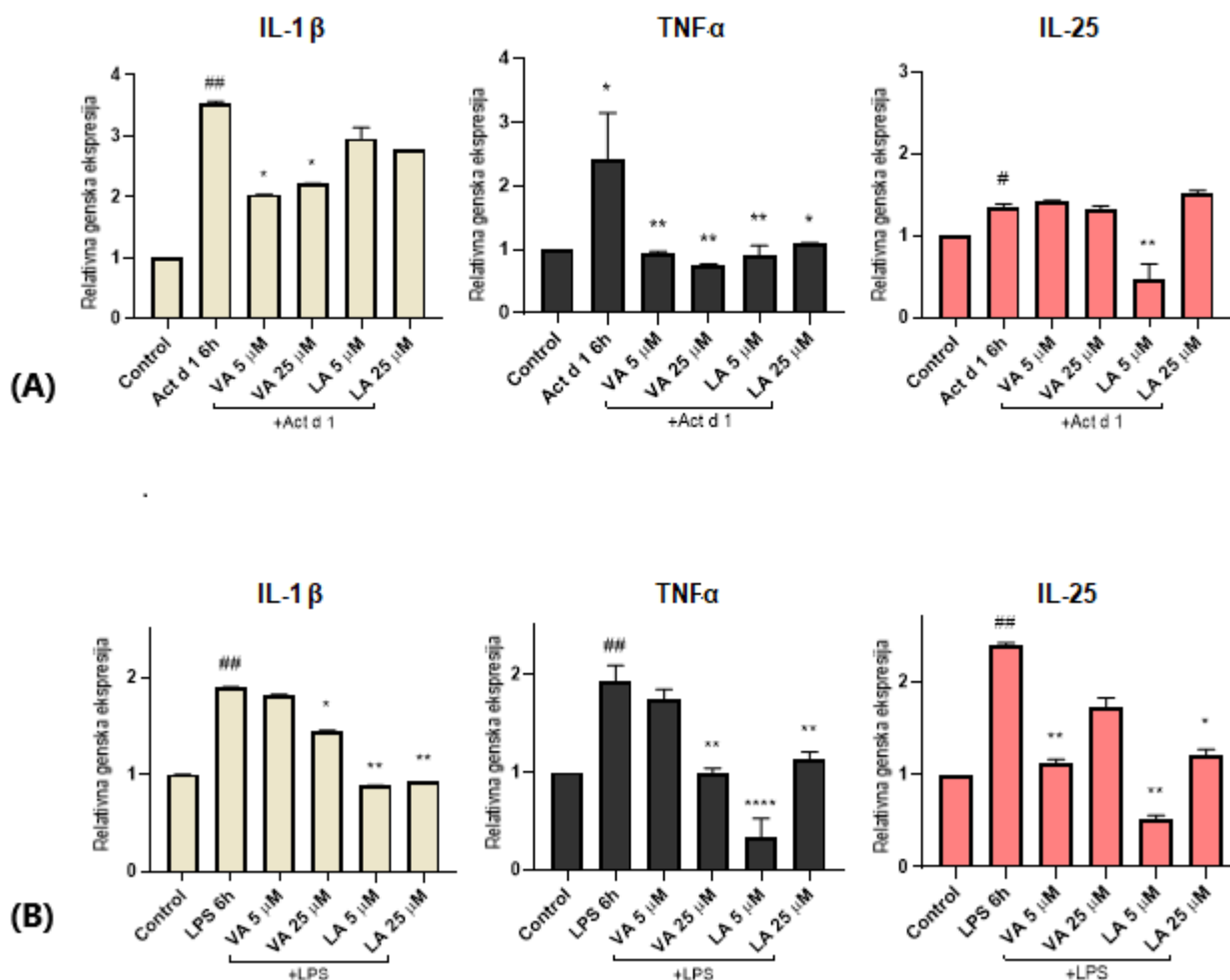
U Caco-2 ćelijama, nakon tretmana Act d 1, došlo je do smanjenja ekspresije *IL-1β* i *TNF* sa obe koncentracije VA, dok je u LPS tretiranim ćelijama došlo do značajnog smanjenja ovih citokina pri višoj koncentraciji VA (25 µM). LA je izazvao smanjenje *TNF* u obe koncentracije nakon tretmana sa oba proinflamatorna stimulusa, dok je *IL-1β* bio smanjen nakon pretretmana ovim molekulom samo u ćelijama koje su bile tretirane LPS-om ali ne i Act d 1, što je u skladu sa rezultatima dobijenim na THP-1 makrofagima. Ekspresija *IL-25* je značajno smanjena nakon tretmana sa LA (5 µM) i kod LPS i Act d 1 stimulisanih ćelija (Slika 45).



Slika 43. Modulacija genske ekspresije citokina u THP-1 ćelijama. Ekspresija gena za *IL-1β*, *IL-25* i *TNF* je analizirana nakon što su ćelije pretretirane različitim koncentracijama malih molekula tokom 1 h, a zatim stimulirane tokom 6 h sa (A) Act d 1 (1 mg/mL) ili (B) LPS (0,1 μg/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): */# p vrednost < 0.05, ** p vrednost < 0.01, ***/#### p vrednost < 0.001, ****/##### p vrednost < 0.0001, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.



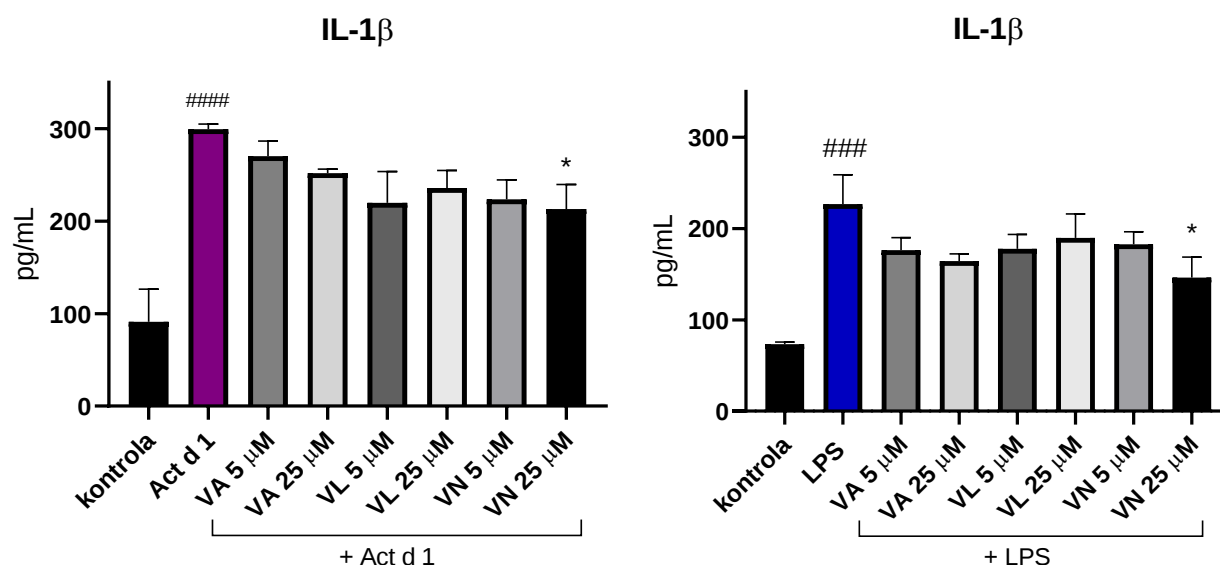
Slika 44. Modulacija genske ekspresije citokina u HEK293 ćelijama. Ekspresija gena za *IL-1 β* , *IL-25* i *TNF* je analizirana nakon što su ćelije pretretirane različitim koncentracijama malih molekula tokom 1 h, a zatim stimulirane tokom 6 h sa (A) Act d 1 (1 mg/mL) ili (B) LPS (0,1 μ g/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, **/### p vrednost < 0.01, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.



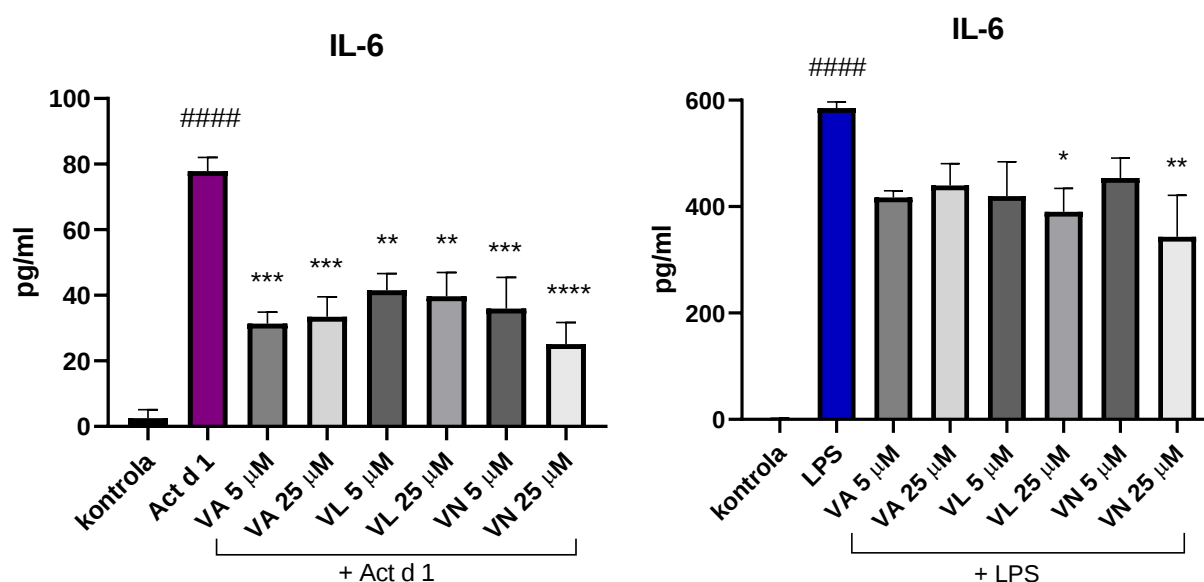
Slika 45. Modulacija genske ekspresije citokina u Caco-2 ćelijama. Ekspresija gena za *IL-1β*, *IL-25* i *TNF* je analizirana nakon što su ćelije pretretirane različitim koncentracijama malih molekula tokom 1 h, a zatim stimulirane tokom 6 h sa (A) Act d 1 (1 mg/mL) ili (B) LPS (0,1 μg/mL). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): */# p vrednost < 0.05, **/## p vrednost < 0.01, **** p vrednost < 0.0001, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.

4.7.3 Mali molekuli utiču na proizvodnju citokina

Efekat pretretmana THP-1 makrofaga malim molekulima na proizvodnju proinflamatornih citokina IL-1β i IL-6 procenjen je pomoću ELISA testa. Nakon tretmana sa Act d 1 i LPS primećen je porast koncentracije oba citokina u ćelijskim supernatantima. U LPS-stimulisanoj kulturi koncentracija IL-6 je bila oko 600 pg/mL, dok je nakon stimulacije sa Act d 1 koncentracija IL-6 bila oko 80 pg/mL, ukazujući na različiti proinflamatorni potencijal ovih stimulusa. Smanjena proizvodnja IL-1β uočena je nakon pretretmana sa 25 μM VN u modelima inflamacije izazvana i LPS-om i Act d 1 (Slika 46). Svi testirani mali molekuli doveli su do smanjenja proizvodnje IL-6 nakon tretmana sa Act d 1, dok su samo pretretmani sa VL (vanilil-laurat) i VN (vanilin) u višoj koncentraciji doveli do smanjenja proizvodnje IL-6 nakon LPS tretmana (Slika 47).



Slika 46. Uticaj malih molekula na proizvodnju IL-1β u THP-1 makrofagima. Čelije su pretretirane malim molekulima u koncentraciji od 5 i 25 μM, nakon čega su stimulisane sa Act d 1 (1 mg/mL) i LPS (0,1 μg/mL) tokom 24 h. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, **/### p vrednost < 0.001, ****/#### p vrednost < 0.0001, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.



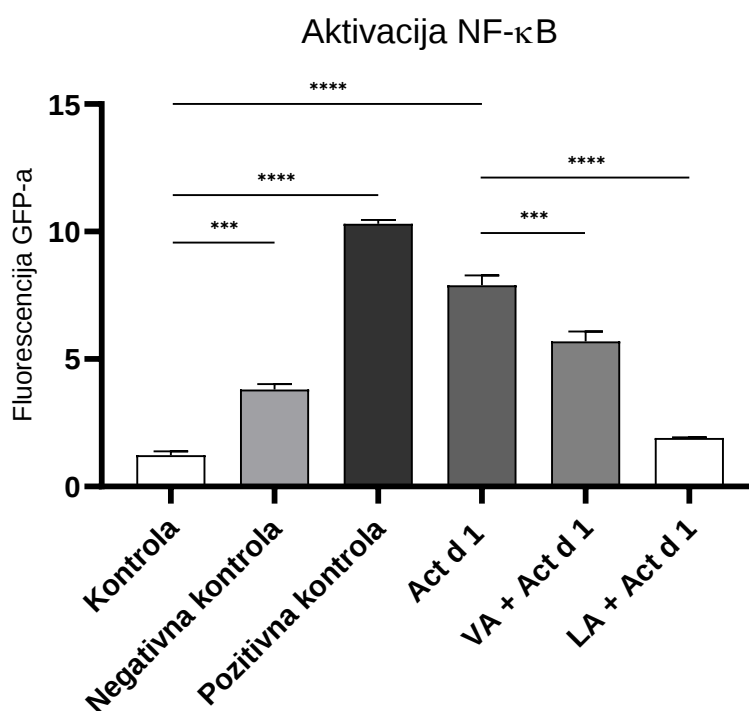
Slika 47. Uticaj malih molekula na proizvodnju IL-6 u THP-1 makrofagima. Čelije su pretretirane malim molekulima u koncentracijama od 5 i 25 μM, nakon čega su stimulisane sa Act d 1 (1 mg/mL) i LPS (0,1 μg/mL) tokom 24 h. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, ** p vrednost < 0.01, *** p vrednost < 0.001, ****/#### p vrednost < 0.0001, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.

4.8 Mali molekuli inhibiraju aktivaciju NF- κ B signalnog puta

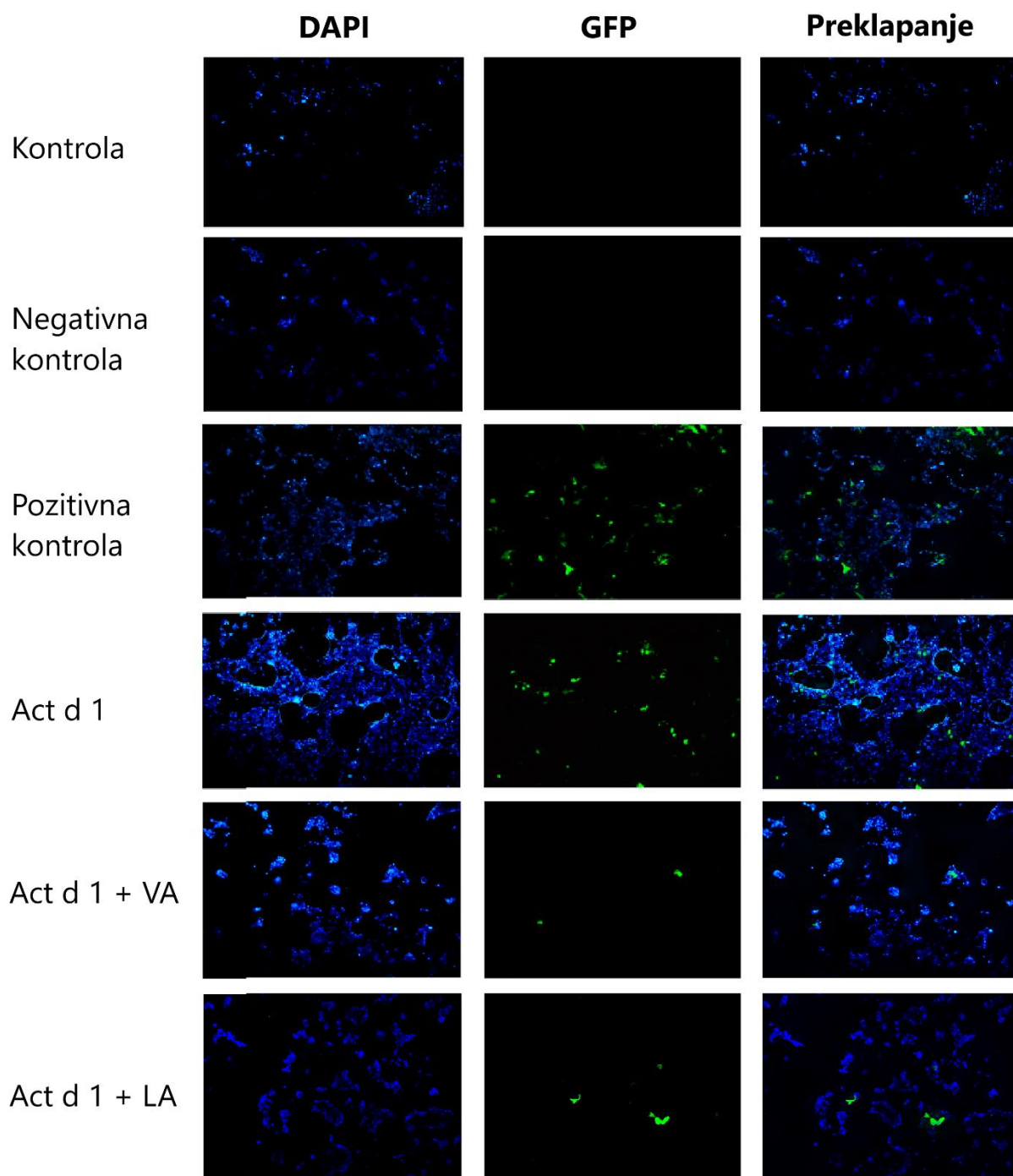
Promena proizvodnje i ekspresije proinflamatornih citokina može biti pokazatelj stepena aktivacije specifičnih signalnih puteva regulisanim transkripcionim faktorima. Kako je poznato da je LPS snažan aktivator NF- κ B signalnog puta, kao i da Act d 1 aktivira ovaj signalni put na TLR4-zavisan način, ispitan je uticaj malih molekula na NF- κ B aktivaciju i na ekspresiju p65 proteina, glavne subjedinice uključene u aktivaciju ovog signalnog puta, u različitim model sistemima.

4.8.1 Aktivacija NF- κ B u epitelnim ćelijama

Stepen aktivacije u HEK293 epitelnim ćelijama je analiziran nakon stabilne transfekcije NF- κ B-GFP plazmidom. Ćelije su tretirane sa 1 mg/mL Act d 1, bez ili sa pretretmanom sa vanilil alkoholom (VA) i laurinskom kiselinom (LA) (25 μ M) nakon čega je ekspresija NF- κ B analizirana FACS-om odnosno fluorescentnom mikroskopijom. Obe metode su pokazale da VA i LA inhibiraju Act d 1-posredovanu aktivaciju NF- κ B u HEK293 ćelijama (Slika 48 i 49). U ovom eksperimentu, LA je ispoljila izraženiji modulacioni efekat, smanjujući aktivaciju NF- κ B do nivoa negativne kontrole, dok je VA dovela do značajnog smanjenja u poređenju sa Act d 1 (Slika 48).



Slika 48. Aktivacija NF- κ B u HEK293 epitelnim ćelijama. HEK293 ćelije su stabilno transfektovane NF- κ B-GFP plazmidom i tretirane sa Act d 1 (1 mg/mL), bez ili uz pretretman sa VA ili LA (25 μ M). Ekspresija GFP-a je analizirana FACS-om. Prikazani rezultati predstavljaju prosećne vrednosti $\pm$ SEM. Statistićka znaćajnost (one-way ANOVA); *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

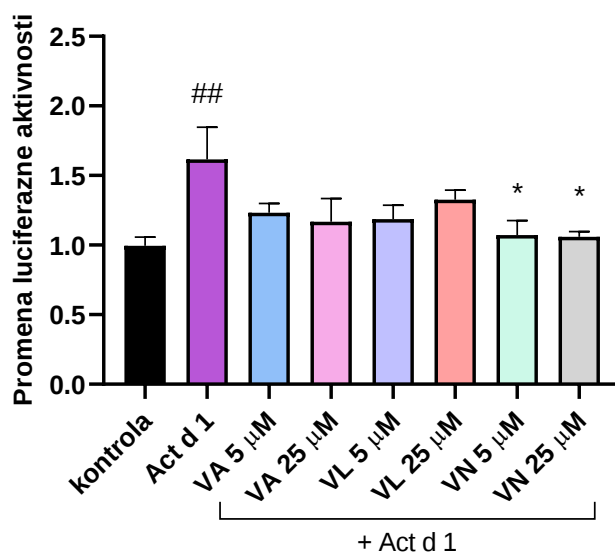


Slika 49. Aktivacija NF- κ B u HEK293 epitelnim ćelijama. HEK293 ćelije su stabilno transfektovane NF- κ B-GFP plazmidom i tretirane sa Act d 1 (1 mg/mL), bez ili uz pretretman sa VA ili LA (25 μ M). Fluorescentna mikroskopija je korišćena za vizuelizaciju GFP ekspresije nakon transfekcije i tretmana.

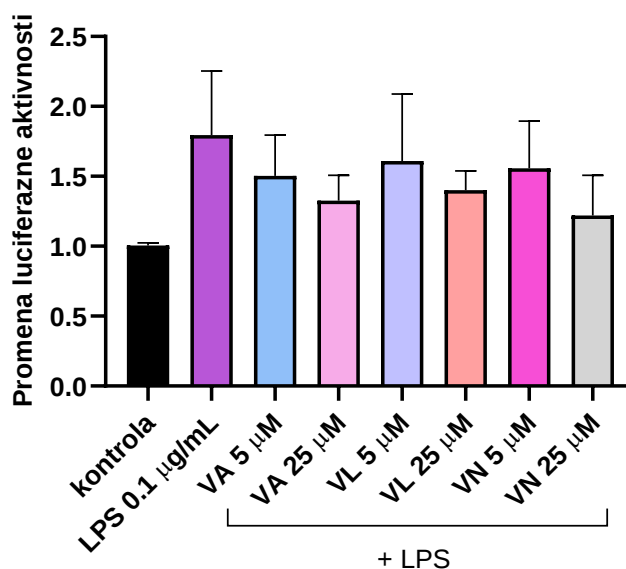
4.8.2 Aktivacija NF- κ B u THP-1 makrofagima

Reporter sistem za procenu stepena aktivacije NF- κ B je uspostavljen u THP-1 makrofagima, nakon stabilne transfekcije ćelija NanoLuc® reporter vektorom sa NF- κ B elementom odgovora. Nakon stimulacije sa LPS, odnosno Act d 1, došlo je do porasta relativne luciferazne aktivnosti u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 50). Pretretman sa obe koncentracije VN nakon stimulacije sa Act d 1, doveo je do smanjenja NF- κ B aktivnosti blizu nivoa aktivacije u kontrolnoj grupi (Slika 50). Međutim, u ćelijama stimulisanim LPS smanjenje NF- κ B aktivnosti pod uticajem vaniloida nije pokazalo statističku značajnost (Slika 50).

NF- κ B aktivacija



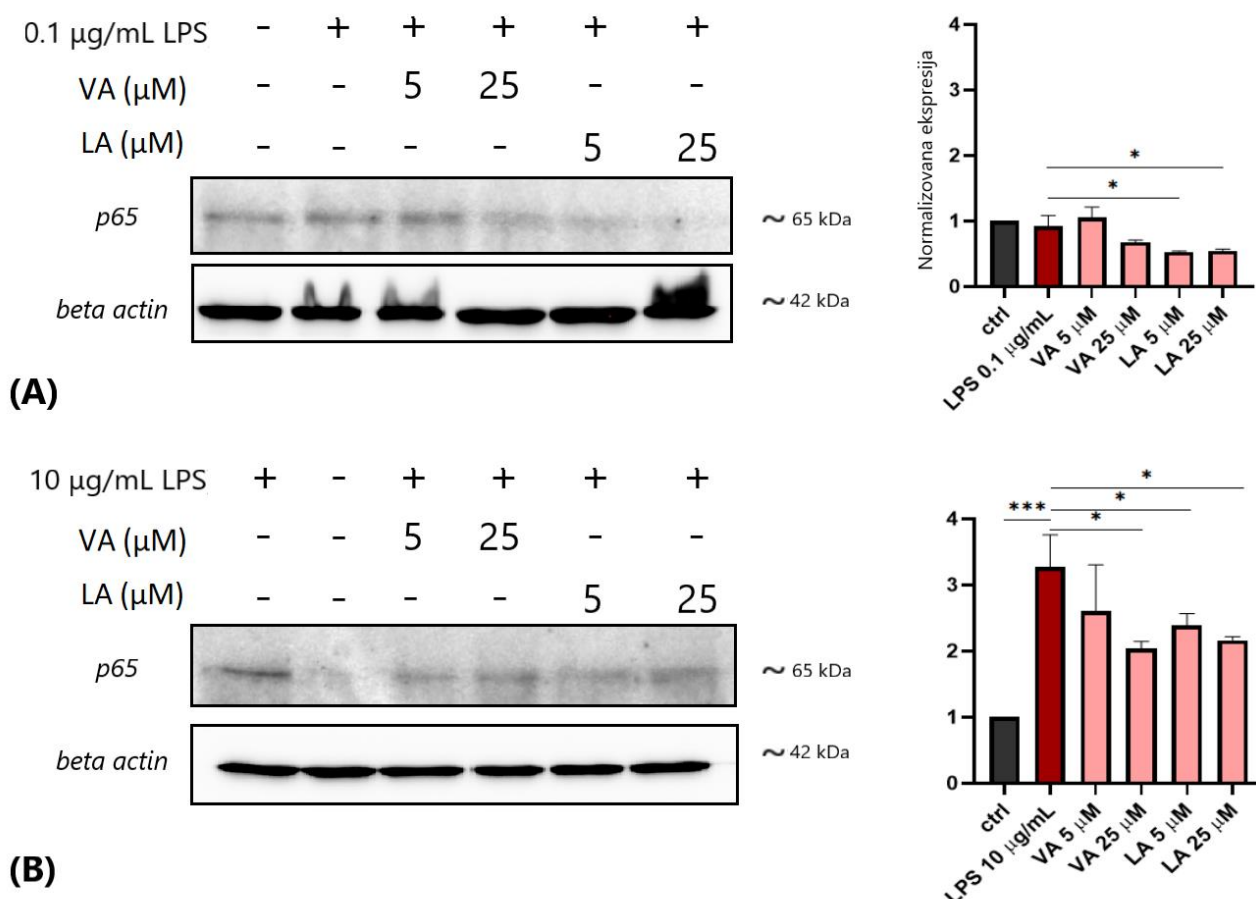
NF- κ B aktivacija



Slika 50. Uticaj malih molekula na aktivnost NF- κ B u THP-1 makrofagima. THP-1 makrofagi su stabilno transfektovani NanoLuc® reporter vektorom sa NF- κ B elementom odgovora i stimulisani su tokom 24 h sa 0,1 μ g/mL LPS ili 1 mg/mL Act d 1, sa ili bez pretretmanom odgovarajućim vaniloidima u koncentracijama od 5 ili 25 μ M. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): */# p vrednost < 0.05, **/## p vrednost < 0.01, * u poređenju sa netretiranom kontrolom, # u poređenju sa LPS/Act d 1.

4.8.3 Ekspresija p65 subjedinice

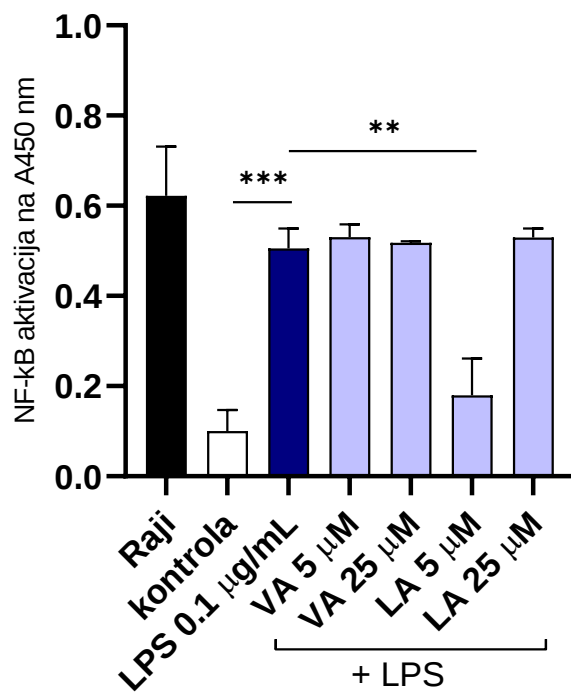
Nakon pokazanog imunomodulatornog uticaja LA odnosno VA na aktivaciju NF- κ B, ova dva molekula su odabrana kako bi se analizirao njihov efekat na p65 subjedinicu, glavnu komponentu NF- κ B signalnog puta. Korišćen je model sistem THP-1 makrofaga, gde je pomoću imunoblot metode procenjena ukupna ekspresija p65 u ćelijama nakon odgovarajućih tretmana. Za stimulaciju korišćen je Act d 1 (1 mg/mL), kao i 2 koncentracije LPS (0,1 i 10 μ g/mL). Nakon tretmana sa Act d 1 nisu uočene trake poreklom od p65 komponente na imunoblotu, moguće usled proteolitičke aktivnosti ovog alergena, što je onemogućilo analizu ekspresije p65 imunoblotom. Iako su uzorci pripremani u prisustvu koktela proteaznih inhibitora i na hladnom, moguće je da je ovaj postupak bio nedovoljno efikasan u inhibiciji Act d 1 i da je neophodno koristiti ireverzibilni proteazni inhibitor specifičan za cistein proteaze, kao što je E64, u većoj koncentraciji. Kod tretmana LPS-om, dobijene su jasne trake na imunoblotu na molekulskoj masi od 65 kDa, koja odgovara masi komponente p65. Za procenu nivoa ekspresije korišćena je denzitometrijska analiza. Ekspresija β -aktina analizirana je radi normalizacije ekspresije p65. U LPS-tretiranoj grupi, ekspresija p65 povećala se nakon tretmana 10 μ g/mL LPS, dok je ekspresija značajno opala nakon pretretmana i sa VA (25 μ M) i sa LA (5 i 25 μ M) (Slika 51). Ćelije koje su tretirane nižom koncentracijom LPS-a nisu pokazale značajno povećanje ekspresije p65 (Slika 51).



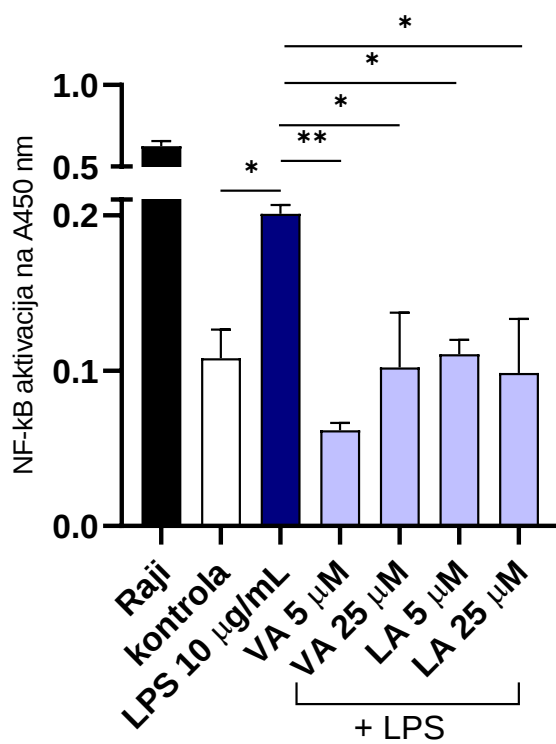
Slika 51. Ekspresija p65 komponente u THP-1 makrofagima. Ekspresija p65 i β -aktina je analizirana imunoblotom nakon tretmana sa (A) 0,1 i (B) 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS-a, sa ili bez pretretmana odgovarajućih malih molekula. Normalizacija ekspresije p65 je urađena u odnosu na ekspresiju β -aktina nakon denzitometrijske analize. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, *** p vrednost < 0.001.

4.8.4 Aktivacija NF- κ B i translokacija p65 komponente u nukleus

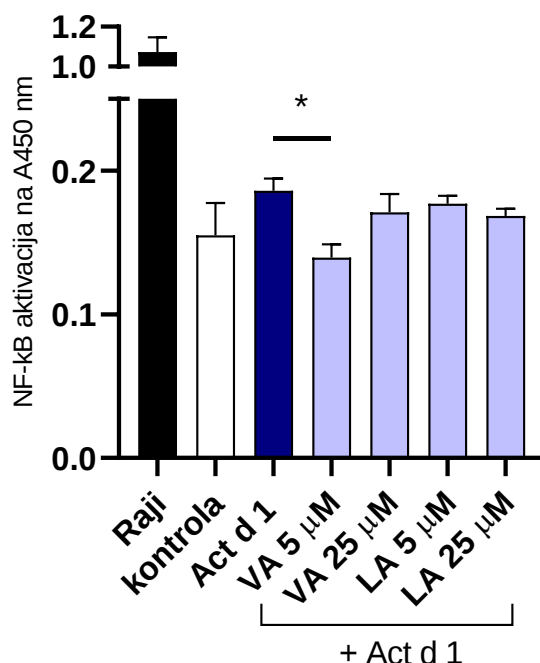
Nakon aktivacije NF- κ B signalne kaskade, p65 se premešta u nukleus gde utiče na ekspresiju ciljanih gena. Da bi se analizirao efekat VA i LA na translokaciju ove komponente u nukleus korišćena je ELISA metoda sa kuplovanom DNK oligonukleotidnom sekvencom (sekvenca sa NF- κ B elementom odgovora specifičnim za p65 komponentu). U poređenju sa netretiranom grupom ćelija, Act d 1 je doveo do blagog povećanja nuklearnog p65, dok je nakon pretretmana sa VA (5 μM), njegov nivo bio značajno smanjen (Slika 52). Primećen je porast p65 u nuklearnim ekstraktima i nakon tretmana sa obe koncentracije LPS-a. Značajno smanjenje u obe LPS-tretirane grupe je primećeno nakon pretretmana sa LA (5 μM), dok je u ćelijama koje su tretirane sa 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS-a ovo smanjenje primećeno sa svim testiranim molekulima u obe koncentracije (Slika 52).



(A)



(B)

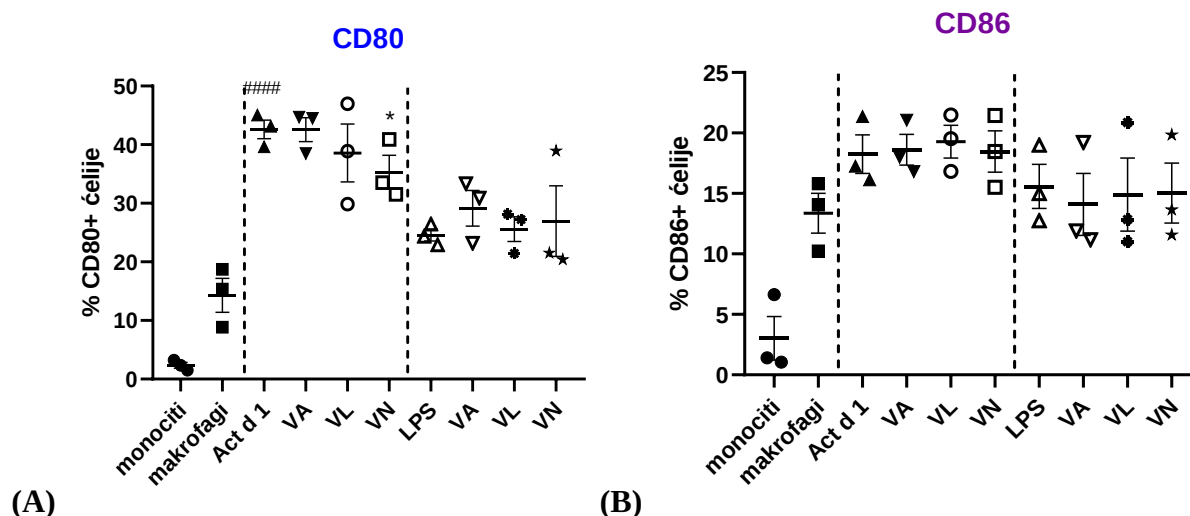


(C)

Slika 52. Analiza prisustva p65 komponente u nuklearnim ekstraktima THP-1 makrofaga. Količina p65 je analizirana DNK vezujućim testom u nuklearnim ekstraktima ćelija nakon tretmana sa (A) 1 mg/mL Act d 1, (B) 0,1 i (C) 10 μg/mL LPS-a, sa ili bez pretretmana odgovarajućih malih molekula. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, ** p vrednost < 0.01, *** p vrednost < 0.001.

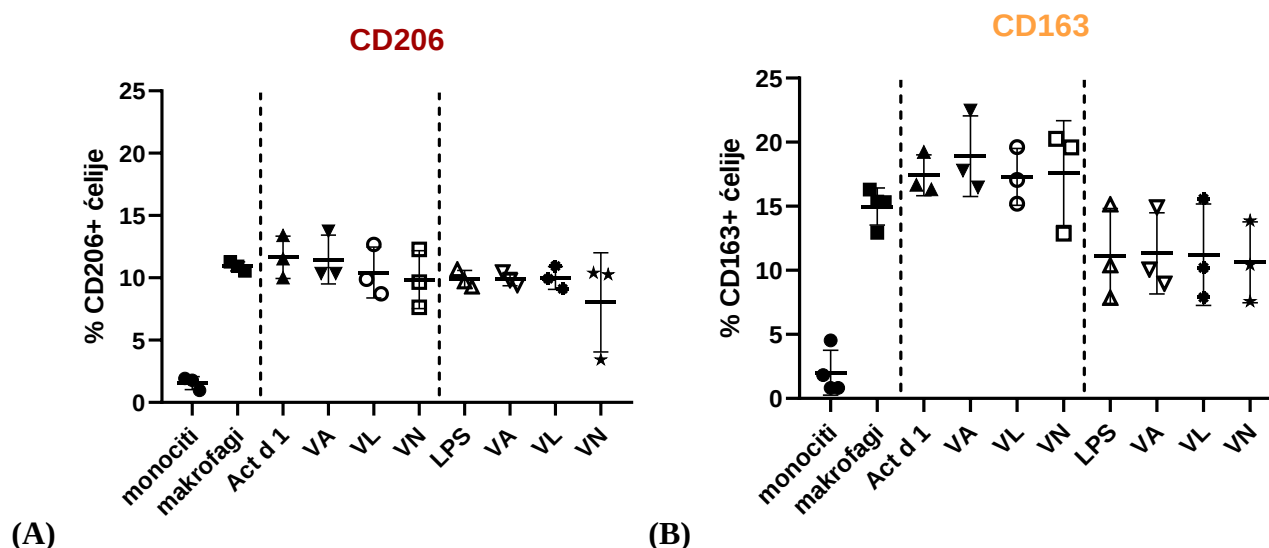
4.9 Fenotipske promene u THP-1 makrofagima pod uticajem Act d 1 i malih molekula

Polarizacija makrofaga i fenotipske promene predstavljaju ključne događaje u toku imunskog odgovora. Da bi se analizirale promene fenotipa THP-1 ćelija, korišćena je protočna citometrija za analizu ekspresije M1 i M2 površinskih markera. Analizirana su dva M1 markera: CD80 (B7-1) membranski protein koji je neophodan za aktivaciju T ćelija, i CD86 (B7-2), molekul sa ključnom ulogom u kostimulatornom signalu T ćelijama. Act d 1 je doveo do ekspresije CD80 u više od 40% ukupne populacije makrofaga, pokazajući čak i potentniji efekat od LPS-a (0,1 μg/mL) (Slika 53). Pretretman sa VN (25 μM) je doveo do značajnog smanjenja zastupljenosti CD80⁺ THP-1 makrofaga u poređenju sa Act d 1 stimulacijom, iako je njihova zastupljenost i dalje bila viša nego u kulturi naivnih makrofaga (Slika 53). Tretman THP-1 makrofaga sa Act d1, sa ili bez pretretmana sa malim molekulima, nije značajno povećao zastupljenost CD86⁺ ćelija u kulturi (Slika 53).



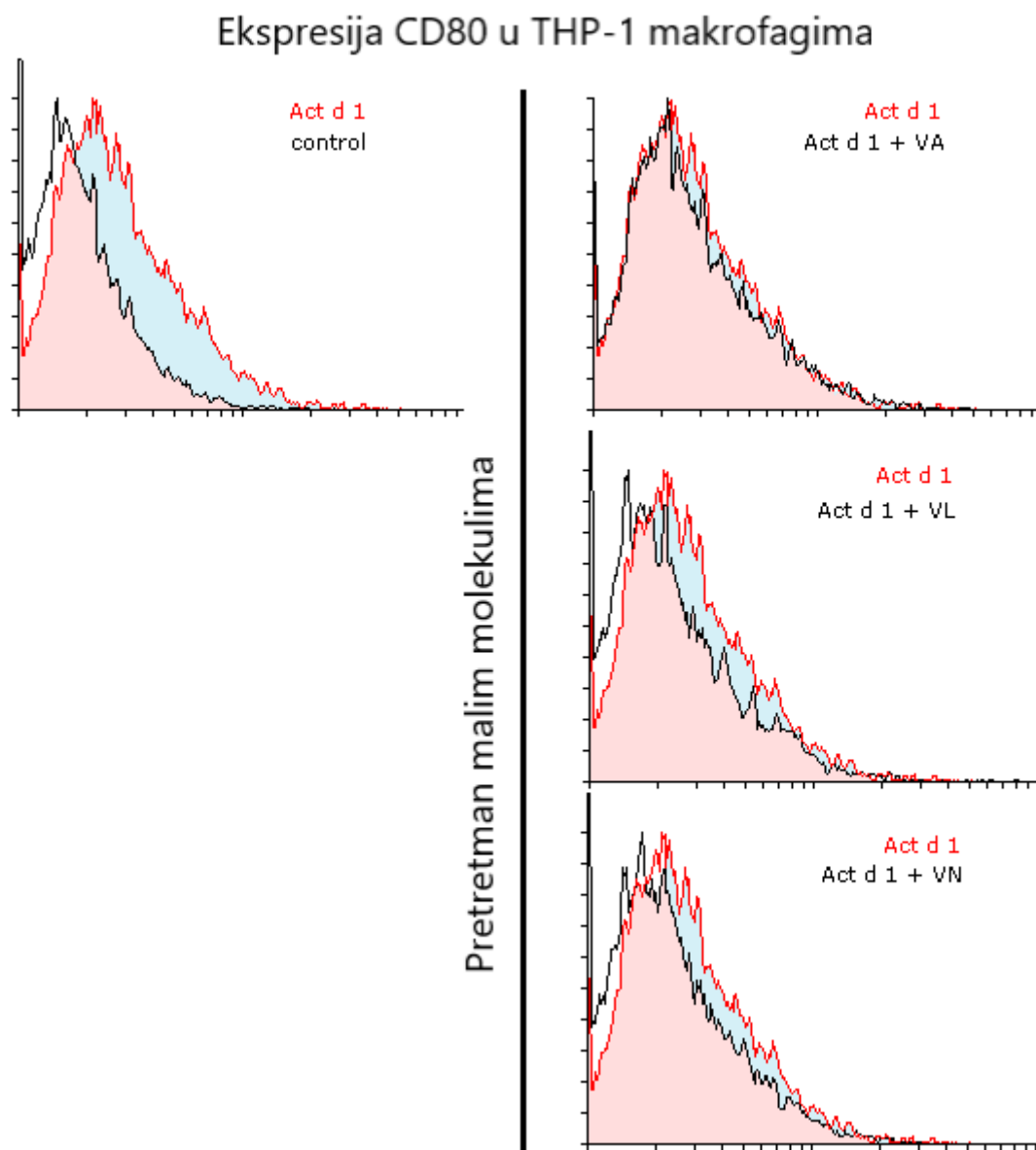
Slika 53. Ekspresija M1 površinskih markera na THP-1 makrofagima nakon tretmana sa Act d 1 i malim molekulima. Ekspresija (A) CD80 i (B) CD86 je analizirana protočnom citometrijom nakon pretretmana vaniloidima i stimulaciji makrofaga sa Act d 1 (1 mg/mL) ili LPS-om (0,1 µg/mL) tokom 24 h. Rezultati su prikazani kao % pozitivnih ćelija, prosečna vrednost ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0,05, ****/##### p vrednost < 0,0001, * u poređenju sa Act d 1/LPS, # u poređenju sa netretiranim naivnim makrofagima.

Pored pomenutih M1 markera polarizacije, analizirani su i M2 markeri: manozni receptor CD206 i skevendžer receptor CD163. Nije zabeležena promena ekspresije ovih površinskih molekula ni u jednom korišćenom tretmanu sa Act d 1, LPS ni malim molekulima (Slika 54), ukazujući na predominantnu M1 polarizaciju makrofaga.



Slika 54. Ekspresija M2 površinskih markera na THP-1 makrofagima nakon tretmana sa Act d 1 i pretretmanom malim molekulima. Ekspresija (A) CD206 i (B) CD163 je analizirana protočnom citometrijom nakon pretretmana vaniloidima i stimulacijom makrofaga sa Act d 1 (1 mg/mL) ili LPS-om (0,1 µg/mL) tokom 24 h. Rezultati su prikazani kao % pozitivnih ćelija, prosečna vrednost ± SEM.

Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05 , bez statističke značajnosti.



Slika 55. Ekspresija CD80 u THP-1 makrofagima tretiranim sa Act d 1. Razlike u ekspresiji CD80 su prikazane na preklapajućim histogramima u poređenju sa kontrolom netretiranih makrofaga (levo), i u poređenju sa makrofagima pretretiranim vaniloidima (desno). Prikazan je reprezentativni rezultat iz 3 nezavisna eksperimenta.

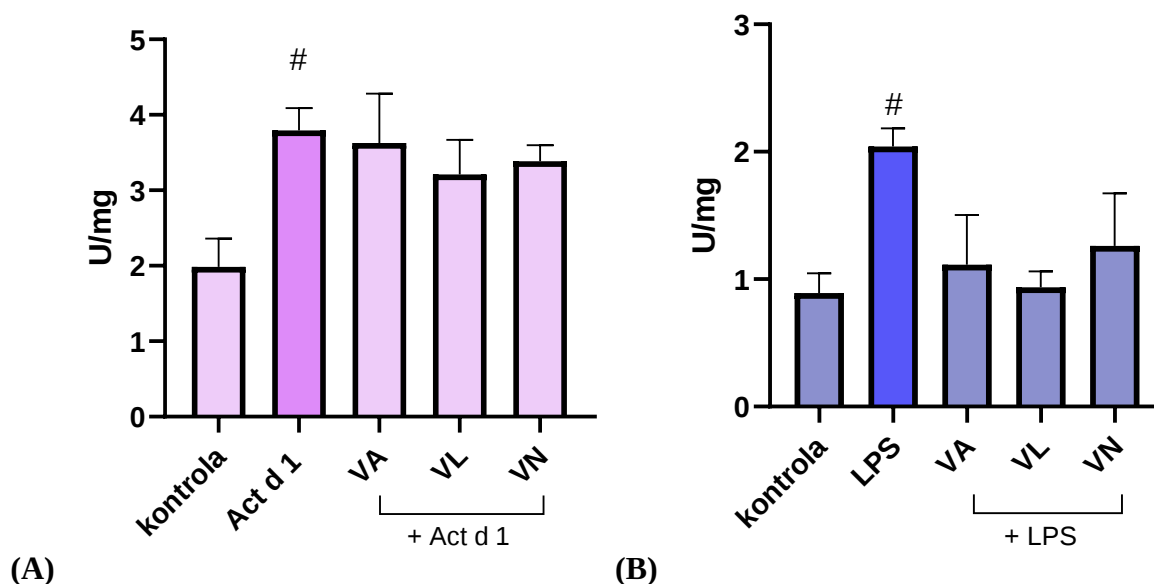
4.10 Antioksidativno dejstvo malih molekula

Aktivacija proinflamatornih signalnih puteva kao i M1 polarizacija makrofaga je često praćena i povećanjem oksidativnog stresa i oksidativnih markera u ćeliji. Oksidativni stres tj. povećanje proizvodnje ROS i NO, prati povećana ekspresija antioksidativnih enzima kao što su katalaza (CAT) i superoksid-dizmutaza (SOD) i smanjenje ukupnog sadržaja redukovanih tiola. Analizom nekih od

pomenutih parametara procenjeno je prooksidativno dejstvo korišćenih stimulusa Act d 1 i LPS, kao i antioksidativno dejstvo malih molekula.

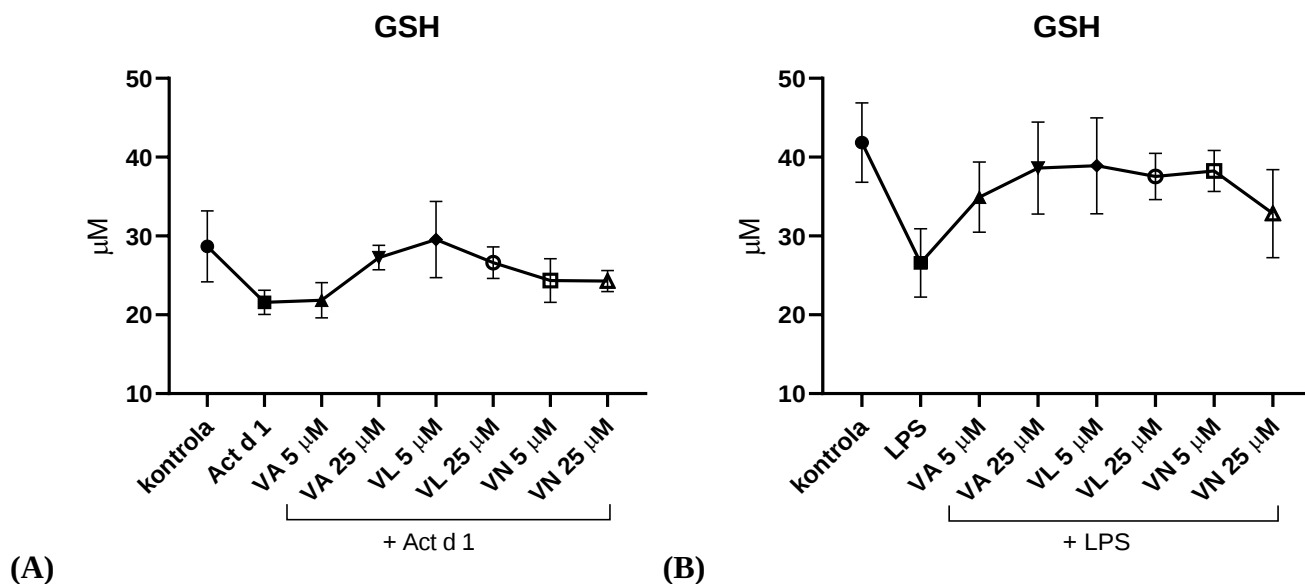
4.10.1 Parametri oksidativnog stresa

Aktivnost katalaze je merena u ćelijskim lizatima nakon odgovarajućih tretmana. I Act d 1 i LPS su povećali aktivnost ovog enzima u THP-1 makrofagima, što ukazuje na povećani oksidativni stres (Slika 56). Iako vaniloidi korišćeni za pretretman nisu statistički značajno izmenile aktivnost ovog enzima, doveli su do smanjenja aktivnosti katalaze nakon tretmana LPS-om (Slika 56).



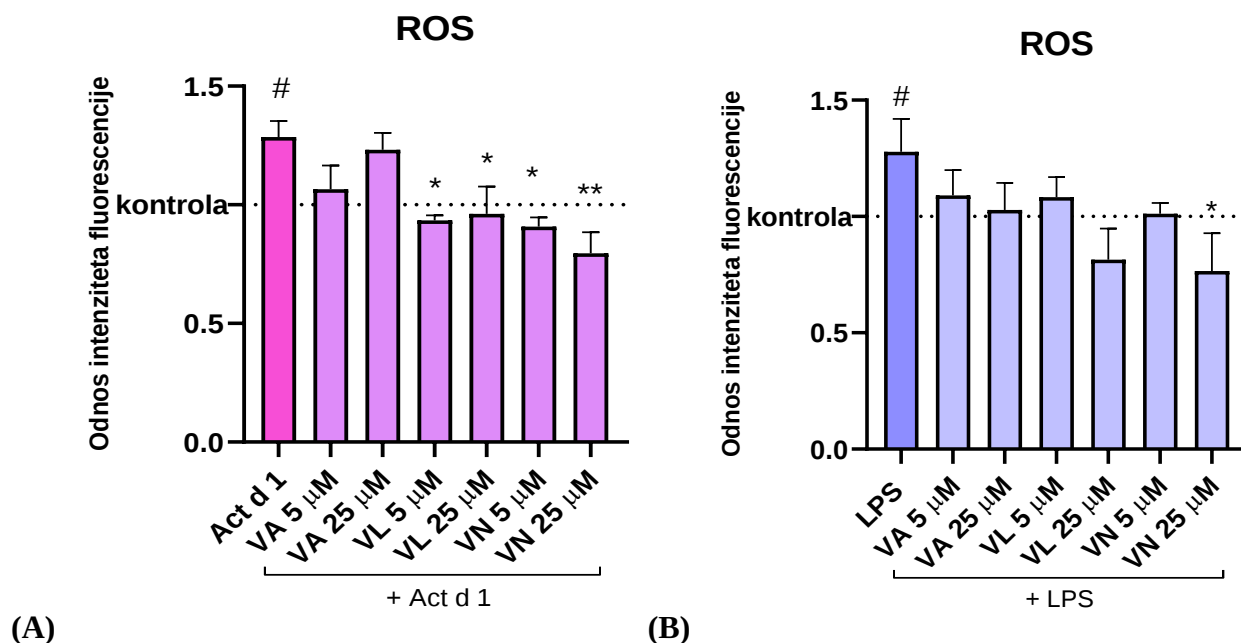
Slika 56. Aktivnost katalaze u THP-1 makrofagima. Ćelije su stimulisane sa (A) 1 mg/mL Act d 1 i (B) 0,1 µg/mL LPS-a tokom 24 h, sa ili bez pretretmana vaniloidima (25 µM), nakon čega je iz ćelijskih lizata analizirana enzimsko aktivnost katalaze. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): # p vrednost < 0.05, u poređenju sa kontrolom.

Pored aktivnosti katalaze, određivana je koncentracija ukupnog redukovano glutationa (GSH), kao još jedan pokazatelj oksidativnog stresa. I Act d 1 i LPS izazvali su umereno smanjenje koncentracije GSH, dok su vaniloidi blago povećali njegovu koncentraciju (Slika 57), međutim ove promene nisu pokazale statističku značajnost, moguće zbog ograničene osetljivosti korišćenog testa.



Slika 57. Sadržaj GSH u THP-1 makrofagima. Čelije su stimulirane sa (A) 1 mg/mL Act d 1 i (B) 0,1 μg/mL LPS-a tokom 24 h, sa ili bez pretretmana vaniloidima (5 i 25 μM), nakon čega je određivana koncentracija GSH. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): p vrednost za sva poređenja je > 0.05, bez statističke značajnosti, u poređenju sa kontrolom.

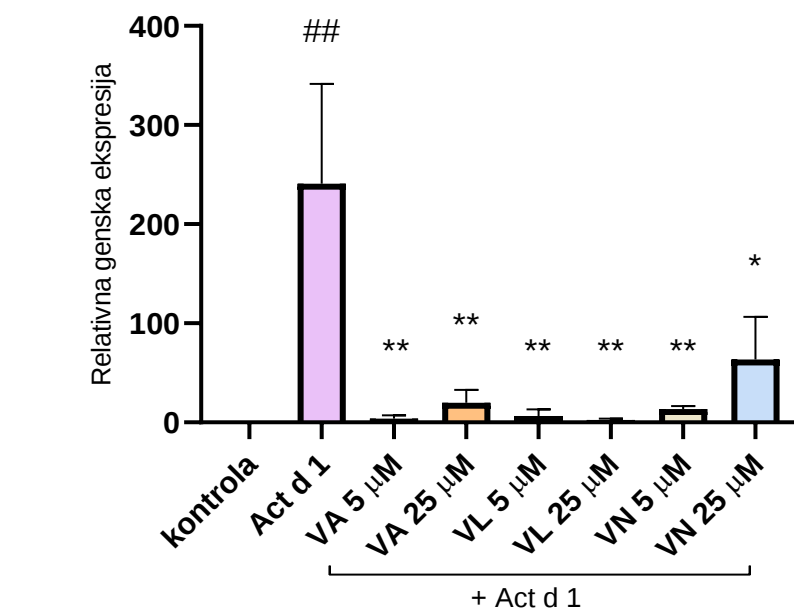
Promena količine unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. Reactive oxygen species, ROS) je analizirana spektrofotometrijskom detekcijom koristeći DCFH-DA probu. Nakon stimulacije sa Act d 1 i LPS, zabeležena je povećana fluorescencija, potvrđujući prooksidativni efekat ovih molekula (Slika 58). U oba slučaja pretretman ćelija sa višom koncentracijom VN (25 μM) doveo je do smanjenja unutarćelijskih ROS ispod nivoa kontrolnih netretiranih ćelija (Slika 58). U ćelijama koje su stimulirane sa Act d 1 nakon pretretmana sa VL i VN u obe koncentracije, uočeno je značajno smanjenje proizvodnje ROS u odnosu na ćelije tretirane ovim alergenom (Slika 58).



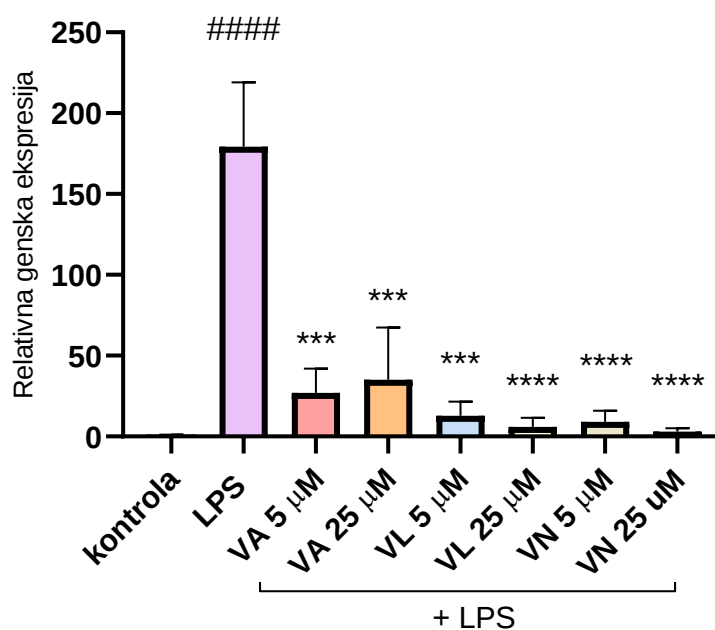
Slika 58. Količina unutarćelijskih ROS u THP-1 makrofagima. Čelije su stimulirane sa (A) 1 mg/mL Act d 1 i (B) 0,1 μ g/mL LPS-a tokom 24 h, sa ili bez pretretmana vaniloidima (5 i 25 μ M) i analizirani spektrofotometrijom nakon dodavanja DCFH-DA (50 μ M). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): */# p vrednost < 0.05, ** p vrednost < 0.01, * u poređenju sa Act d 1/LPS, # u poređenju sa kontrolom netretiranih ćelija (isprekidana linija na grafiku).

4.10.2 Uticaj malih molekula na metabolizam NO

Relativna ekspresija gena za inducibilnu azot (II) oksid sintazu (*iNOS*) je analizirana nakon izolovanja ukupne RNK iz tretiranih THP-1 ćelija. Stimulacija sa Act d 1 i LPS dovela je do značajnog povećanja ekspresije *iNOS*, naglašavajući njihovu prooksidativnu ulogu (Slika 59). Pretretman sa svim testiranim vaniloidima u obe koncentracije izazvao je smanjenje ekspresije *iNOS*, ukazujući na njihov modulatorni potencijal i antioksidativne efekte (Slika 59).



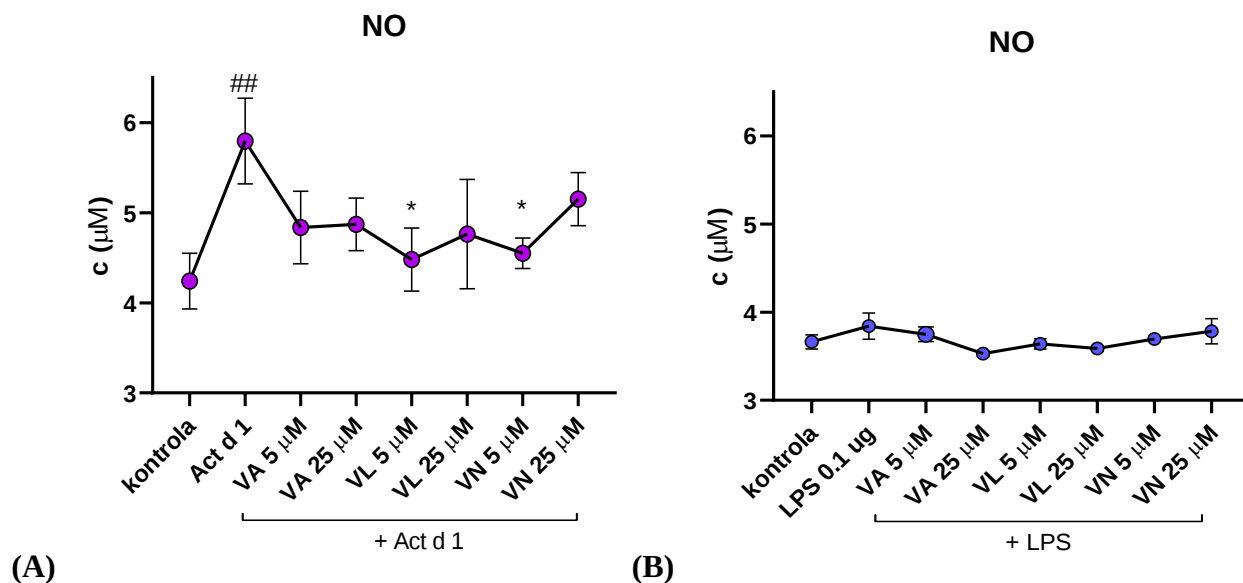
(A)



(B)

Slika 59. Ekspresija gena za *iNOS*. THP-1 makrofagi su stimulisani sa (A) 1 mg/mL Act d 1 i (B) 0,1 µg/mL LPS-a tokom 24 h, sa ili bez pretretmana vaniloidima (5 i 25 µM). Ekspresija gena za *iNOS* je normalizovana u odnosu na ekspresiju konstitutivnog gena *GAPDH* i prikazana je kao relativna ekspresija u odnosu na kontrolnu grupu netretiranih ćelija. Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, **/## p vrednost < 0.01, *** p vrednost < 0.001, i #####/**** p vrednost < 0.0001, * u poređenju sa Act d 1/LPS, # u poređenju sa kontrolom.

Nakon tretmana THP-1 makrofaga, supernatanti tretiranih ćelija su korišćeni za analizu koncentracije NO metabolita. Nakon tretmana Act d 1, primećen je značajan porast koncentracije NO u odnosu na netretirane ćelije (Slika 60). Iako su svi testirani vaniloidi snizili koncentraciju NO nakon tretmana Act d 1, samo su VL i VN (5 μ M) doveli do statistički značajnog smanjenja (Slika 60). LPS (0,1 μ g/mL) nije izazvao statistički značajno povećanje nivoa NO (Slika 60), moguće zbog niske koncentracije ili osetljivosti metode korišćene za kvantifikaciju NO.



Slika 60. Proizvodnja NO u THP-1 makrofagima nakon stimulacije Act d 1 i LPS-om sa ili bez tretmana malim molekulima. Ćelije su stimulirane sa (A) 1 mg/mL Act d 1 i (B) 0,1 μ g/mL LPS-a tokom 24 h, sa ili bez pretretmana vaniloidima (5 i 25 μ M). Prikazani rezultati predstavljaju prosečne vrednosti $\pm$ SEM. Statistička značajnost (one-way ANOVA): * p vrednost < 0.05, ## p vrednost < 0.01, * u poređenju sa Act d 1/LPS, # u poređenju sa kontrolom.

5 Diskusija

Proces inflamacije je esencijalan mehanizam za preživljavanje čija je glavna uloga da ukloni patogen i/ili oštećenje izazvano patogenima, hemijskim ili mehaničkim stresom, kao i da alarmira i aktivira adaptivni imunski sistem. Međutim, u procesu inflamacije, prekomerna proizvodnja proinflamatornih citokina, hemokina i reaktivnih kiseoničnih vrsta, može izazvati ozbiljnu štetu i doprineti patogenezi i razvoju raznih bolesti. Iz ovog razloga, su antiinflamatorni molekuli čest predmet novijih istraživanja, kao potencijalni terapijski agensi za prevenciju i tretman štete izazvane inflamatornim procesima. Nuklearni faktor κ B (NF- κ B) je ključni medijator zapaljenskih procesa i regulator funkcije urođene ali i adaptivne imunosti. Neosporivi dokazi ukazuju na važnu ulogu ovog transkripcionog faktora u patogenezi autoimunskih oboljenja, alergija i raznih hroničnih zapaljenja, koje često karakteriše prekomerna aktivacija NF- κ B i urođenog imunskog sistema. Alergijski odgovori predstavljaju imunske reakcije izazvane inače bezopasnim spoljašnjim antigenima, poznatim kao alergeni[99,100]. Mnogi alergeni poseduju specifična svojstva i karakteristike, poput proteolitičke aktivnosti. Proteolitička aktivnost je svojstvo koje doprinosi sposobnosti alergena da direktno podstiču inflamaciju aktivacijom specifičnih signalnih puteva i ima važnu ulogu u razvoju alergijskih bolesti i inflamacije[6,54].

U ovoj doktorskoj disertaciji, karakterisan je molekulski mehanizam kojim alergen Act d 1 iz zelenog ploda kivija izaziva proinflamatorni efekat i aktivaciju NF- κ B signalnog puta. Prethodna istraživanja su pokazala aktivaciju NF- κ B od strane pojedinačnih alergena, između ostalog i aktivaciju ovog signalnog puta u epitelnim ćelijama od strane Act d 1[75]. Njegov proinflamatorni efekat posredovan aktivacijom NF- κ B pokazan je *in vitro* u ćelijskim kulturama, i *in vivo* u mišjim modelima[75]. Međutim, dosadašnja istraživanja su bila pretežno fokusirana na efekat ovog alergena na epitelnim ćelijama gastrointestinalnog trakta, dok njegov efekat na ćelije imunskog sistema nije definisan. U ovom istraživanju, pokazano je da cistein proteaza Act d 1 izaziva snažan proinflamatorni odgovor u imortalizovanim mišjim makrofagima (iBMDMs) koji se odlikuje koncentraciono-zavisnom proizvodnjom ključnih proinflamatornih citokina TNF i IL-6, bez ispoljavanja citotoksičnih efekata. Ovaj odgovor je, bar delimično, posredovan aktivacijom NF- κ B, što je potvrđeno u RAW-Blue™ makrofagima pod istim uslovima. Dobijeni rezultati zajedno sa rezultatima prethodnih istraživanja na epitelnim ćelijama[71,75,77], karakterišu Act d 1 kao snažan aktivator urođenog imunskog sistema, sposoban da izazove inflamatorni odgovor, naročito pri koncentraciji od 1 mg/mL.

Aktivacija NF- κ B zajedno sa uočenom proizvodnjom IL-6 i TNF može ukazivati na aktivaciju ćelija posredovanu TLR4 [30]. TLR4 je dobro poznat i karakterisan receptor koji učestvuje u prepoznavanju PAMPs, kao što je LPS, i ima centralnu ulogu u inicijaciji inflamatornih odgovora[101]. Kako bi se analizirala uloga ovog receptora u inicijaciji Act d 1-izazvane inflamacije, u ovom radu su korišćena dva različita model sistema, TLR4 deficijentne (-/-) primarne mBMDMs i HEK293 ćelije stabilno transfektovane plazmidom koji kodira TLR4 i pridružene kostimulatorne molekule CD14 i MD2. Aktivacija NF- κ B u HEK293 ćelijama, kao i IL-6 u primarnim mBMDMs potpuno su izostali u odsustvu funkcionalnog TLR4, što dokazuje potpunu zavisnost njihove ekspresije/aktivnosti od prisustva ovog TLR4. Proizvodnja TNF je, međutim, bila samo delimično smanjena, sugerišući na to da bi dodatni TLR4-nezavisni mehanizmi mogli biti uključeni u kontrolu ekspresije ovog citokina. Pokazano je da u adipocitima, više transkripcionih faktora, uključujući NF- κ B i p38 MAP kinazu, reguliše ekspresiju TNF citokina. Takođe, pokazano je da je PI3 kinaza uključena u početne korake proizvodnje TNF nakon stimulacije LPS-om [102]. Pored aktivacije NF- κ B promotera, Act d 1 je pokazao i sposobnost aktivacije i IFN β promotera na koncentraciono-zavisnan način, čime se potvrđuje njegova sposobnost da aktivira oba TLR4-posredovana signalna puta[31].

LPS se vezuje za hidrofobni džep TLR4[40]. Specifične mutacije unutar TLR4 povezane su sa smanjenjem sposobnosti vezivanja LPS, a posledično i sa smanjenjem ili potpunom odsutnošću odgovora na LPS[103]. TLR4 mutanti poput F440A i F463A imaju smanjenu sposobnost vezivanja LPS-a, usled čega izostaje ili se značajno smanjuje imunski odgovor[104]. Mutant F463A zadržava sposobnost odgovora na Act d 1, dok to nije slučaj sa F440A gde izostaje Act d 1-izazvana NF- κ B aktivacija. Činjenica da Act d 1 može da pokrene signalizaciju preko TLR4 F463A mutanta, ukazuje na fundamentalnu razliku između LPS i Act d 1 u mehanizmu aktivacije TLR4 – aktivacija koja se možda ne zasniva samo na klasičnoj interakciji ligand-receptor, već uključuje i proteolitičku modifikaciju samog receptora.

Proteolitička aktivnost enzima, uključujući, ali ne ograničavajući se na alergene, odavno je istaknuta kao jedno od svojstava koja određuju sposobnost proteina da izazove imunski odgovor[6,54]. Proteolitička aktivnost Der p 1 je detaljno proučavana, i potvrđen je značajni doprinos njegove proteazne aktivnosti proalergenim svojstvima[55,105,106]. U slučaju cistein proteaza iz hrane, papain je pokazao sposobnost da aktivira proalergene mehanizme i izazove povećanje proizvodnje IL-33, IL-25 i TSLP[60,107,108]. Slično tome proteolitička aktivnost Act d 1 istaknuta je u kontekstu narušavanja epitelne barijere i degradacije proteina čvrstih veza[75,78,79]. Upravo degradacija čvrstih veza i povećana propustljivost epitela omogućavaju ovim alergenima da prodru u dublje slojeve mukozne, gde se nalaze ćelije imunskog sistema kao što su rezidentni makrofagi, dendritske ćelije i limfociti[54]. Međutim, nedostatak literaturnih podataka koji detaljnije opisuju prirodu interakcije proteaznih alergena, pre svega Act d 1, sa ovim tipovima ćelija, postaje posebno očigledan prilikom razmatranja fizioloških posledica njihovog kontakta i odgovora imunskog sistema. Karakterizacija inflamatornog odgovora ćelija urođenog sistema kao što su makrofagi na Act d 1, od suštinskog je značaja za razumevanje posledica proteolitičke aktivnosti, nivoa aktivacije imunskog sistema i formiranja zapaljenske reakcije.

Kako bi se ispitala uloga proteolitičke aktivnosti Act d 1 u izazivanju imunskog odgovora, korišćen je inhibitor cistein proteaza E64 u različitim koncentracijama, kao i termički inaktiviran Act d 1. Oba tretmana proteina dovela su do značajnog smanjenja NF- κ B aktivnosti u HEK293 ćelijama koje ekprimiraju TLR4, što podržava hipotezu da je enzimska funkcija Act d 1 neophodna za pokretanje TLR4-posredovane signalizacije. Važno je naglasiti da je E64 specifično inhibirao aktivaciju TLR4 sa Act d 1, dok nije imao uticaj na LPS-izazvanu aktivaciju. U THP-1 makrofagima je Act d 1 inhibiran u prisustvu E64, izazvao nižu proizvodnju citokina IL-6 i IL-1 β , kao i smanjenu ekspresiju enzima katalaze. Ovi rezultati, zajedno sa pokazanom sposobnošću Act d 1 da aktivira TLR4 F463A mutant, sugerišu da alergen možda dovodi, direktno ili indirektno, do proteolize specifičnih delova TLR4 ektodomena čime se podstiče spontana dimerizacija receptora i aktivacija signalizacije preko NF- κ B i IFN β promotera. Ovo je dodatno potvrđeno rezultatima koji pokazuju da tretman Act d 1 smanjuje nivo detektovanog c-Myc-tagovanog TLR4, osim kada je njegova proteazna aktivnost inhibirana prisustvom E64 inhibitora. Takođe, Act d 1 nije uspeo da dodatno poveća NF- κ B aktivaciju kod skraćenog TLR4 konstrukta (TLR4 Δ 1-563) kome nedostaje značajan deo ektodomena[109].

Zaključno, rezultati dobijeni u ovom delu pružaju snažne dokaze da cistein proteaza Act d 1 izaziva izražen proinflamatorni odgovor posredstvom TLR4-zavisnih mehanizama koji dovode do snažne NF- κ B aktivacije. Ovaj odgovor je usko povezan sa proteolitičkom aktivnošću Act d 1, koja aktivira TLR4 ne putem klasičnog vezivanja liganda, već proteolizom njegovog ektodomena. Nakon detaljne karakterizacije molekulskog mehanizma dejstva Act d 1, ovaj molekul je okarakterisan kao snažan proinflamatorni stimulus, koji se može koristiti za procenu NF- κ B-posredovane inflamacije u raznim ćelijskim model sistemima, pre svega u ćelijama urođenog imunskog sistema, makrofagima i epitelnim ćelijama.

Kao ćelije urođenog imunskog sistema, makrofagi imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva, kao i procesu zapaljenja. Regulacija diferencijacije makrofaga tokom imunskog odgovora, interakcija sa različitim ćelijama imunskog sistema i uklanjanje apoptotskih ćelija od strane makrofaga, su samo neke od jedinstvenih funkcija makrofaga raspoređenih u organizmu[110,111]. Kao rezultat svih promena koje mogu da detektuju, dolazi do aktivacije različitih inflamatornih signalnih puteva, koji indukuju ekspresiju i lučenje proinflamatornih citokina, kao i povećane ekspresije specifičnih receptora, spremnih da dodatno pojačaju imunski odgovor[111,112]. Zbog ovih esencijalnih uloga u imunološkom odgovoru, oni se naširoko koriste u istraživanjima inflamacije i imunomodulacije. Međutim, dobijanje primarnih humanih makrofaga iz krvi donora nosi određene izazove, kao što su varijabilnost funkcionalnih karakteristika i ograničena dostupnost ćelija[91,95]. Ćelijske linije poput THP-1 se široko koriste kako bi se prevazišla ova ograničenja, jer nude ključne prednosti kao što su genetska uniformnost i neograničen broj ćelija[91]. Uprkos širokoj upotrebi, još uvek ne postoji konsenzus o standardnom protokolu diferencijacije THP-1 monocita u makrofage pomoću PMA.

U okviru ove doktorske disertacije, optimizovan je postupak diferencijacije THP-1 ćelija, procenjujući efekte dužine izlaganja PMA i vremena odmora na morfologiju ćelija, kao i karakterizacija dobijenih diferenciranih makrofaga i njihov odgovor na stimuluse. Testirano je ukupno 9 različitih uslova diferencijacije, kombinujući različita vremena trajanja tretmana PMA (24, 48 ili 72 h) sa različitim dužinama odmora u medijumu bez PMA (24, 48 ili 72 h). Dobijeni rezultati ukazuju na kritičan značaj perioda odmora nakon izlaganja PMA kako bi se postigla potpuna morfološka diferencijacija. Zanimljivo, ćelije koje su odmarale samo 24 h nisu pokazale značajno povećanje površine ćelija, što ukazuje na nepotpunu diferencijaciju. Suprotno tome, produženi periodi odmora, posebno od 72 h, doveli su do značajnog povećanja površine ćelije i nukleusa u odnosu na monocite, u skladu sa očekivanom morfologijom makrofaga. Iako su se površine ćelija i nukleusa proporcionalno povećavale u svim grupama, ćelije izložene PMA tokom 72 h i odmora tokom istog perioda pokazale su smanjenje odnosa veličine nukleusa i ćelija. Kako je veličina nukleusa u euariotskim ćelijama najčešće u korelaciji sa veličinom ćelije[113], ova promena može ukazivati na ćelijski stres usled produženog vremena kulture i neoptimalne uslove diferencijacije. Dodatno, kroz sve analizirane grupe je ukupni unutarćelijski nivo redukovanog glutaciona ostao statistički nepromenjen, iako je primećen trend povećanja nivoa GSH sa produženim vremenom odmora u medijumu bez PMA, dodatno naglašavajući značaj perioda odmora u uspostavljanju stabilne kulture diferenciranih makrofaga. Stabilnost nivoa GSH posebno je važna u makrofagima, gde je glutation okarakterisan kao regulator ravnoteže između M1 i M2 fenotipa, kao i u T ćelijama, gde može uticati na dominaciju Th1 ili Th2 odgovora[114,115]. Povratak na stabilan nivo GSH u netretiranim naivnim makrofagima je od posebnog značaja, kako bi se osiguralo da polarizacija ne nastaje spontano već kao odgovor na primenjene stimuluse[115].

Na osnovu dobijenih rezultata, odabrani su optimalni uslovi diferencijacije THP-1 monocita u makrofage – inkubacija sa 100 ng/mL PMA tokom 48 h, praćena sa 72 h odmora u medijumu bez PMA. Pod ovim uslovima dobijeni makrofagi pokazuju očekivano povećanje u površini i promene u morfologiji, uravnotežen odnos površina nukelusa i ćelije i stabilne nivoa GSH. Ovako uspostavljena kultura makrofaga, razvija očekivani proinflamatorni odgovor na klasične stimuluse kao što je LPS, u malim količinama korišćenim za tretmane (100 ng/mL), kao i na alergen iz hrane Act d 1. Već nakon 3 h je primećen odgovor dobijenih makrofaga na pomenute stimuluse, gde se jasno beleži povećanje genske ekspresije proinflamatornih citokina (*IL-1 β* , *TNF*, *IL-25*). Promena u ekspresiji površinskih markera CD86 i CD54 je takođe zabeležena, gde se povećanje ekspresije CD54 uočava u preko 80% populacije makrofaga, potvrđujući visoku efikasnost procesa diferencijacije. Ovi rezultati jasno pokazuju plastičnost makrofaga izvedenih iz THP-1 i njihovu sposobnost da se dodatno polarizuju kao odgovor na različite stimuluse. Sposobnost promene fenotipa i ekspresije citokina pod dejstvom

stimulusa su osobine pouzadnih model sistema za ispitivanje imunomodulatornih efekata raznih molekula[91].

Nakon karakterizacije molekulskog mehanizma kojim Act d 1 aktivira NF- κ B signalni put i izaziva proinflamatorni odgovor preko aktivacije TLR4, Act d 1 je korišćen zajedno sa LPS-om, kao stimulus na THP-1 makrofagima i epitelnim ćelijama. Koristeći ova dva stimulusa, uspostavljen je *in vitro* model sistema inflamacije, kako bi se na ćelijskom nivou procenio imunomodulatorni, inhibitorni i antioksidativni efekat odabranih bioaktivnih malih molekula. U inicijalnim eksperimentima korišćena su dva molekula, vanilil alkohol (VA) i laurinska kiselina (LA). U testiranim koncentracijama VA i LA nisu imali citotoksični efekat na HEK293 i Caco-2 epitelne ćelije i THP-1 makrofage. Nijedan od ova dva molekula u dve testirane koncentracije nije pokazao proinflamatorni efekat u vidu povećanja ekspresije citokina *IL-1 β* , *TNF* i *IL-25*. Šta više, VA i LA su doveli do smanjenja genske ekspresije ova tri citokina nakon njihove uzvodne regulacije od strane LPS-a u THP-1 makrofagima. Supresija LPS-om izazvane inflamacije primećena je i u Caco-2 ćelijama gde je LA imala izraženiji efekat u smanjenju genske ekspresije citokina. Nasuprot tome, za razliku od VA, LA nije dovela do smanjenja genske ekspresije *IL-1 β* i *TNF* u Act d 1 stimuliranim makrofagima ni *IL-1 β* u Caco-2 ćelijama. U Act d 1-tretiranim HEK293 ćelijama je LA smanjila gensku ekspresiju svih analiziranih citokina, za razliku od VA koja je uticala na ekspresiju samo *TNF*. Odsustvo odgovora ovih ćelija na LPS se može objasniti veoma niskom bazalnom ekspresijom TLR4 [116]. Osim efekta na gensku ekspresiju citokina, potvrđen je i inhibitorni efekat dva molekula VA i LA na NF- κ B aktivaciju u HEK293 ćelijama i smanjenje ukupne ekspresije p65 komponente u THP-1 makrofagima. Međutim, posmatrajući samo količinu aktivirane p65 subjednice, VA je pokazala bolji inhibitorni efekat od LA na aktivaciju p65 i njenu translokaciju u nukleus. Ova zapažanja su u skladu sa prethodno primećenim efektom na nivoe ekspresije citokina, koji nisu nizvodno regulisani od strane LA u THP-1 makrofagima. Ovi rezultati se mogu objasniti prethodnim istraživanjima koji pokazuju da neki alergeni hrane mogu vezivati male molekule kao što su masne kiseline, čime povećavaju stabilnost i izazivaju promene u konformaciji koje utiču na proces senzitivacije i prepoznavanja alergena od strane ćelijskih receptora[117].

Nakon dobijanja obećavajućih rezultata, dalja, detaljnija procena imunomodulatornih sposobnosti malih bioaktivnih molekula je proširena sa fokusom na vaniloide. Pored vanilil alkohola, korišćen je i vanilin (VN) kao i estari vanilil alkohola i laurinske kiseline, vanilil-laurat (VL), na model sistemu THP-1 diferenciranih makrofaga. Vaniloidi su kompleksna klasa jedinjenja, izvedena iz molekula vanilil alkohola, i potencijalno su značajne bioaktivne supstance. Veća zastupljenost vaniloida je pokazana u različitim medicinskim biljkama i izvorima hrane, uključujući *Gastrodia elata*, *Phalenopsis*, *Vanilla planifolia*, *Capsicum anuum*[118–120]. Jedan od predloženih antiinflamatornih mehanizama je da se vaniloidi i njihovi derivati vezuju za TRPV1 receptor koji se različito eksprimira na raznim tipovima ćelija[121]. Razlika u nivou ekspresije ovog receptora na makrofagima i epitelne ćelije bi mogao biti jedan od razloga zašto primećujemo različit imunomodulatorni potencijal ovih malih molekula u različitim ćelijskim linijama[121,122].

Polarizacija makrofaga u procesu inflamacije je veoma složen proces na koji utiče mnoštvo faktora koji dovode do različitih fenotipskih ishoda[95]. M1 makrofage karakteriše aktivacija transkripcionih faktora kao što je NF- κ B, uz povećanu proizvodnju ROS, oksidativnih enzima i NO, kao i proizvodnja proinflamatornih citokina (*IL-1 β* , *IL-6*, *IFN γ*)[123,124]. Nasuprot tome, M2 makrofagi dovode do povećanja proizvodnje citokina *IL-4*, *IL-10* i *IL-13*[125,126]. Iako su molekulski mehanizmi stimulusa korišćenih u ovoj disertaciji različiti, oni, preko TLR4, dovode do aktivacije NF- κ B signalnog puta i do polarizacije makrofaga ka M1 fenotipu. Ovo je potvrđeno i praćenjem površinske ekspresije CD80 na THP-1 makrofagima nakon tretmana sa Act d 1 ili LPS, gde se ista povećala u preko 40 % ćelijske

populacije nakon tretmana sa Act d 1. Ostali analizirani markeri, uključujući obeležja M2 polarizacije (CD206 i CD163) [112] i CD86, nisu pokazali značajnu promenu ekspresije, ukazujući na ograničen i specifičan obrazac aktivacije makrofaga od strane Act d 1 i LPS. Testirani vaniloidi, VL i pre svega VN, su doveli do blagog smanjenja ekspresije CD80. Međutim, iako smanjena, zastupljenost CD80⁺ ćelija nije pala na nivo zabeležen u netretiranoj kulturi naivnih makrofaga, što ukazuje da iako vaniloidi imaju određeni efekat u ublažavanju inflamatornog odgovora, njihova sposobnost da u potpunosti preokrenu ili spreče Act d 1 i LPS-indukovanu polarizaciju je ograničena. Isključena je i mogućnost da ovi mali molekuli jednostavno inhibiraju alergen Act d 1 i time ublažavaju proinflamatorni efekat. U enzimskom testu čak ni znatno povećane količine ovih molekula nisu dovele do promene enzimske aktivnosti Act d 1, potvrđujući da posmatrani efekti nisu posledica direktne inhibicije ove proteaze, već imunomodulatornih svojstava malih molekula.

Promenu u ekspresiji površinskih markera u procesima polarizacije makrofaga prati i aktivacija specifičnih signalnih puteva. M1 fenotip obeležava upravo aktivacija NF- κ B transkripcionog faktora [92,112]. Aktivacija ovog transkripcionog faktora vodi otključavanju gena za proinflamatorne citokine i pojačava njihovo lučenje od strane ćelija imunskog sistema [5]. Korišćenjem luciferaznog reporter testa, aktivacija NF- κ B u THP-1 makrofagima je potvrđena nakon tretmana sa Act d 1 i LPS, a VN je uspešno inhibirao NF- κ B aktivaciju u makrofagima stimulisanim Act d 1. U grupi tretiranoj LPS-om, iako je primećen sličan silazni trend aktivacije, promene nisu pokazale statističku značajnost. Ova promena bi mogla biti pripisana razlikama u jačini imunskog odgovora koji izazivaju Act d 1 i LPS u THP-1 makrofagima. Ovo se najbolje može primetiti u razlikama u proizvodnji IL-6, gde je Act d 1 izazvao više od 7 puta nižu proizvodnju ovog citokina u poređenju sa LPS-om. Svi testirani vaniloidi su doveli do značajnog smanjenja proizvodnje IL-6 nakon tretmana sa Act d 1, dok su na LPS-izazvanu proizvodnju ovog citokina uticale samo više koncentracije VL i VN, sugerišući na razliku u imunomodulatornom potencijalu u zavisnosti od prirode proinflamatornog stimulusa. VN je pokazao najbolji efekat na proizvodnju citokina smanjujući i IL-1 β u THP-1 makrofagima.

Pomerao ka M1 proinflamatornom fenotipu, koji je prethodno primećen, često se povezuje sa povišenim oksidativnim stresom [112]. Kako bi se procenilo oksidativno stanje makrofaga, analizirani su različiti markeri oksidativnog stresa uključujući aktivnost katalaze, količina ROS, GSH i NO, kao i genska ekspresija *iNOS*. Uočeno je značajno povećanje proizvodnje ROS i NO, i aktivnosti katalaze, kao i smanjenje GSH, nakon tretmana Act d 1. Nakon tretmana LPS-om u THP-1 makrofagima primećena je povećana proizvodnja ROS i aktivnost katalaze. Pretretman sa VL i VN je doveo do značajnog smanjenja NO i ROS do bazalnog nivoa. Katalaza kao jedan od ključnih enzima, može biti pojačano eksprimirana kao odgovor na povećane nivoe ROS, što je i potvrđeno dobijenim rezultatima. Dodatno potvrđujući povećanje oksidativnog stresa i polarizaciju makrofaga ka M1 fenotipu, zabeleženo je povećanje genske ekspresije *iNOS*. Ovaj marker se povezuje sa proinflamatornim fenotipom makrofaga i ključnim oksidativnim medijatorom NO. Svi testirani vaniloidi su doveli do drastičnog smanjenja ekspresije *iNOS*, u manjim i višim koncentracijama, naglašavajući njihov imunomodulatorni potencijal i supresiju polarizacije makrofaga ka M1 fenotipu.

Iako efikasni u ublažavanju oksidativnog stresa, vaniloidi nisu podjednako uticali na sve analizirane parametre, ukazujući da se ovi molekuli razlikuju u svojoj efikasnosti u zavisnosti od oksidativnog markera koji je analiziran ili od osetljivosti korišćene metode. Ova primećena varijabilnost može odražavati i suptilne promene u parametrima čije vrednosti su ispod praga detekcije pojedinih metoda. Tako su pri detekciji količine GSH, iako su zapažena povećanja nakon tretmana malim molekulima, ove promene ostale statistički neznačajne. Povišene koncentracije GSH u kulturama antigen-prezentujućih ćelija se dovode u vezu sa smanjenom aktivnošću NF- κ B i neutralizacijom ROS [127]. Međutim, s

obzirom da u ovom radu nije analiziran odnos redukovano i oksidovanog glutationa, postoje ograničenja u tumačenju promene nivoa isključivo GSH. Zajedno, ovi rezultati pokazuju da bioaktivni mali molekuli kao što su vaniloidi, mogu da utiču na smanjenje oksidativnog stresa izazvanog proinformativnim stimulusima.

Molekulski mehanizmi aktivacije NF- κ B od strane Act d 1 i LPS-a dele pojedine sličnosti, pre svega aktivaciju TLR4. Međutim priroda aktivacije TLR4 sa Act d 1 i LPS se krucijalno razlikuje, kako je i pokazano u ovom radu. Ovaj alternativni mehanizam aktivacije NF- κ B proteolizom TLR4 doprinosi razumevanju načina na koji proteazni alergeni mogu angažovati receptore urođenog imuniteta i započeti inflamaciju. Ova razlika se prenosi i na različit efekat odabranih malih molekula u inhibiciji proinformativnog odgovora, gde se jasno uočava razlika u njihovoj sposobnosti da utiču na pojedine parametre inflamacije posredovane aktivacijom NF- κ B signalnog puta. THP-1 makrofagi kao model sistem antigen-prikazujućih ćelija i ćelija urođenog imunskog sistema, su se pokazale kao adekvatan model koji karakteriše homogena genetička osnova, i neograničena dostupnost, što mu daje prednost nad kulturama primarnih makrofaga koje karakteriše varijabilnost zavisna od donora i ograničena dostupnost. Bioaktivni mali molekuli koji su predmet ispitivanja ove disertacije su pokazali imunomodulatorni i antioksidativni kapacitet, pre svega značajan u kontekstu ublažavanja alergijskih i inflamatornih procesa posredovanih NF- κ B aktivacijom. Nastavak istraživanja u ovoj oblasti bi trebalo da dodatno razjasni ulogu specifičnih receptora i da pruži dodatni mehanistički uvid u imunomodulatorne efekte ovih molekula. Validacija u relevantnim životinjskim modelima i u model sistemima različitih tipova imunskih ćelija bi omogućile potpunu procenu fizioloških efekata i translacionog potencijala uočenih efekata. Potraga za efikasnim malim molekulima koji su uspešni inhibitori NF- κ B i dalje traje, ali istraživanja ovog tipa pružaju čvrstu osnovu za detaljnije ispitivanje drugih postojećih malih molekula kao i sintezu novih derivata koji bi se uspešno mogli koristiti kao terapeutske agensi.

6 Zaključak

Tokom izrade ove doktorske disertacije ispitivan je molekulski mehanizam aktivacije NF- κ B signalnog puta od strane cistein proteaze i glavnog alergena kivijsa Act d 1 koji se ostvaruje preko aktivacije TLR4, u poređenju sa aktivacijom posredovanom LPS-om. Pored toga, identifikovani su odabrani mali molekuli i karakterisan je njihov imunomodulatorni i antioksidativni efekat u ćelijama urođenog imunskog sistema u cilju potencijalne primene kao terapijski agensi u patološkim stanjima koje karakteriše prekomerna aktivacija NF- κ B.

Zaključci iz ove doktorske disertacije su sledeći:

- 1) Karakterizacija molekulskog mehanizma aktivacije NF- κ B aktinidinom (Act d 1):
 - Act d 1 izaziva koncentraciono-zavisnu aktivaciju NF- κ B i proizvodnju proinflamatornih citokina (IL-6, TNF, IL-8).
 - Proinflamatorni odgovor na Act d 1 je zavisen od prisustva TLR4, i dovodi do aktivacije oba TLR4-zavisna promotera, NF- κ B i IFN β .
 - Act d 1 zadržava sposobnost aktivacije TLR4 F463A mutanta, za razliku od LPS-a, ukazujući na fundamentalnu razliku u mehanizmu aktivacije.
 - Proteolitička aktivnost Act d 1 je neophodna za aktivaciju NF- κ B preko TLR4, kao i za izazivanje proinflamatornog odgovora na ovaj alergen.
 - Act d 1 aktivira TLR4 ne putem klasičnog vezivanja ligand-receptor, već proteolizom njegovog ektodomena.
- 2) Razvijanje optimalnog model sistema makrofaga iz THP-1 monocita:
 - Optimalni postupak diferencijacije THP-1 monocita u makrofage obuhvata inkubaciju sa 100 ng/mL PMA tokom 48 h, nakon čega sledi vreme odmora u medijumu bez PMA tokom 72 h.
 - Dobijeni makrofagi poseduju očekivane morfološke karakteristike, zadržavaju stabilne nivoe GSH nakon diferencijacije i ekspresiraju specifične površinske receptore.
 - THP-1 makrofagi imaju sposobnost da menjaju ekspresiju površinskih markera i citokina kao odgovor na različite stimuluse.
- 3) Procena imunomodulatornih efekata odabranih malih molekula:
 - Vanilil alkohol i laurinska kiselina pokazuju selektivni inhibitorni efekat na gensku ekspresiju citokina (*IL-1 β* , *IL-25* i *TNF*) u THP-1 makrofagima i HEK293 i Caco-2 epitelnim ćelijama.
 - Aktivacija NF- κ B u HEK293 ćelijama, kao i ekspresija i translokacija p65 komponente u THP-1 makrofagima je smanjena pod uticajem vanilil alkohola i laurinske kiseline.
 - Vanilin ublažava efekat polarizacije ka M1 fenotipu posredovan Act d 1 u THP-1 makrofagima smanjujući površinsku ekspresiju CD80 i NF- κ B aktivaciju.
 - Pretretman THP-1 makrofaga svim testiranim vaniloidima praćen je smanjenjem proizvodnje proinflamatornog citokina IL-6 nakon tretmana Act d 1, dok je proizvodnju IL-1 β najbolje inhibirao pretretman vanilinom.

- Vanilil alkohol i vanilin inhibiraju proizvodnju NO i ROS u THP-1 makrofagima.
- Najveći antioksidativni efekat pokazuje vanilin, utičući na značajno smanjenje svih analiziranih parametara oksidativnog stresa.
- Razliku u molekulskim mehanizmima aktivacije NF- κ B od strane Act d 1 i LPS, prati i razlika u imunomodulatornom efektu malih molekula na ublažavanje posledica inflamacije koju indukuju.

Iz navednih zaključaka se može uočiti da iako Act d 1 i LPS dele mehanizam aktivacije NF- κ B preko TLR4, priroda i način ove aktivacije značajno se razlikuje. To utiče i na efekte malih molekula u modulaciji inflamacije. THP-1 makrofagi su se pokazali kao pouzdan model za ispitivanje imunomodulatornih efekata malih molekula. Ispitivani mali molekuli pokazali su imunomodulatorni i antioksidativni kapacitet, naročito u ublažavanju inflamacije posredovane NF- κ B signalnim putem.

Iako je neophodna i potvrda ovih efekata u životinjskim modelima *in vivo*, ovi molekuli pružaju potencijalno terapijsko rešenje za patološka stanja u čijem je mehanizmu nastanka prekomerna aktivacija NF- κ B transkripcionog faktora. Otkrivanje svojstava novih molekula takođe omogućava i bolje razumevanje terapijskih agenasa i pruža mogućnost za sintezu efikasnijih derivata već okarakterisanih inhibitora.

7 Materijal i metode

7.1 Metode izolovanja i prečišćavanja Act d 1

7.1.1 Priprema ekstrakta iz ploda kivija

Zeleni kivi (*Actinidia deliciosa*) je upotrebljen kao polazni materijal za izolovanje Act d 1. Kako bi se ekstrahovao protein, korišćen je natrijum citratni pufer koncentracije 100 mM pH 5,0. Nakon što je kivi oljušten, homogenizovan je u blenderu uz dodatak ekstrakcionog pufera (odnos 1/2, wt/vol) tokom 1,5 minuta, a zatim je pH suspenzije korigovan do 5,0 i uzorak je inkubiran na 4 °C 2 h, uz mešanje. Nakon toga je centrifugiran tokom 30 minuta na 3000×g. Zatim je prebačen u crevo za dijalizu i dijalizovan naspram ekstrakcionog pufera, uz jednu izmenu pufera preko noći. pH vrednost ekstrakta je podešena na pH 5,0.

7.1.2 Prečišćavanje na SP-Sephadex C-50

Dobijeni ekstrakt kivija iz prethodnog odeljka je nanošen na SP-Sephadex matriksu (40-120 µm, GE Healthcare). Matriks je pripremljen u 100 mM natrijum-citratnom puferu pH 5 nakon čega je napakovan u kolonu. Ekvilibracija je rađena propuštanjem 4 zapremine pufera. Nakon ekvilibracije, ekstrakt je nanet na kolonu. Nevezani proteini su ispirani puferom pri protoku od 1,5 mL/min. U ovoj frakciji se nalazi delimično prečišćen Act d 1, koji je dalje dijalizovan naspram 20 mM Tris-HCl pufera, pH 8,0 tokom dva dana.

7.1.3 Prečišćavanje na QAE-Sephadex A-50

Nevezane frakcije dobijene u prethodnom odeljku nakon dijalize su nanete na prethodno pripremljen QAE-Sephadex matriks (40-120 µm, GE Healthcare). Ekvilibracija matriksa je rađena propuštanjem 4 zapremine radnog pufera 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. U sledećem koraku je ovim puferom eluirana nevezana frakcija, nakon čega su vezani proteini eluirani gradijentom soli. Za eluciju je korišćen NaCl (0,1 M - 0,5 M), pri brzini protoka od 1,5 mL/min. Frakcije koje su sadržale željeni protein Act d 1 su spojene i dijalizovane naspram 20 mM NH_4HCO_3 pufera pH 8 tokom dva dana. Uzorku je određena i koncentracija, nakon čega je liofilizovan i čuvan na -20°C.

7.2 Metode određivanja koncentracije

7.2.1 Bicinhonska metoda određivanja koncentracije proteina

Bicinhoninska (BCA) metoda je kolorimetrijska tehnika za kvantifikaciju proteina zasnovana na redukciji Cu^{2+} u Cu^+ jon, koji sa bicinhoninskom kiselinom formira ljubičasti kompleks ($\lambda = 562 \text{ nm}$). Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina. Postupak određivanja koncentracije je rađen po protokolu kita Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Radni rastvor je pripremljen mešanjem Reagens A (BCA reagens) i reagens B (rastvor bakar-sulfata) u zapreminskom odnosu 50:1. Kalibraciona prava je konstruisana na osnovu apsorbanaci dobijenih pomoću standarda. Standardni rastvori su pravljeni na način opisan u Tabeli 5.

Tabela 5. Šema za pripremu standardnih rastvora BSA radnog opsega 20-2000 µg/mL.

Standard	V rastvarača (µL)	V (BSA) (µL)	Finalna koncentracija BSA (µg/mL)
A	0	300 štoka	2000
B	125	375 štoka	1500
C	325	325 štoka	1000
D	175	175 rastvora B	750
E	325	325 rastvora C	500
F	325	325 rastvora E	250
G	325	325 rastvora F	125
H	400	100 rastvora G	25
I	400	0	0 = blank

Test je rađen u pločicama sa 96 bunara, a apsorbance očitavana ELISA čitačem BioTek Synergy LX Multimode Reade (Agilent). Uzorak i radni rastvor su dodavani u zapreminskom odnosu 1:8. U svaki bunarić je dodavano 200 µL radnog rastvora i 25 µL uzorka nepoznate koncentracije ili standarda. Smeša je inkubirana na 37 °C tokom 30 minuta, nakon čega je izmerena apsorbance na 562 nm.

7.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana merenjem apsorbance na 280 nm. Za merenje apsorbance je korišćen spektrofotometar (Lab Logistics Group GmbH). Nakon merenja apsorbance ona je korišćena da bi se izračunala koncentracija proteina pomoću Lambert-Beerovog zakona: $A_{280} = a \times b \times c$ (a-ekstencioni koeficijent za analizirani protein, b-pređeni put (1 cm), c-koncentracija, mg/mL).

7.2.3 Određivanje koncentracije endotoksina

Prisustvo endotoksina u uzorcima Act d 1 je kvantifikovano pomoću komercijalnog kita za kvantifikaciju (Limulus amebocyte lysate-(LAL) chromogenic endotoxin quantification kit, Thermo Fisher Scientific), po uputstvima proizvođača. Pre dodavanja uzorka, mikrotitar ploča je ekvilibrisana na 37°C, nakon čega su dodati uzorci i standardni rastvori endotoksina poznate koncentracije u zapremini od 50 µL. Sledeći je dodat reagens za liziranje u zapremini od 50 µL nakon čega je započeto merenje vremena. Nakon naznačenog vremena dodat je hromogeni supstrat, takođe prethodno inkubiran na 37°C u zapremini od 100 µL. Smeša je inkubirana tokom 6 minuta na 37°C, nakon čega je dodato 50 µL reagensa za stopiranje reakcije. Apsorbance je zatim očitana na 405 nm na ELISA čitaču BioTek Synergy LX Multimode Reade (Agilent).

7.3 Elektroforetske metode

7.3.1 Natrijum dodecilsulfat polikarilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

Elektroforetsko razdvajanje uzoraka je sprovedeno na BioRad aparaturi po uputstvima proizvođača. Korišćeni su molekulski markeri poznatih masa (14-116 kDa, Thermo Fisher Scientific). Analize su rađene na 12% gelu za razdvajanje i 4% gelu za koncentrovanje, čiji je detaljan sastav prikazan u Tabeli 6. Rastvor gela za razdvajanje je nalivan između staklenih ploča razdvojenim 1 mm, i nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije je naliven je i gel za koncentrovanje u kom su uronjeni češljevi za formiranje bunarića. Nakon polimerizacije, gel je spakovan u sistem i naliven puferom za izvođenje elektroforeze (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS). Uzorci su pripremljeni u 5× koncentrovanom puferu za uzorke (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,1% brom fenol plavo, 25% β-merkaptetanol) i inkubirani 5 minuta na 95°C. Uzorci proteina su naneti

na gel i elektroforetski sistem je priključen na napajanje, i to prvo pri konstantnom naponu od 80 V, dok uzorci ne stignu do gela za razdvajanje, nakon čega je napon povećan na 150 V do završetka elektroforeze. Zatim je gel prebačen u odgovarajuću posudu, bojen 5 minuta u rastvoru boje (0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) a zatim obezbojavan u rastvoru 7% sirćetne kiseline.

Tabela 6. Gelovi za SDS PAGE

Komponenta	12% gel za razdvajanje (mL)	4% gel za koncentrovanje (mL)
30% rastvor akrilamida	4	0,5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2,5	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	0,94
Dejonizovana voda	3,33	2,25
10% SDS	0,1	0,038
TEMED	0,004	0,002
10% APS	0,075	0,028

7.3.2 Agarozna elektroforeza

Sva elektroforetska razdvajanja su rađena na PeqLab PerfectBlue Mini L sistemu prema uputstvima proizvođača. Agarozna niske elektroendoosmoze (1%) je resuspendovana u TAE puferu (Tris, glacijalna sirćetna kiselina, EDTA, pH 8,0) i potom zagrevana dok se agarozna nije rastopila. Rastopljena agarozna je pomešana sa bojom za vizuelizaciju DNK, Simply Safe EuroX (20000x), nakon hlađenja do 55°C i razlivena u sistem za agaroznu elektroforezu. Nakon očvršćavanja agarozni gel je preliven TAE puferom. Uzorci su pre nanošenja na gel pomešani su sa 6× Orange Loading Dye (5:1, v:v). Elektroforeza je izvođena na 100 V u trajanju od 30 min. Nakon završetka elektroforeze, gel je analiziran na UV Sistemu za dokumentaciju gelova.

7.4 Određivanje enzimske aktivnosti Act d 1

7.4.1 Aktivacija Act d 1

Prečišćeni i liofilizovani Act d 1 je za potrebe izvođenja enzimskih testova aktiviran u 20 mM kalijum fosfatnom puferu, pH 6,5 koji sadrži 52 mM L-cistein i 2 mM EDTA. Act d 1 i aktivacioni pufer su pomešani u odnosu 1:1 (v/v) i tako inkubirani 1 h na 37 °C.

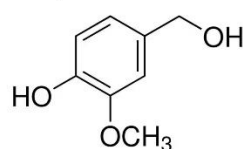
7.4.2 Kazeinolitički test

Proteolitička aktivnost prečišćenog Act d 1 bez i u prisustvu korišćenih malih molekula je određivana enzimskim testom sa kazeinom (Sigma-Aldrich). Za izvođenje testa je pripremljena reakciona smesa opisana u Tabeli 7.

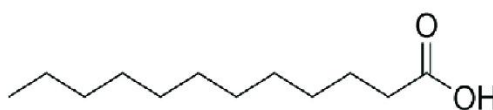
Tabela 7. Priprema reakcione smeše za kazeinolitički test.

Rastvori	Zampremina (μL)
2 % rastvor kazeina u 0,1 M kalijum fosfatnom puferu pH 7,6	400
250 mM L-cisteina	40
1 M KH ₂ PO ₄ pH 7,0	120
250 mM EDTA	40
250 mM NaOH	40
dH ₂ O	80

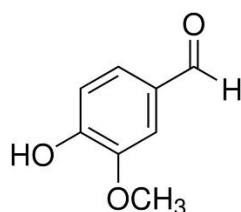
Reakciona smeša je ekvilibrisana na 37 °C, nakon čega je dodato 80 μL uzorka i smeša je inkubirana 1 h na 37 °C. Enzimska reakcija je prekinuta dodatkom 1,2 mL 5 % trihlorsirćetne kiseline (TCA) i smeša je inkubirana još 1 h na 37 °C. Uzorci su centrifugirani na 13000×g, 15 min i izmerena je A₂₈₀ supernatanta, naspram slepe probe. Slepa proba je pripremljena dodatkom kazeina uz TCA, nakon čega je naknadno dodat ispitivani rastvor enzima. Jedna jedinica proteolitičke aktivnosti (U) je računata kao količina enzima koja daje 0,1 jedinicu A₂₈₀ po minuti, nakon čega je promena enzimske aktivnosti u prisustvu malih molekula izražena u procentima početne enzimske aktivnosti aktiviranog Act d 1. Struktura i pun naziv svih malih molekula koji su korišćeni u ovom radu su prikazane na slici 61.



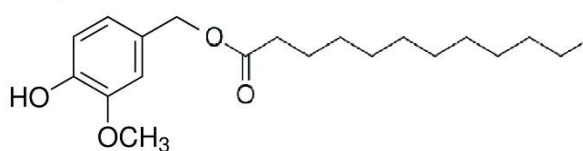
vanilil alkohol (VA)



laurinska kiselina (LA)



vanilin (VN)



vanilil-laurat (VL)

Slika 61. Strukture i nazivi malih molekula.

7.5 Imunohemijske metode

7.5.1 Detekcija proteina u imunoblotu

Za potrebe transfera proteina, ćelije su direktno lizirane u puferu za uzorke (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,1% brom fenol plavo, 25% β-merkaptoetanol) i resuspendovani do stabilne suspenzije, nakon čega su inkubirani na 95°C 5 minuta i razdvajani na SDS-PAGE (gel za koncentrovanje 4%, gel za razdvajanje 12%). Uzorci korišćeni za detekciju p65 su dobijeni postupkom

koji je opisan u poglavlju 7.13.3 i takođe razdvajani na SDS-PAGE (gel za koncentrovanje 4%, gel za razdvajanje 12%).

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su transferovani na nitroceluloznu membranu pod dejstvom električne struje (2 mA/cm^2) u sendviču od 2 Whatman-ova papira dimenzija gela u Towbinovom puferu za transfer proteina (Tabela 8). Nitroceluloza je postavljena prema pozitivnoj elektrodi i elektrotransfer je izvođen 60 minuta. Provera uspešnosti transfera je rađena bojenjem sa 1% rastvorom Ponceau S u 7% sirćetnoj kiselini, čime se vizuelizuju proteini na membrani.

Tabela 8. Towbin-ov pufer za transfer proteina

Komponenta	Količina
Tris	2,9 g
Glicin	1,45 g
SDS	0,185 g
Metanol	100 mL
Dejonizovana voda	Do 500 mL

Za potrebe detekcije proteina na membrani, korišćeni su navedeni rastvori: TBS (Trisom puferisani fiziološki rastvor pH 7,6, Tabela 9), tTBS (0.02% Tween 20 u TBS-u), 1% BSA u tTBS-u, Clarity™ Western ECL supstrat (BioRad) ili SuperSignal West Pico hemiluminiscentni supstrat (Thermo Scientific) za peroksidazu iz rena po uputstvima proizvođača.

Tabela 9. Trisom puferisani fiziološki rastvor (TBS) pH 7,6.

Komponenta	Količina
Tris	3,63 g
NaCl	9 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

Nakon transfera je membrana blokirana tokom 1 h, rastvorom 1% BSA u tTBS-u na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Potom je isprana 3 puta po 5 minuta rastvorom tTBS-a, na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje. Inkubacija sa primarnim antitelima je rađena prema uputstvima proizvođača, i to, 2 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje sa antitelima na beta aktin (BioLegend, 664801, 1:1000) i p65 (BioLegend, 622602, 1:1000), ili preko noći uz blago mešanje sa antitelima na c-Myc tag (Cell Signaling Technology 9B11, 2276, 1:1000). Nakon inkubacije, i ispiranja na isti način kao u prethodnom koraku, dodata su sekundarna antitela i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Sekundarna antitela koja su korišćena su konjugovana sa peroksidazom (HRP) i korišćena prema uputstvu proizvođača, anti-zečija antitela konjugovana peroksidazom za detekciju beta aktina i p65 (Jackson ImmunoResearch, 111-035-003, 1:3000) i anti-mišja antitela konjugovana peroksidazom za detekciju c-Myc taga (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003, 1:3000). Pre dodatka supstrata, membrana je isprana na prethodno opisani način, a detekcija proteina na membrani je postignuta dodatkom hemiluminiscentnog supstrata za HRP, tokom 1 minuta.

7.5.2 Imunosorbentni test povezan sa enzimom (ELISA)

Koncentracija citokina iz ćelijskih supernatanta nakon odgovarajućih tretmana su određivane odgovarajućim ELISA testom. Citokini koji su analizirani su: humani IL-1 β , IL-6 i IL-8 i mišji IL-6 i TNF. Za humani IL-1 β i IL-6 je korišćen ELISA kit proizvođača R&D Systems, dok su za detekciju ostalih citokina korišćeni ELISA kitovi proizvođača Invitrogen. Odgovarajuća antitela su kuplovana za miktrotitar pločicu od 96 bunara preko noći u rastvoru za kuplovanje po uputstvu proizvođača, na 4°C. Između svih koraka pločica je ispirana 3 puta rastvorom PBS-a kom je dodat Tween-20 u finalnoj koncentraciji 0.05%. Blokiranje je rađeno tokom 1 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, po uputstvima proizvođača, za humane IL-1 β i IL-6 sa 1% rastvorom BSA u PBS-u, dok je za ostale citokine korišćen ELISpot rastvor dobijen u ELISA kitu. Nakon ispiranja, dodati su i uzorci i standardni rastvori citokina poznate koncentracije, i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon ponovnog ispiranja, dodata su odgovarajuća antitela za detekciju i inkubirana 2 h za detekciju humanih IL-1 β i IL-6 ili 1 h za detekciju ostalih citokina, na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Rastvor streptavidin-HRP je dodat nakon ispiranja i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Potom je pločica isprana poslednji put i dodat je TMB supstrat za HRP, po uputstvima proizvođača, i inkubiran 15 minuta u mraku. Nakon dodatka stop reagensa (2N H₂SO₄), apsorbanca je očitana na 450 i 570 nm. Koncentracija analiziranih citokina je određena na osnovu konstruisane standardne prave.

Tabela 10. Pufferisani fiziološki rastvor (PBS)

Komponenta	Količina
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,16 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

7.6 Kultura ćelijskih linija

7.6.1 HEK-293 ćelijska linija

HEK-293 (eng. Human Embryonic Kidney cells 293) je ćelijska linija poreklom od epitelnih ćelija humanog embrionalnog bubrega. Ćelije su kupljene od ATCC-a (Američka kolekcija tipova ćelija-eng. American Type Cell Culture). Gajene su na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u DMEM hranljivoj podlozi (Gibco, Invitrogen) kojoj je dodato 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen) i 1% Pen/Strep (Penicilin 10000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (Gibco, Invitrogen).

7.6.2 Caco-2 ćelijska linija

Caco-2 je ćelijska linija humanog epitelnog kolorektalnog adenocarcinoma koja se koristi kao model sistem intestinalne epitelne barijere. Ćelije su kupljene od ATCC-a. Ćelije su gajene na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u EMEM hranljivoj podlozi koja sadrži 1 g/L glukoze (Gibco, Invitrogen) i kojoj je dodato 20% FBS, 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen) i 1% Pen/Strep (Penicilin 10000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (Gibco, Invitrogen).

7.6.3 THP-1 ćelijska linija

THP-1 monociti su ćelije humane akutne leukemije koje se gaje u suspenziji i mogu se diferencirati *in vitro* u THP-1 makrofage ili THP-1 dendritske ćelije. Kupljene su od ATTC-a. Ćelije su gajene na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u RPMI-1640 hranljivoj podlozi (Gibco, Invitrogen) kojoj je dodato 10% FBS, 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen) i 1% Pen/Strep (Penicilin 10000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (Gibco, Invitrogen).

7.6.4 Reporterska ćelijska linija RAW-Blue™

Reporterska ćelijska linija RAW-Blue™ je adherentna ćelijska linija koja koristi mišje RAW 264.7 makrofage za analizu aktivacije NF-κB signalnog puta. Ćelije su kupljene od Invivogen-a. Gajene su na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u DMEM hranljivoj podlozi (Gibco, Invitrogen) kojoj je dodato 10% FBS i 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen).

7.6.5 Mišji iBMDMs

Imortalizovani mišji makrofagi su izvedeni diferencijacijom ćelija koštane srži miša C57BL/6J (eng. Immortalized Bone Marrow-Derived Macrophages, iBMDMs) i ljubazno su dobijene od K. A. Fitzgerald-a, Medicinska škola Univerziteta u Masačusetsu, Vorčester, MA, USA [128], i korišćene za rad na Nacionalnom Institutu za hemiju u Ljubljani, Slovenija. Gajene su na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u DMEM hranljivoj podlozi (Gibco, Invitrogen) kojoj je dodato 10% FBS i 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen).

7.6.6 Primarne mišje BMDMs

Primarne mišje BMDMs dobijene su u laboratoriji za *in vivo* eksperimente na Nacionalnom Institutu za hemiju u Ljubljani, odobreno od strane Uprave Republike Slovenije za bezbednost hrane, veterinarstvo i zaštitu biljaka (dozvole br. U34401-27/2013/13 i U34401-27/2013/19) kao ustanova za uzgoj i izvođenje eksperimenata na laboratorijskim miševima. Prikupljanje tkiva za izolovanje koštane srži obavljeno je u skladu sa dozvolom za rad sa životinjskim tkivima i ćelijama (U34401-11/2023/3). Primarni BMDM makrofagi iz miševa soja C57BL/6J OlaHSd i B6.129-TLR4^{tm1Aki} (TLR4-KO) su dobijeni i pripremljeni kao što je ranije opisano [129], i korišćene su za rad na Nacionalnom Institutu za hemiju u Ljubljani, Slovenija. Gajene su na 37°C u atmosferi 5% CO₂ u DMEM hranljivoj podlozi (Gibco, Invitrogen) kojoj je dodato 10% FBS i 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen).

7.6.7 Održavanje ćelijske kulture

Rad sa ćelijskim kulturama i priprema svih reagenasa i ćelijskog medijuma su izvođeni u aseptičnim uslovima, u laminaru. FBS je dodavan u medijume pri svakodnevnom održavanju ćelijske kulture jer je važan za rast ćelija i neutralizaciju toksina, tripsina i drugih proteolitičkih enzima. Antibiotici nisu neophodni ali su korišćeni kako bi se izbegle moguće kontaminacije ćelijske kulture.

Ćelijskim kulturama je dnevno proveravana morfologija, boja medijuma i gustina ćelija u monosloju ili suspenziji, kako bi se pratio tok rasta. Ćelijama je menjan medijum na svakih 3 do 4 dana, odnosno onog trenutka kada pH indikator u medijumu promeni boju iz crvene u narandžasto-žutu. U zavisnosti od prirode ćelija i njihovog načina rasta, tj da li su u pitanju adherentne ili suspenzijske ćelijske kulture, medijum je menjan odgovarajućim načinom. Kod suspenzijskih ćelijskih linija, zamena medijuma je postignuta prvo centrifugiranjem na 300 ×g 5 minuta, odbacivanjem starog medijuma i dodavanje svežeg medijuma. Suspenzijske ćelije su održavane u gustini između 0.1 i 1 × 10⁶ ćelija/mL. Adherentne ćelije su održavane do dostizanja konfluencije od 80-90% nakon čega su pasažirane. Kako bi se to postiglo, ćelije su nakon uklanjanja medijuma odgovarajuće tretirane tripsinom ili u slučaju

pasažiranja mišjih makrofaga dodatkom hladnog rastvora PBS-EDTA, centrifugirane na $300 \times g$ 5 minuta i potom resuspendovane u odgovarajućoj količini svežeg medijuma. Koncentracija ćelija je određivana brojanjem ćelija u hemocitometru nakon odgovarajućeg razblaživanja rastvorom PBS-a i dodatka boje Trypane blue (0.05% rastvor, 1:1, v/v).

7.7 Diferencijacija THP-1 monocita u makrofage

Diferencijacija THP-1 monocita u THP-1 makrofage je rađena u prisustvu PMA (forbol-12 miristat-13-acetat). Koncentracija PMA koja je korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji je 100 ng/mL, a gustina THP-1 monocita 1×10^6 ćelija/mL. PMA je pripremljen rastvaranjem u DMSO-u u koncentraciji 1 mg/mL.

7.7.1 Optimizacija protokola diferencijacije

Kako bi se optimizovao protokol diferencijacije THP-1 monocita u prisustvu PMA u koncentraciji 100 ng/mL, varirano je vreme diferencijacije u prisustvu PMA i vreme odmora („resting“ vreme) u kompletnom medijumu bez PMA. Korišćene su kombinacije vremenskih intervala od 24, 48 i 72 h za oba vremena inkubacije, prikazana u Tabeli 11. Nakon svih navedenih uslova diferencijacije, morfologija i veličina dobijenih makrofaga i njihovih nukleusa je analizirana fluorescentnom mikroskopijom postupkom opisanim u odeljku 7.8.

Tabela 11. Optimizacija uslova diferencijacije THP-1 monocita u makrofage.

Uslov	Diferencijacija u prisustvu 100 ng/mL PMA	Vreme odmora u kompletnom medijumu bez PMA
1	24	24
2	24	48
3	24	72
4	48	24
5	48	48
6	48	72
7	72	24
8	72	48
9	72	72

7.7.2 Opšti protokol diferencijacije

Optimizacijom je dobijen opšti protokol diferencijacije, korišćen za dalje eksperimente na THP-1 makrofagima u ovom radu. Ćelije su zasejavane u koncentraciji 1×10^6 ćelija/mL u medijumu sa 100 ng/mL PMA i inkubirani tokom 48 h, a zatim ispirane 3 puta sterilnim rastvorom PBS-a. Potom je ćelijama dodat kompletan medijum bez PMA, i inkubirane su 72 h na 37 °C u atmosferi 5% CO₂ kako bi se dovršila njihova diferencijacija. Po isteku ovog vremena, medijum je uklonjen i ćelije su spremne za tretman odgovarajućim proteinima i/ili malim molekulima.

7.8 Mikroskopija ćelijskih preparata

Morfologija THP-1 ćelija tokom optimizacije diferencijacije je analizirana mikroskopijom. Ćelije su, u tu svrhu, uzgajane na staklenim pločicama (u pločama sa 24 bunara) za gajenje ćelija. Nakon diferencijacije uklonjen je medijum, dodat je rastvor 3,7% formaldehida u PBS-u i inkubirano je 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja rastvora formaldehida ćelije su isprane sa 0,5 mL PBS-a. Ovako fiksiranim ćelijama je dodat je rastvor za bojenje nukleusa DAPI (ThermoFisher) i staklene pločice su prebačene na predmetna stakalca i analizirane na fluorescentnom mikroskopu OptoEdu A16.2701 sa odgovarajućim emisionim filterima i objektivima uveličanja 10 i 40 ×. Slike su dobijene i analizirane upotrebom Image View softvera.

7.9 Određivanje ekspresije površinskih markera FACS-om

Ekspresija površinskih markera na THP-1 monocitima i diferenciranim makrofagima određeni su FACS-om. Nakon odgovarajućih tretmana, ćelije su odvojene od površine pločice za gajenje korišćenjem rastvor akutaze, nakon čega su inkubirane sa odgovarajućim rastvorima antitela (5 µL komercijalnog antitela na milion ćelija) u trajanju od 20 minuta na 4°C, po uputstvima proizvođača. Korišćena su antitela na humani CD54-FITC, CD80-PE, CD86-FITC, CD163-FITC i CD206-PE (Biolegend). Ćelije su analizirane protočnom citometrijom korišćenjem FACS Calibur uređaja (BD Biosciences) opremljenog plavim laserom snage 200 mW (488 nm talasna dužina za ekscitaciju) i odgovarajućim filterima za detekciju. Sirovi podaci analizirani su pomoću softvera BD CellQuestPro, verzija 5.1 (BD Biosciences).

7.10 Metode provere citotoksičnosti i vijabilnosti

7.10.1 CCK-8 test vijabilnosti

Za procenu vijabilnosti THP-1 makrofaga, HEK293 i Caco-2 ćelijskih linija nakon odgovarajućih tretmana, korišćen je Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), po uputstvima proizvođača. Nakon odgovarajućih tretmana, u svaki bunarić dodato je 10 µL CCK-8 reagensa i inkubirano je 4 h na 37 °C. Apsorbanca je merena na 450 nm, a netretirane ćelije korišćene su kako bi se izrazilo 100% vijabilnosti.

7.10.2 LDH test citotoksičnosti

Oslobađanje LDH u ćelijskim supernatantima je mereno korišćenjem CyQuant LDH testa citotoksičnosti (Invitrogen), u skladu sa uputstvima proizvođača. Netretirane ćelije korišćene su kao negativna kontrola, dok su supernatanti ćelija tretiranih puferom za lizu korišćeni kao pozitivna kontrola (100% sadržaj LDH). Procenat oslobađanja LDH izračunat je na osnovu obe kontrole, nakon merenja apsorbance na 490 nm.

7.10.3 Preuzimanje propidijum-jodida (PI)

Nivo preuzimanja propidijum-jodida korišćen je za procenu propustljivosti ćelijske membrane u primarnim mišjim BMDM makrofagima. Ćelije su inkubirane sa razblaženim PI rastvorom (3,3 µg/mL, Thermo Scientific) tokom 30 minuta, nakon čega je očitana fluorescencija na talasnim dužinama ekscitacije od 530 nm i emisije od 617 nm. Netretirane ćelije korišćene su kao negativna kontrola, dok su supernatanti ćelija tretiranih puferom za lizu korišćeni kao pozitivna kontrola (100% preuzimanje PI), za izračunavanje procenta preuzimanja.

7.11 Određivanje genske ekspresije citokina

7.11.1 Izolovanje ukupne RNK

Kako bi se izolovala ukupna RNK iz ćelija korišćen je TRI reagens (Sigma-Aldrich). Na $5 \cdot 10^6$ ćelija je korišćeno 1 mL ovog reagensa. Nakon njegovog dodatka u bunare sa ćelijama uzorci su dalje tretirani po opisanom protokolu. Čelije su pažljivim pipetiranjem sakupljene iz bunara u tubice nakon čega su inkubirane 5 minuta na ST. Zatim je dodat hloroform (u 4 puta manjoj zapremini od dodatog TRI reagensa), uzorci su kratko promešani i inkubirani 10 minuta na ST. Potom su tubice centrifugirane na $12000 \times g$ 15 minuta na $4^\circ C$. U ovom koraku se postiže razdvajanje faza. Dobijaju se: crvena organska faza sa proteinima, međufaza sa DNK i bezbojna vodena faza sa RNK. Kako bi se postigla precipitacija RNK, vodena faza je odvojena i dodat je izopropanol (u 2 puta manjoj zapremini od dodatog TRI reagensa). Uzorci su inkubirani na ST 10 minuta a potom centrifugirani na $12000 \times g$ 10 minuta na $4^\circ C$. Dobijeni talog RNK je ispran dodatkom 75% etanola (u istoj zapremini u kojoj je dodat i TRI reagens). Nakon centrifugiranja na $7500 \times g$ 5 minuta na $4^\circ C$, talog RNK je sušen tokom 15 minuta na vazduhu i rastvoren u 50 μL miliQ vode. Koncentracija i čistoća ovako dobijene RNK su određivani na NanoDrop uređaju merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm. Izolovana RNK je čuvana na $-80^\circ C$.

7.11.2 PCR kome prethodi reverzna transkripcija

Izolovana RNK je prevođena u cDNK koja je dalje korišćena u postupku lančane reakcije polimeraze. Smeša je pripremana po postupku koji je naznačen u protokolu kita RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Sinteza cDNK je reakcijom reverzne transkripcije izvedena inkubacijom na $25^\circ C$ 5 minuta, nakon čega sledi elongacija na $42^\circ C$ tokom 1 h, i zaustavljanje reakcije na $70^\circ C$ 5 minuta. Koncentracija cDNK u uzorcima se određuje na isti način kao i koncentracija RNK pomoću NanoDrop uređaja.

Lančana reakcija polimeraze je izvedena korišćenjem 10 pmol specifičnih prajmera (Invitrogen) za ciljane gene, korišćenjem 600 ng cDNK templata i PCR Master Mix 2 $\times$ (Thermo Scientific). Korišćen PCR Master Mix 2 $\times$ ima sledeći sastav: 0,05 U/ μL Taq polimeraza, reakcioni pufer, 4 mM $MgCl_2$, 0,4 mM svakog dNTP-a. Negativna kontrola je pripremljena bez templata cDNK. PCR reakcija je rađena pod uslovima opisanim u Tabeli 12. Sekvence prajmera preuzete su iz GenBank baze podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information) i prikazane su sa odgovarajućim T_m vrednostima u Tabeli 13.

Tabela 12. Parametri za izvođenje PCR reakcije.

Korak	Temperatura ($^\circ C$)	Vreme (minuti)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	95	1	35
Aniling	T_m	1	
Elongacija	72	0,5	
Finalna elongacija	72	7	1

Tabela 13. Prajmeri korišćeni za PCR.

Ciljani gen	GenBank broj	Sekvenca (5'-3')	Tm (°C)
<i>GAPDH</i>	NM_009386.2	For: CGAGGCATCATCCCAAATAAGAAC Rev: TCCAGAAGTCTGCCCGATCAC	65
<i>IL-1β</i>	NM_000576.2	For: AACCTCTTCGAGGCACAAGG Rev: GGCGAGCTCAGGTACTTCTG	49
<i>IL-25</i>	NM_022789.3	For: CCAGGTGGTTGCATTCTTGG Rev: TGGCTGTAGGTGTGGGTTC	49
<i>TNF</i>	NM_000594.3	For: GACAAGCCTGTAGCCCATGT Rev: CTCTGATGGCACCACCAACT	49
<i>iNOS</i>	AF049656.1	Forward: ACCAGTACGTTTGGCAATGG Reverse: TCAGCATGAAGAGCGATTCT	49

7.11.3 Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)

Kvantitativni PCR izvođen je korišćenjem izolovane ukupne RNK (200 ng po reakcionoj smeši) i KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix kita (Merck), po uputstvima proizvođača. Odgovarajući uzvodni i nizvodni prajmeri (Invitrogen) su korišćeni u koncentraciji od 10 μ M, i preuzeti su iz GenBank baze podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sekvence prajmera sa odgovarajućim Tm vrednostima prikazane su u Tabeli 13. Parametri PCR ciklusa optimizovani su prema preporukama proizvođača i prikazani su u Tabeli 14. Relativna ekspresija gena izračunata je primenom $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ metode, normalizovana u odnosu na kontitutivno eksprimiran gen gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (*GAPDH*) i izražena je u odnosu na netretirane kontrolne grupe ćelija.

Tabela 14. Parametri za izvođenje qRT-PCR reakcije.

Korak	Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	42	5 min.	1
Inaktivacija RT	95	5 min.	1
Denaturacija	95	10 sek.	40
Aniling	Tm	20 sek.	
Elongacija	72	20 sek.	
Finalna elongacija	72	7 min.	1

7.12 Metode određivanja nivoa oksidativnog stresa

7.12.1 Određivanje proizvodnje azot (II) oksida

Količina azot (II) oksida (NO), kao indirektnog pokazatelja aktivnosti enzima inducibilne azot-oksida sintaze (*iNOS*), je analizirana u supernatantima ćelijskih kultura nakon odgovarajućih tretmana pomoću Griess-ovog reagensa. Reagens je prethodno pripremljen mešanjem jednakih zapremina 0,1 % rastvora naftiletildiamin-dihlorida i 1 % sulfanilamidom u 5 % H_3PO_4 i tako pomešan sa ćelijskim supernatantima u odnosu 1:1 (v/v). Nakon inkubacije na ST tokom 30 minuta, nitritni joni (NO_2^-), stabilni produkti metabolizma NO, koji u reakciji sa korišćenim reagenskom daju obojeno jedinjenje, su

detektovani merenjem apsorbance na 548 nm. Kvantifikacija je urađena pomoću standardne prave konstruisane pomoću rastvora NaNO_2 poznate koncentracije (opseg 1-10 μM).

7.12.2 Merenje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. Reactive Oxygen Species – ROS) odrađena je korišćenjem ćelijsko-permeabilne probe 2',7'-dihlorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA, Cayman Chemical). DCFH-DA se unutarćelijski deesterifikuje i oksiduje delovanjem ROS, čime nastaje fluorescentni molekul 2',7'-dihlorofluorescein. Nakon odgovarajućih tretmana THP-1 makrofaga, u ćelijski supernatant je dodat rastvor DCFH-DA do finalne koncentracije od 50 μM i inkubiran 30 minuta. Nivoi ROS su kvantifikovani spektrofotometrijski pri talasnim dužinama ekscitacije od 488 nm i emisije od 525 nm na čitaču BioTek Synergy LX Multimode Reager (Agilent).

7.12.3 Aktivnost enzima katalaze

Aktivnost enzima katalaze u ćelijskim lizatima nakon odgovarajućih tretmana je određivana kao pokazatelj nivoa oksidativnog stresa. Ćelijski lizati su pripremljeni liziranjem u 50 mM Tris puferu sa 0,25 M saharozom i 1 mM EDTA, pH 7,4. Nakon centrifugiranja na 12 000 $\times g$, dobijeni supernatanti su korišćeni za dalju analizu. Koncentracija proteina u uzorcima je određena BCA metodom koja je opisana u odeljku 7.2.1. Aktivnost katalaze je praćena nakon mešanja uzoraka sa 10 mM H_2O_2 u fosfatnom puferu pH 7, u odnosu 2:1 (v/v), i praćenjem promene apsorbance na 240 nm tokom 5 minuta na čitaču BioTek Synergy LX Multimode Reager (Agilent). Jedna jedinica aktivnosti katalaze definisana je kao smanjenje apsorbance za 0,1 po minutu pri 25°C i pH 7. Aktivnost enzima je izražena u jedinicama katalazne aktivnosti (U) po miligramu proteina u svakom analiziranom uzorku (U/mg).

7.12.4 Određivanje nivoa redukovano glutathiona (GSH)

Nivoi redukovano glutathiona kao pokazatelj oksidativnog stanja ćelija, određivani su u THP-1 ćelijama primenom Tietz-ove metode. Uzorci i standardi su mešani sa 3 mM NaHPO_4 puferom u odnosu 1:8 (v/v), nakon čega je dodata 1 zapremina 0.04% rastvora DTNB (5,5-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)) u 0,1% natrijum-citratu. Tako pripremljena smeša je inkubirana 10 minuta na ST, nakon čega je apsorbancija očitana na 412 nm na čitaču BioTek Synergy LX Multimode Reager (Agilent). Standardne rastvore za konstruisanje standardne krive (opseg 1-100 μM) pripremljeni su korišćenjem redukovano glutathiona (AppliChem GmbH).

7.13 Određivanje aktivacije NF- κ B signalnog puta

7.13.1 NF- κ B GFP reporter test

Ćelije su transfektovane plazmidom koji sadrži inducibilni NF- κ B promoter povezan sa ekspresijom zelenog fluorescentnog proteina (engl. Green Fluorescent Protein, GFP). Plazmid sa konstitutivnim promoterom i plazmid sa neaktivnim promoterom su korišćeni kao pozitivna, odnosno negativna kontrola transfekcije. Plazmidi su deo Signal NF- κ B Pathway Reporter Assay kita (Qiagen). Ukoliko se nakon transfekcije ćelije posmatraju pod mikroskopom, pre zasejavanja se postavljaju staklene pločice u svaki od bunara. Nakon što su ćelije dostigle konfluentnost stari medijum je zamenjen sa Opti-MEM medijumom (Thermo Fisher Scientific) sa 5% FBS-om i 1% NEAA (neesencijalne aminokiseline) i bez antibiotika. Odgovarajući plazmid je pomešan sa agensom za transfekciju (Attractene Transfection Reagent, Qiagen) u Opti-MEM-u i inkubiran na sobnoj temperaturi 20 minuta, po uputstvu proizvođača. Pripremljena smeša je dodavana u bunare sa ćelijama i inkubirana 19h na 37°C u atmosferi 6% CO_2 . Nakon 19 h, medijum je zamenjen sa Opti-MEM medijumom sa 0,5% FBS-om, 1% NEAA i 1% Pen/Strep (Penicilin 10000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL), i inkubiran dodatnih 5h. Ovako pripremljene ćelije su tretirane na odgovarajući način u trajanju od 24h, nakon čega je detekcija

ekspimiranog GFP proteina rađena protočnom citometrijom i fluorescentnom mikroskopijom, na način opisan u prethodnim poglavljima.

7.13.2 NF- κ B DNK vezujući test

Kako bi se detektovale komponente NF- κ B signalnog puta u nukleusu ćelije ekstrahovani su ukupni nuklearni proteini iz ćelija u kojima je analizirano prisustvo ovog transkripcionog faktora. Ćelije su gajene do konfluentnosti i tretirane na odgovarajući način tokom 24 h nakon čega je započeta ekstrakcija nuklearnih proteina. Ćelije u pojedinačnim bunarima su ispirane hladnim rastvorom PBS-a kome su dodati fosfatazni inhibitori (Phos Stop, Sigma Aldrich), a zatim sakupljane iz bunara. Sakupljene ćelije su centrifugirane u ohlađenim ependorfima na $300 \times g$ 5 minuta na $4^{\circ}C$, nakon čega je talog resuspendovan u hladnom hipotoničnom puferu nežnim pipetiranjem. Nakon inkubacije na ledu 15 minuta, dodat je rastvor 10% NP-40 (Nonidet P-40, Sigma Aldrich) do finalne koncentracije 0,5%. Nakon centrifugiranja na $14\ 000 \times g$ tokom 1 minuta, nuklearni pelet je zatim resuspendovan u odgovarajućem puferu po preporuci proizvođača. Nakon resuspendovanja rastvor je centrifugiran 10 minuta na $14\ 000 \times g$ na $4^{\circ}C$ i iz svakog ependorfa je sačuvan supernatant (nuklearni ekstrakt). Ovako pripremljenom nuklearnom ekstraktu je određena koncentracija bicinhoninskom metodom za određivanje koncentracije proteina opisanom u odeljku 7.2.1.

Tabela 15. Hipotonični (HB) pufer pH 7,5

Komponenta	Količina
20 mM HEPES pH 7,5	0,24 g
5 mM NaF	12 mg
10 μ M Na_2MoO_4	5 μ L 0,1 M rastvora
0,1 mM EDTA	10 μ L 0,5 M rastvora
mili Q voda do	Do 50 mL

ELISA test za određivanje aktivnosti NF- κ B transkripcionog faktora je korišćen da bi se detektovalo prisustvo specifične komponente p65 u nuklearnim ekstraktima, po uputstvima proizvođača (Abcam). Ukratko, nuklearni ekstrakti su inkubirani 1 h u pločici za koju je kuplovana dvolančana DNK sekvenca koja sadrži NF- κ B element odgovora. Razi nuklearni ekstrakt je korišćen kao pozitivna kontrola dok je radni pufer korišćen kao negativna kontrola. Nakon inkubacije i ispiranja, dodato je primarno anti-NF- κ B p65 antitelo i inkubirano još 1h na ST. Nakon ispiranja dodato je sekundarno antitelo obeleženo HRP i inkubirano 1h. Potom je dodat TMB supstrat i apsorbanca je merena na 450 nm pomoću mikrotitar čitača (BioTek Synergy LX Multimode Reader, Agilent) nakon dodatka rastvora za stopiranje reakcije.

7.13.3 Analiza ekspresije p65

Za analizu ukupne ekspresije proteina p65 u THP-1 ćelijama je korišćena metoda detekcije proteina u imunoblotu po postupku opisanom u odeljku 7.5.1. Za detekciju ekspresije p65 korišćeni su totalni ćelijski lizati. Nakon odgovarajućih tretmana ćelije su sakupljene i lizirane hladnim puferom za lizu (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40) sa dodatim inhibitorima proteaza i fosfataza (Roche). Ukupna koncentracija proteina pre imunoblota u uzorcima određena je pomoću BCA testa opisanom u odeljku 7.2.1.

7.13.4 NanoGlo luciferazni test

Reporter plazmid sa NF- κ B inducibilnim promoterom povezan sa NanoGlo® Luciferazom (Promega) je korišćen za transfekciju THP-1 makrofaga u prisustvu FuGENE® reagensa za transfekciju (Promega). Transfekcija je rađena u pločici od 96 bunara, gde je na 100 000 ćelija dodavano 50 ng plazmida u smeši sa reagensom za transfekciju u odnosu 4:1 (v/v) u OptiMEM-u. Nakon 24 h od transfekcije, medijum je zamenjen i ćelije su tretirane alergenom Act d 1 ili LPS-om sa ili bez pretretmana vaniloidima. Nakon 24h tretmana, aktivnost NanoGlo luciferaze je određivana dodatkom NanoGlo® supstrata u puferu za lizu (Promega). Nakon 10 minuta inkubacije na ST, relativne jedinice luminiscencije (RLU) su izmerene pomoću mikrotitar čitača (BioTek Synergy LX Multimode Reader, Agilent).

7.13.5 Dual-luciferazni reporter test

Radi praćenja aktivacije NF- κ B u prisustvu specifičnih receptora, korišćene su HEK293 ćelije koje su transfektovane plazmidima koje sadrže različite varijante humanog TLR4 (wild-type TLR4, TLR4 F440A, TLR4 F463A, TLR4 Δ 1–563) ili praznim plazmidom, zajedno sa plazmidom za ko-stimulacione molekule MD2 i CD14, plazmidom pELAM-F-luciferaza (NF- κ B-zavisna firefly luciferaza) i plazmidom phRL-TK R-luciferaza (Renilla luciferaza, konstitutivno eksprimirana). Transfekcija je rađena u prisustvu reagensa za transfekciju Lipofectamine 2000. Kako bi se pratila aktivnost IFN β promotera, ćelije su transfektovane plazmidom za IFN β -F-luciferazu pored prethodno navedenih plazmida, takođe uz Lipofectamine 2000. Transfekcija je rađena u Opti-MEM medijumu po uputstvima proizvođača 6h, nakon čega je medijum uklonjen, a ćelije su tretirane na odgovarajući način. Nakon tretmana, supernatanti su prikupljeni i korišćeni za analizu koncentracije citokina, dok su ćelije lizirane u puferu za lizu. Aktivnost luciferaza je analizirana koristeći system za dvojni aktivnost luciferaze na luminometru Mithras LB940, nakon dodatka koelenterazina i luciferina, supstrati za renilla i firefly luciferazu. Relativna luciferazna aktivnost je određena normalizacijom signala firefly luciferaze u odnosu na konstitutivnu aktivnost renilla luciferaze iz istog uzorka.

7.13.6 Reporterski test sa RAW-Blue™ makrofagima

RAW-Blue™ makrofagi su zasejavani u gustini od 0.9×10^6 ćelija/mL u pločicama od 96 bunara. Nakon 4 h, zasejane ćelije su tretirane na odgovarajući način. Tretman je prekinut nakon 24 h, i prikupljeni supernatanti su pomešani sa rastvorom QUANTI-Blue reagensa (Invivogen), pripremljen prema uputstvu proizvođača. Smeša je inkubirana 2 h na 37°C, nakon čega je izmerena apsorbanca na 620 nm pomoću mikrotitar čitača (BioTek Synergy LX Multimode Reader, Agilent).

7.14 Statistička obrada rezultata

Svi eksperimenti u ovoj doktorskoj disertaciji su urađeni u najmanje 3 nezavisna biološka ponavljanja u tehničkim duplikatima. Rezultati su prikazani grafički i predstavljeni su kao prosečna vrednost $\pm$ standardna greška devijacije (SEM) iz 3 nezavisna eksperimenta. Prikazivanje podataka i statistička analiza sprovedene su pomoću softvera GraphPad Prism, verzija 8.0.1, uz primenu standardnih konvencija za pragove statističke značajnosti i prikaz podataka. Kao prag značajnosti korišćena je p vrednost < 0.05 , uz interval pouzdanosti od 95%. Skraćenice koje označavaju nivoe statističke značajnosti p-vrednosti su sledeće: ns – $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ i **** $p < 0.0001$. Za procenu statističke razlike između tri ili više analiziranih populacija korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (one-way ANOVA), dok je za procenu statističke razlike između različitih populacija više grupa korišćena dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA).

8 Literatura

1. Nowarski, R.; Gagliani, N.; Huber, S.; Flavell, R.A. Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer. *Cancer Immunol Res* **2013**, *1*, 77–84, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0081.
2. Mantovani, A.; Garlanda, C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *New England Journal of Medicine* **2023**, *388*, 439–452, doi:10.1056/NEJMRA2206346/SUPPL_FILE/NEJMRA2206346_DISCLOSURES.PDF.
3. Akashi-Takamura, S.; Miyake, K. Toll-like Receptors (TLRs) and Immune Disorders. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2006**, *12*, 233–240, doi:10.1007/S10156-006-0477-4.
4. Kawai, T.; Akira, S. TLR Signaling. *Cell Death Differ* **2006**, *13*, 816–825, doi:10.1038/SJ.CDD.4401850;KWRD=LIFE+SCIENCES.
5. Gasparini, C.; Feldmann, M. NF-KB as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr Pharm Des* **2012**, *18*, 5735–5745, doi:10.2174/138161212803530763.
6. Soh, W.T.; Zhang, J.; Hollenberg, M.D.; Vliagoftis, H.; Rothenberg, M.E.; Sokol, C.L.; Robinson, C.; Jacquet, A. Protease Allergens as Initiators–Regulators of Allergic Inflammation. *Allergy* **2023**, *78*, 1148–1168, doi:10.1111/ALL.15678.
7. Mora, E.; Guglielmotti, A.; Biondi, G.; Sassone-Corsi, P. Bindarit: An Anti-Inflammatory Small Molecule That Modulates the NFκB Pathway. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 159–169, doi:10.4161/cc.11.1.18559.
8. Moser, B.A.; Escalante-Buendia, Y.; Steinhardt, R.C.; Rosenberger, M.G.; Cassaidy, B.J.; Naorem, N.; Chon, A.C.; Nguyen, M.H.; Tran, N.T.; Esser-Kahn, A.P. Small Molecule NF-KB Inhibitors as Immune Potentiators for Enhancement of Vaccine Adjuvants. *Front Immunol* **2020**, *11*, 2333, doi:10.3389/FIMMU.2020.511513/BIBTEX.
9. Nam, N.-H. Naturally Occurring NF-KappaB Inhibitors. *Mini Rev Med Chem* **2006**, *6*, 945–951, doi:10.2174/138955706777934937.
10. Hu, A.; Sun, L.; Lin, H.; Liao, Y.; Yang, H.; Mao, Y. Harnessing Innate Immune Pathways for Therapeutic Advancement in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2024**, *9*, 1–59, doi:10.1038/s41392-024-01765-9.
11. Lu, C.; Liu, Y.; Ali, N.M.; Zhang, B.; Cui, X. The Role of Innate Immune Cells in the Tumor Microenvironment and Research Progress in Anti-Tumor Therapy. *Front Immunol* **2023**, *13*, 1039260, doi:10.3389/FIMMU.2022.1039260/XML.
12. Constant, D.A.; Nice, T.J.; Rauch, I. Innate Immune Sensing by Epithelial Barriers. *Curr Opin Immunol* **2021**, *73*, 1–8, doi:10.1016/J.COI.2021.07.014.
13. Yi, M.; Li, T.; Niu, M.; Mei, Q.; Zhao, B.; Chu, Q.; Dai, Z.; Wu, K. Exploiting Innate Immunity for Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer* **2023**, *22*, 1–55, doi:10.1186/S12943-023-01885-W.
14. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017**, *2*, 1–9, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
15. Bhatt, D.; Ghosh, S. Regulation of the NF-KB-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front Immunol* **2014**, *5*, doi:10.3389/FIMMU.2014.00071.

16. Tripathi, P.; Aggarwal, A. *NF-KB Transcription Factor: A Key Player in the Generation of Immune Response*; 2006; Vol. 90;.
17. Lin, T.H.; Pajarinen, J.; Lu, L.; Nabeshima, A.; Cordova, L.A.; Yao, Z.; Goodman, S.B. NF-KB as a Therapeutic Target in Inflammatory-Associated Bone Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol* **2017**, *107*, 117–154, doi:10.1016/bs.apcsb.2016.11.002.
18. Viatour, P.; Merville, M.P.; Bours, V.; Chariot, A. Phosphorylation of NF-KappaB and IkappaB Proteins: Implications in Cancer and Inflammation. *Trends Biochem Sci* **2005**, *30*, 43–52, doi:10.1016/J.TIBS.2004.11.009.
19. Didonato, J.A.; Mercurio, F.; Karin, M. NF-KB and the Link between Inflammation and Cancer. *Immunol Rev* **2012**, *246*, 379–400, doi:10.1111/J.1600-065X.2012.01099.X.
20. Sun, S.C. Non-Canonical NF-KB Signaling Pathway. *Cell Research* **2011** *21:1* **2010**, *21*, 71–85, doi:10.1038/cr.2010.177.
21. Baeuerle, P.A.; Henkel, T. Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System. *Annu Rev Immunol* **1994**, *12*, 141–179, doi:10.1146/ANNUREV.IY.12.040194.001041.
22. Shih, R.H.; Wang, C.Y.; Yang, C.M. NF-KappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci* **2015**, *8*, doi:10.3389/FNMOL.2015.00077.
23. Madonna, G.; Ullman, C.D.; Gentilcore, G.; Palmieri, G.; Ascierto, P.A. NF-KB as Potential Target in the Treatment of Melanoma. *J Transl Med* **2012**, *10*, 1–8, doi:10.1186/1479-5876-10-53/FIGURES/1.
24. Schuliga, M. NF-KappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules* **2015**, *Vol. 5, Pages 1266-1283* **2015**, *5*, 1266–1283, doi:10.3390/BIOM5031266.
25. Trivedi, S.; Labuz, D.; Deering-Rice, C.E.; Kim, C.U.; Christensen, H.; Aamodt, S.; Huecksteadt, T.; Sanders, K.; Warren, K.J. IL-33 Induces NF-KB Activation in ILC2 That Can Be Suppressed by in Vivo and Ex Vivo 17 β -Estradiol. *Frontiers in Allergy* **2022**, *3*, 143, doi:10.3389/FALGY.2022.1062412.
26. Taniguchi, K.; Karin, M. NF-KB, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18*, 309–324, doi:10.1038/NRI.2017.142.
27. Kaltschmidt, C.; Banz-Jansen, C.; Benhidjeb, T.; Beshay, M.; Förster, C.; Greiner, J.; Hamelmann, E.; Jorch, N.; Mertzlufft, F.; Pfizenmaier, J.; et al. A Role for NF-KB in Organ Specific Cancer and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/CANCERS11050655,.
28. Rinkenbaugh, A.L.; Baldwin, A.S. The NF-KB Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells* **2016**, *5*, 16, doi:10.3390/CELLS5020016.
29. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801, doi:10.1016/J.CELL.2006.02.015/ASSET/8793559C-2439-44D5-A8B9-E680D9CBB773/MAIN.ASSETS/GR3.JPG.
30. Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. Toll-like Receptors. *Annu Rev Immunol* **2003**, *21*, 335–376, doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.21.120601.141126/CITE/REFWORKS.
31. Takeda, K.; Akira, S. TLR Signaling Pathways. *Semin Immunol* **2004**, *16*, 3–9, doi:10.1016/J.SMIM.2003.10.003.

32. Fitzgerald, K.A.; Kagan, J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **2020**, *180*, 1044–1066, doi:10.1016/J.CELL.2020.02.041/ASSET/18C8DBFD-8A76-41BF-910F-07E468DD5C56/MAIN.ASSETS/GR3.JPG.
33. Moresco, E.M.Y.; LaVine, D.; Beutler, B. Toll-like Receptors. *Current Biology* **2011**, *21*, R488–R493, doi:10.1016/j.cub.2011.05.039.
34. McClure, R.; Massari, P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol* **2014**, *5*, doi:10.3389/FIMMU.2014.00386.
35. Sabroe, I.; Parker, L.C.; Dower, S.K.; Whyte, M.K.B. The Role of TLR Activation in Inflammation. *J Pathol* **2008**, *214*, 126–135, doi:10.1002/PATH.2264.
36. Kawai, T.; Ikegawa, M.; Ori, D.; Akira, S. Decoding Toll-like Receptors: Recent Insights and Perspectives in Innate Immunity. *Immunity* **2024**, *57*, 649–673, doi:10.1016/J.IMMUNI.2024.03.004.
37. Avbelj, M.; Hafner-Bratkovič, I.; Lainšček, D.; Manček-Keber, M.; Peternelj, T.T.; Panter, G.; Treon, S.P.; Gole, B.; Potočnik, U.; Jerala, R. Cleavage-Mediated Regulation of Myd88 Signaling by Inflammasome-Activated Caspase-1. *Front Immunol* **2022**, *12*, 790258, doi:10.3389/FIMMU.2021.790258/BIBTEX.
38. Akashi-Takamura, S.; Miyake, K. TLR Accessory Molecules. *Curr Opin Immunol* **2008**, *20*, 420–425, doi:10.1016/J.COI.2008.07.001.
39. Park, B.S.; Lee, J.O. Recognition of Lipopolysaccharide Pattern by TLR4 Complexes. *Exp Mol Med* **2013**, *45*, e66–e66, doi:10.1038/EMM.2013.97;KWRD=BIOMEDICINE.
40. Lu, Y.C.; Yeh, W.C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145–151, doi:10.1016/J.CYTO.2008.01.006.
41. Ward, J.R.; Dower, S.K.; Whyte, M.K.B.; Buttle, D.J.; Sabroe, I. Potentiation of TLR4 Signalling by Plasmin Activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *341*, 299–303, doi:10.1016/J.BBRC.2005.12.188.
42. De Zoete, M.R.; Bouwman, L.I.; Kestra, A.M.; Van Putten, J.P.M. Cleavage and Activation of a Toll-like Receptor by Microbial Proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 4968–4973, doi:10.1073/PNAS.1018135108/SUPPL_FILE/PNAS.201018135SI.PDF.
43. Widera, D.; Aguilar, R.M.; Cottrell, G.S. Toll-like Receptor 4 and Protease-Activated Receptor 2 in Physiology and Pathophysiology of the Nervous System: More than Just Receptor Cooperation? *Neural Regen Res* **2019**, *14*, 1196, doi:10.4103/1673-5374.251290.
44. Rayees, S.; Rochford, I.; Joshi, J.C.; Joshi, B.; Banerjee, S.; Mehta, D. Macrophage TLR4 and PAR2 Signaling: Role in Regulating Vascular Inflammatory Injury and Repair. *Front Immunol* **2020**, *11*, 551372, doi:10.3389/FIMMU.2020.02091/XML/NLM.
45. Debierre-Grockiego, F.; Campos, M.A.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Bieker, U.; Resende, M.G.; Mansur, D.S.; Weingart, R.; Schmidt, R.R.; Golenbock, D.T.; et al. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma Gondii*. *The Journal of Immunology* **2007**, *179*, 1129–1137, doi:10.4049/JIMMUNOL.179.2.1129.
46. Peri, F.; Calabrese, V. Toll-like Receptor 4 (TLR4) Modulation by Synthetic and Natural Compounds: An Update. *J Med Chem* **2013**, *57*, 3612, doi:10.1021/JM401006S.

47. Rosenstein, R.K.; Bezbradica, J.S.; Yu, S.; Medzhitov, R. Signaling Pathways Activated by a Protease Allergen in Basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, E4963–E4971, doi:10.1073/PNAS.1418959111/SUPPL_FILE/PNAS.201418959SI.PDF.
48. Kubo, M. Innate and Adaptive Type 2 Immunity in Lung Allergic Inflammation. *Immunol Rev* **2017**, *278*, 162–172, doi:10.1111/IMR.12557.
49. Reed, C.E.; Kita, H. The Role of Protease Activation of Inflammation in Allergic Respiratory Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004**, *114*, 997–1008, doi:10.1016/J.JACI.2004.07.060.
50. Ohnmacht, C.; Schwartz, C.; Panzer, M.; Schiedewitz, I.; Naumann, R.; Voehringer, D. Basophils Orchestrate Chronic Allergic Dermatitis and Protective Immunity against Helminths. *Immunity* **2010**, *33*, 364–374, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.011.
51. Jacquet, A.; Jacquet, A. Interactions of Airway Epithelium with Protease Allergens in the Allergic Response. *Clinical & Experimental Allergy* **2011**, *41*, 305–311, doi:10.1111/J.1365-2222.2010.03661.X.
52. Chen, W.; Chen, S.; Yan, C.; Zhang, Y.; Zhang, R.; Chen, M.; Zhong, S.; Fan, W.; Zhu, S.; Zhang, D.; et al. Allergen Protease-Activated Stress Granule Assembly and Gasdermin D Fragmentation Control Interleukin-33 Secretion. *Nat Immunol* **2022**, *23*, 1021–1030, doi:10.1038/s41590-022-01255-6.
53. Salazar, F.; Ghaemmaghami, A.M. Allergen Recognition by Innate Immune Cells: Critical Role of Dendritic and Epithelial Cells. *Front Immunol* **2013**, *4*, 66834, doi:10.3389/FIMMU.2013.00356/BIBTEX.
54. Meloun, A.; León, B. Sensing of Protease Activity as a Triggering Mechanism of Th2 Cell Immunity and Allergic Disease. *Frontiers in Allergy* **2023**, *4*, 1265049, doi:10.3389/FALGY.2023.1265049/BIBTEX.
55. Chevigné, A.; Jacquet, A. Emerging Roles of the Protease Allergen Der p 1 in House Dust Mite–Induced Airway Inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2018**, *142*, 398–400, doi:10.1016/j.jaci.2018.05.027.
56. Reddy, V.B.; Lerner, E.A. Activation of Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors by the House Dust Mite Cysteine Protease Der P1 Provides a New Mechanism Linking Allergy and Inflammation. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292*, 17399–17406, doi:10.1074/jbc.M117.787887.
57. Jacquet, A. The HDM Allergen Orchestra and Its Cysteine Protease Maestro: Stimulators of Kaleidoscopic Innate Immune Responses. *Mol Immunol* **2023**, *156*, 48–60, doi:10.1016/J.MOLIMM.2023.03.002.
58. Hewitt, C.R.A.; Brown, A.P.; Hart, B.J.; Pritchard, D.I. A Major House Dust Mite Allergen Disrupts the Immunoglobulin E Network by Selectively Cleaving CD23: Innate Protection by Antiproteases. *Journal of Experimental Medicine* **1995**, *182*, 1537–1544, doi:10.1084/JEM.182.5.1537,.
59. Rallabhandi, P.; Nhu, Q.M.; Toshchakov, V.Y.; Piao, W.; Medvedev, A.E.; Hollenberg, M.D.; Fasano, A.; Vogel, S.N. Analysis of Proteinase-Activated Receptor 2 and TLR4 Signal Transduction: A NOVEL PARADIGM FOR RECEPTOR COOPERATIVITY. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 24314, doi:10.1074/JBC.M804800200.

60. Agoro, R.; Piotet-Morin, J.; Palomo, J.; Michaudel, C.; Vigne, S.; Maillet, I.; Chenuet, P.; Guillou, N.; Le Bérichel, J.; Kisielow, M.; et al. IL-1R1–MyD88 Axis Elicits Papain-Induced Lung Inflammation. *Eur J Immunol* **2016**, *46*, 2531–2541, doi:10.1002/EJI.201646366;SUBPAGE:STRING:FULL.
61. Matsumura, Y. Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells. *J Allergy (Cairo)* **2012**, *2012*, 1–11, doi:10.1155/2012/903659.
62. Ferreira, F.; Hauser, M.; Egger, M.; Wallner, M.; Wopfner, N.; Schmidt, G. Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families. *AACE Clin Case Rep* **2021**, *7*, 1, doi:10.2174/1874226200801010001.
63. Gall, H.; Kalveram, K.J.; Forck, G.; Sterry, W. Kiwi Fruit Allergy: A New Birch Pollen-Associated Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol* **1994**, *94*, 70–76, doi:10.1016/0091-6749(94)90073-6,.
64. Berdowska, I. Cysteine Proteases as Disease Markers. *Clinica Chimica Acta* **2004**, *342*, 41–69, doi:10.1016/J.CCCN.2003.12.016.
65. Giangrieco, I.; Ciardiello, M.A.; Tamburrini, M.; Tuppo, L.; Rafaiani, C.; Mari, A.; Alessandri, C. Comparative Analysis of the Immune Response and the Clinical Allergic Reaction to Papain-like Cysteine Proteases from Fig, Kiwifruit, Papaya, Pineapple and Mites in an Italian Population. *Foods* **2023**, *12*, 2852, doi:10.3390/FOODS12152852/S1.
66. Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agric Biol Chem* **1978**, *42*, 523–528, doi:10.1271/BBB1961.42.523.
67. Hook, G.; Hook, V.; Kindy, M. The Cysteine Protease Inhibitor, E64d, Reduces Brain Amyloid- β and Improves Memory Deficits in Alzheimer's Disease Animal Models by Inhibiting Cathepsin B, but Not BACE1, β -Secretase Activity. *J Alzheimers Dis* **2011**, *26*, 387, doi:10.3233/JAD-2011-110101.
68. Alemán, A.; Sastre, J.; Quirce, S.; De Las Heras, M.; Carnés, J.; Fernández-Caldas, E.; Pastor, C.; Blázquez, A.B.; Vivanco, F.; Cuesta-Herranz, J. Allergy to Kiwi: A Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge Study in Patients from a Birch-Free Area. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004**, *113*, 543–550, doi:10.1016/j.jaci.2003.11.043.
69. Grozdanović, M.M.; Drakulić, B.J.; Gavrović-Jankulović, M. Conformational Mobility of Active and E-64-Inhibited Actinidin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2013**, *1830*, 4790–4799, doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.015.
70. Lucas, J.S.A.; Nieuwenhuizen, N.J.; Atkinson, R.G.; MacRae, E.A.; Cochrane, S.A.; Warner, J.O.; Hourihane, J.O.B. Kiwifruit Allergy: Actinidin Is Not a Major Allergen in the United Kingdom. *Clinical and Experimental Allergy* **2007**, *37*, 1340–1348, doi:10.1111/J.1365-2222.2007.02776.X,.
71. Cavic, M.; Grozdanovic, M.M.; Bajic, A.; Jankovic, R.; Andjus, P.R.; Gavrovic-Jankulovic, M. The Effect of Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa*) Cysteine Protease Actinidin on the Occludin Tight Junction Network in T84 Intestinal Epithelial Cells. *Food and Chemical Toxicology* **2014**, *72*, 61–68, doi:10.1016/j.fct.2014.07.012.
72. Pastorello, E.A.; Conti, A.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Rivolta, F.; Ansaloni, R.; Ispano, M.; Incorvaia, C.; Giuffrida, M.G.; Ortolani, C. Identification of Actinidin as the Major Allergen of

- Kiwi Fruit. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1998**, *101*, 531–537, doi:10.1016/S0091-6749(98)70360-4,.
73. Nishiyama, I.; Oota, T. Varietal Difference in Actinidin Concentration and Protease Activity in the Kiwi Fruit Juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2002**, *49*, 401–408, doi:10.3136/NSKKK.49.401.
74. Čavić, M.; Grozdanović, M.; Bajić, A.; Srđić-Rajić, T.; Anjus, P.R.; Gavrović-Jankulović, M. Actinidin, a Protease from Kiwifruit, Induces Changes in Morphology and Adhesion of T84 Intestinal Epithelial Cells. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 46–52, doi:10.1016/j.phytochem.2011.12.014.
75. Nešić, A.; Čavić, M.; Popović, M.; Zlatanova, M.; Pieters, R.; Smit, J.; Gavrović-Jankulović, M. The Kiwifruit Allergen Act d 1 Activates NF-KB Signaling and Affects mRNA Expression of TJ Proteins and Innate pro-Allergenic Cytokines. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9120816.
76. Grozdanovic, M.; Popovic, M.; Polovic, N.; Burazer, L.; Vuckovic, O.; Atanaskovic-Markovic, M.; Lindner, B.; Petersen, A.; Gavrovic-Jankulovic, M. Evaluation of IgE Reactivity of Active and Thermally Inactivated Actinidin, a Biomarker of Kiwifruit Allergy. *Food and Chemical Toxicology* **2012**, *50*, 1013–1018, doi:10.1016/j.fct.2011.12.030.
77. Grozdanovic, M.M.; Čavić, M.; Nešić, A.; Andjelković, U.; Akbari, P.; Smit, J.J.; Gavrović-Jankulović, M. Kiwifruit Cysteine Protease Actinidin Compromises the Intestinal Barrier by Disrupting Tight Junctions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2016**, *1860*, 516–526, doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.005.
78. Nešić, A.; Stam, A.; Čavić, M.; Ten Klooster, J.P.; Pieters, R.; Smit, J.; Gavrović-Jankulović, M. Activation of Epithelial Cells by the Major Kiwifruit Allergen Act d 1 in Human and Mouse-Derived Intestinal Model. *J Funct Foods* **2019**, *62*, 103556, doi:10.1016/j.jff.2019.103556.
79. Grozdanovic, M.M.; Čavić, M.; Nešić, A.; Andjelković, U.; Akbari, P.; Smit, J.J.; Gavrović-Jankulović, M. Kiwifruit Cysteine Protease Actinidin Compromises the Intestinal Barrier by Disrupting Tight Junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2016**, *1860*, 516–526, doi:10.1016/J.BBAGEN.2015.12.005.
80. Giridharan, S.; Srinivasan, M. Mechanisms of NF-KB P65 and Strategies for Therapeutic Manipulation. *J Inflamm Res* **2018**, *11*, 407–419, doi:10.2147/JIR.S140188.
81. Ghosh, S.; Hayden, M.S. New Regulators of NF-KB in Inflammation. *Nature Reviews Immunology* **2008**, *8*, 837–848, doi:10.1038/nri2423.
82. Rothschild, D.E.; McDaniel, D.K.; Ringel-Scaia, V.M.; Allen, I.C. Modulating Inflammation through the Negative Regulation of NF-KB Signaling. *J Leukoc Biol* **2018**, *103*, 1131–1150, doi:10.1002/JLB.3MIR0817-346RRR.
83. Peri, F.; Piazza, M.; Calabrese, V.; Damore, G.; Cighetti, R. Exploring the LPS/TLR4 Signal Pathway with Small Molecules. *Biochem Soc Trans* **2010**, *38*, 1390–1395, doi:10.1042/BST0381390.
84. Becatti, M.; Prignano, F.; Fiorillo, C.; Pescitelli, L.; Nassi, P.; Lotti, T.; Taddei, N. The Involvement of Smac/DIABLO, P53, NF-KB, and MAPK Pathways in Apoptosis of Keratinocytes from Perilesional Vitiligo Skin: Protective Effects of Curcumin and Capsaicin. *Antioxid Redox Signal* **2010**, *13*, 1309–1321, doi:10.1089/ARS.2009.2779;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.

85. Shin, Y.H.; Namkoong, E.; Choi, S.; Bae, J.S.; Jin, M.; Hwang, S.M.; Arote, R.; Choi, S.Y.; Park, K. Capsaicin Regulates the NF-KB Pathway in Salivary Gland Inflammation. *J Dent Res* **2013**, *92*, 547–552, doi:10.1177/0022034513487376.
86. Lee, Y.J.; Lee, Y.M.; Lee, C.K.; Jung, J.K.; Han, S.B.; Hong, J.T. Therapeutic Applications of Compounds in the Magnolia Family. *Pharmacol Ther* **2011**, *130*, 157–176, doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2011.01.010.
87. Palanki, M. Inhibitors of AP-1 and NF- κ B Mediated Transcriptional Activation: Therapeutic Potential in Autoimmune Diseases and Structural Diversity. *Curr Med Chem* **2012**, *9*, 219–227, doi:10.2174/0929867023371265.
88. Lee, S.; Yagita, H.; Sayers, T.J.; Celis, E. Optimized Combination Therapy Using Bortezomib, TRAIL and TLR Agonists in Established Breast Tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2010**, *59*, 1073–1081, doi:10.1007/S00262-010-0834-0,.
89. Ding, T.; Du, Y.; Yang, B.; Tian, W.; Li, J.; Xie, J. Comprehensive Review of Macrophage Models: Primary Cells and Immortalized Lines across Species. *Front Immunol* **2025**, *16*, 1640935, doi:10.3389/FIMMU.2025.1640935/XML.
90. Daigneault, M.; Preston, J.A.; Marriott, H.M.; Whyte, M.K.B.; Dockrell, D.H. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One* **2010**, *5*, e8668, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008668.
91. Chanput, W.; Mes, J.J.; Wichers, H.J. THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach. *Int Immunopharmacol* **2014**, *23*, 37–45, doi:10.1016/J.INTIMP.2014.08.002.
92. Chanput, W.; Mes, J.; Vreeburg, R.A.M.; Savelkoul, H.F.J.; Wichers, H.J. Transcription Profiles of LPS-Stimulated THP-1 Monocytes and Macrophages: A Tool to Study Inflammation Modulating Effects of Food-Derived Compounds. *Food Funct* **2010**, *1*, 254–261, doi:10.1039/C0FO00113A.
93. Chanput, W.; Mes, J.J.; Savelkoul, H.F.J.; Wichers, H.J. Characterization of Polarized THP-1 Macrophages and Polarizing Ability of LPS and Food Compounds. *Food Funct* **2013**, *4*, 266–276, doi:10.1039/c2fo30156c.
94. Shah, R.; Luo, E.D.; Shaffer, C.A.; Tabakha, M.; Tomov, S.; Minton, S.H.; Brown, M.K.; Palazzolo, D.L.; Cuadra, G.A. Polarization of THP-1-Derived Human M0 to M1 Macrophages Exposed to Flavored E-Liquids. *Toxics* **2025**, *Vol. 13*, Page 451 **2025**, *13*, 451, doi:10.3390/TOXICS13060451.
95. Forrester, M.A.; Wassall, H.J.; Hall, L.S.; Cao, H.; Wilson, H.M.; Barker, R.N.; Vickers, M.A. Similarities and Differences in Surface Receptor Expression by THP-1 Monocytes and Differentiated Macrophages Polarized Using Seven Different Conditioning Regimens. *Cell Immunol* **2018**, *332*, 58–76, doi:10.1016/j.cellimm.2018.07.008.
96. Deng, Y.; Govers, C.; Beest, E. ter; van Dijk, A.J.; Hettinga, K.; Wichers, H.J. A THP-1 Cell Line-Based Exploration of Immune Responses Toward Heat-Treated BLG. *Front Nutr* **2021**, *7*, doi:10.3389/fnut.2020.612397.
97. Nascimento, C.R.; Rodrigues Fernandes, N.A.; Gonzalez Maldonado, L.A.; Rossa Junior, C. Comparison of Monocytic Cell Lines U937 and THP-1 as Macrophage Models for in Vitro Studies. *Biochem Biophys Rep* **2022**, *32*, 101383, doi:10.1016/J.BBREP.2022.101383.

98. Nešić, A.; Čavić, M.; Popović, M.; Gavrović-Jankulović, M. A New Approach for Activation of the Kiwifruit Cysteine Protease for Usage in In-Vitro Testing. *Mol Biol Rep* **2021**, *48*, 4065–4072, doi:10.1007/s11033-021-06416-8.
99. Jarvinen-Seppo, K.; Lajoie, S.; Wojno, E.T.; León, B. Understanding the Development of Th2 Cell-Driven Allergic Airway Disease in Early Life. *Frontiers in Allergy* **2023**, *3*, 1080153, doi:10.3389/FALGY.2022.1080153.
100. Chruszcz, M.; Chew, F.T.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Hurlburt, B.K.; Mueller, G.A.; Pomés, A.; Rouvinen, J.; Villalba, M.; Wöhr, B.M.; Breiteneder, H. Allergens and Their Associated Small Molecule Ligands—Their Dual Role in Sensitization. *Allergy* **2021**, *76*, 2367, doi:10.1111/ALL.14861.
101. Kuzmich, N.N.; Sivak, K. V.; Chubarev, V.N.; Porozov, Y.B.; Savateeva-Lyubimova, T.N.; Peri, F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines* **2017**, Vol. 5, Page 34 **2017**, *5*, 34, doi:10.3390/VACCINES5040034.
102. Hoareau, L.; Bencharif, K.; Rondeau, P.; Murumalla, R.; Ramanan, P.; Tallet, F.; Delarue, P.; Cesari, M.; Festy, F. Signaling Pathways Involved in LPS Induced TNF α Production in Human Adipocytes. *J Inflamm* **2010**, *7*, 1–12, doi:10.1186/1476-9255-7-1/FIGURES/7.
103. Arbour, N.C.; Lorenz, E.; Schutte, B.C.; Zabner, J.; Kline, J.N.; Jones, M.; Frees, K.; Watt, J.L.; Schwartz, D.A. TLR4 Mutations Are Associated with Endotoxin Hyporesponsiveness in Humans. *Nat Genet* **2000**, *25*, 187–191, doi:10.1038/76048;KWRD=BIOMEDICINE.
104. Manèek-Keber, M.; Frank-Bertoncelj, M.; Hafner-Bratkoviè, I.; Smole, A.; Zorko, M.; Pirher, N.; Hayer, S.; Kralj-Igliè, V.; Rozman, B.; Ilc, N.; et al. Toll-like Receptor 4 Senses Oxidative Stress Mediated by the Oxidation of Phospholipids in Extracellular Vesicles. *Sci Signal* **2015**, *8*, ra60, doi:10.1126/SCISIGNAL.2005860/SUPPL_FILE/8_RA60_SM.PDF.
105. d'Alessandro, M.; Bergantini, L.; Perrone, A.; Cameli, P.; Beltrami, V.; Alderighi, L.; Pini, L.; Bargagli, E.; Saletti, M. House Dust Mite Allergy and the Der P1 Conundrum: A Literature Review and Case Series. *Allergies* **2021**, Vol. 1, Pages 108-114 **2021**, *1*, 108–114, doi:10.3390/ALLERGIES1020008.
106. Pichavant, M.; Charbonnier, A.S.; Taront, S.; Brichet, A.; Wallaert, B.; Pestel, J.; Tonnel, A.B.; Gosset, P. Asthmatic Bronchial Epithelium Activated by the Proteolytic Allergen Der p 1 Increases Selective Dendritic Cell Recruitment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, *115*, 771–778, doi:10.1016/J.JACI.2004.11.043.
107. Seaf, M.; Ben-Zimra, M.; Mankuta, D.; Dayan, N.; Levi-Schaffer, F. Papain Activates Human Mast Cells to Release Proinflammatory Mediators via Its Enzymatic Activity. *Journal of Investigative Dermatology* **2016**, *136*, 1523–1525, doi:10.1016/j.jid.2016.03.030.
108. Cayrol, C.; Duval, A.; Schmitt, P.; Roga, S.; Camus, M.; Stella, A.; Burlet-Schiltz, O.; Gonzalez-De-Peredo, A.; Girard, J.P. Environmental Allergens Induce Allergic Inflammation through Proteolytic Maturation of IL-33. *Nature Immunology* **2018**, *19*, 375–385, doi:10.1038/s41590-018-0067-5.
109. Panter, G.; Jerala, R. The Ectodomain of the Toll-like Receptor 4 Prevents Constitutive Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 23334–23344, doi:10.1074/JBC.M110.205419/ASSET/3CCD4EC1-4317-47F8-9C21-344D47AA2F2F/MAIN.ASSETS/GR6.JPG.

110. Ariel, A.; Maridonneau-Parini, I.; Rovere-Querini, P.; Levine, J.S.; Mühl, H. Macrophages in Inflammation and Its Resolution. *Front Immunol* **2012**, *3*, 37814, doi:10.3389/FIMMU.2012.00324/BIBTEX.
111. Li, H.; Meng, Y.; He, S.; Tan, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Wang, L.; Zheng, W. Macrophages, Chronic Inflammation, and Insulin Resistance. *Cells* **2022**, *Vol. 11*, Page 3001 **2022**, *11*, 3001, doi:10.3390/CELLS11193001.
112. Luo, M.; Zhao, F.; Cheng, H.; Su, M.; Wang, Y. Macrophage Polarization: An Important Role in Inflammatory Diseases. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1352946, doi:10.3389/FIMMU.2024.1352946/PDF.
113. Wu, Y.; Pegoraro, A.F.; Weitz, D.A.; Janmey, P.; Sun, S.X. The Correlation between Cell and Nucleus Size Is Explained by an Eukaryotic Cell Growth Model. *PLoS Comput Biol* **2022**, *18*, doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1009400.
114. Dobashi, K.; Aihara, M.; Araki, T.; Shimizu, Y.; Utsugi, M.; Iizuka, K.; Murata, Y.; Hamuro, J.; Nakazawa, T.; Mori, M. Regulation of LPS Induced IL-12 Production by IFN- γ and IL-4 through Intracellular Glutathione Status in Human Alveolar Macrophages. *Clin Exp Immunol* **2002**, *124*, 290–296, doi:10.1046/J.1365-2249.2001.01535.X.
115. Brundu S, F.A. Polarization and Repolarization of Macrophages. *J Clin Cell Immunol* **2015**, *06*, doi:10.4172/2155-9899.1000319.
116. Burgueño, J.F.; Abreu, M.T. Epithelial Toll-like Receptors and Their Role in Gut Homeostasis and Disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17*, 263–278, doi:10.1038/S41575-019-0261-4.
117. Chruszcz, M.; Chew, F.T.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Hurlburt, B.K.; Mueller, G.A.; Pomés, A.; Rouvinen, J.; Villalba, M.; Wöhr, B.M.; Breiteneder, H. Allergens and Their Associated Small Molecule Ligands—Their Dual Role in Sensitization. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2021**, *76*, 2367–2382.
118. Trbojević Ivić, J.; Milosavić, N.; Dimitrijević, A.; Gavrović Jankulović, M.; Bezbradica, D.; Kolarski, D.; Veličković, D. Synthesis of Medium-Chain Length Capsinoids from Coconut Oil Catalyzed by Candida Rugosa Lipases. *Food Chem* **2017**, *218*, 505–508, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.09.049.
119. Deme, P.; Narasimhulu, C.A.; Parthasarathy, S. Identification and Evaluation of Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Components Extracted from Sesame (Sesamum Indicum) Oil. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2018**, *1087–1088*, 61–69, doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.029.
120. Zhao, D.; Jiang, Y.; Sun, J.; Li, H.; Huang, M.; Sun, X.; Zhao, M. Elucidation of The Anti-Inflammatory Effect of Vanillin In Lps-Activated THP-1 Cells. *J Food Sci* **2019**, *84*, 1920–1928, doi:10.1111/1750-3841.14693.
121. Bujak, J.K.; Kosmala, D.; Szopa, I.M.; Majchrzak, K.; Bednarczyk, P. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Front Oncol* **2019**, *9*, 1087, doi:10.3389/FONC.2019.01087/BIBTEX.
122. Andrei, C.; Zănfirescu, A.; Nițulescu, G.M.; Olaru, O.T.; Negreș, S. Natural Active Ingredients and TRPV1 Modulation: Focus on Key Chemical Moieties Involved in Ligand–Target Interaction. *Plants* **2023**, *12*, 339, doi:10.3390/plants12020339.

123. A, F.; S, B.; M, M. Polarization and Repolarization of Macrophages. *J Clin Cell Immunol* **2015**, 6, 1–10, doi:10.4172/2155-9899.1000319.
124. Kashfi, K.; Kannikal, J.; Nath, N.; Macrophage, N.; Vincenza Carriero, M. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of INOS-Derived NO. *Cells* **2021**, Vol. 10, Page 3194 **2021**, 10, 3194, doi:10.3390/CELLS10113194.
125. Choi, J.W.; Kwon, M.J.; Kim, I.H.; Kim, Y.M.; Lee, M.K.; Nam, T.J. Pyropia Yezoensis Glycoprotein Promotes the M1 to M2 Macrophage Phenotypic Switch via the STAT3 and STAT6 Transcription Factors. *Int J Mol Med* **2016**, 38, 666–674, doi:10.3892/IJMM.2016.2656,.
126. Feng, Z.; Meng, F.; Huo, F.; Zhu, Y.; Qin, Y.; Gui, Y.; Zhang, H.; Lin, P.; He, Q.; Li, Y.; et al. Inhibition of Ferroptosis Rescues M2 Macrophages and Alleviates Arthritis by Suppressing the HMGB1/TLR4/STAT3 Axis in M1 Macrophages. *Redox Biol* **2024**, 75, 103255, doi:10.1016/J.REDOX.2024.103255.
127. Kwon, D.H.; Lee, H.; Park, C.; Hong, S.H.; Hong, S.H.; Kim, G.Y.; Cha, H.J.; Kim, S.; Kim, H.S.; Hwang, H.J.; et al. Glutathione Induced Immune-Stimulatory Activity by Promoting M1-Like Macrophages Polarization via Potential ROS Scavenging Capacity. *Antioxidants* **2019**, Vol. 8, Page 413 **2019**, 8, 413, doi:10.3390/ANTIOX8090413.
128. Hornung, V.; Bauernfeind, F.; Halle, A.; Samstad, E.O.; Kono, H.; Rock, K.L.; Fitzgerald, K.A.; Latz, E. Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the NALP3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization. *Nat Immunol* **2008**, 9, 847–856, doi:10.1038/NI.1631,.
129. Boršić, E.; Ramuta, T.Ž.; Orehek, S.; Kreft, M.E.; Geyer, M.; Jerala, R.; Hafner-Bratkovič, I. Clustering of NLRP3 Induced by Membrane or Protein Scaffolds Promotes Inflammasome Assembly. *Nature Communications* **2025** 16:1 **2025**, 16, 1–18, doi:10.1038/s41467-025-60277-4.

Biografija

Milena O. Zlatanova je rođena 29.03.1997. godine u Skoplju, S. Makedonija. Završila je Gimnaziju u Leskovcu, prirodno-matematički smer, 2015. godine kao nosilac diplome „Vuk Stefanović-Karadžić“. Osnovne akademske studije je upisala školske 2015/2016. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Osnovne akademske studije je završila 2019. godine sa prosečnom ocenom 9,51 (devet i 51/100), i odbranila je završni rad pod naslovom „Uticaj Act d 1, glavnog alergena kivijsa, na gensku ekspresiju proinflatornih citokina i proteina čvrstih veza u humanim embrionalnim ćelijama bubrega *in vitro*“ sa ocenom 10 (deset). Iste godine je postala nosilac diplome „Đorđe Stefanović“ koju dodeljuje Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu najboljem studentu studijske grupe diplomirani biohemičar u generaciji. Master akademske studije je upisala školske 2019/2020. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Master akademske studije je završila 2020. godine sa prosečnom ocenom 10 (deset), a završni master rad pod nazivom „Aktivacija NF- κ B signalnog puta u alergijskom odgovoru na glavni alergen kivijsa Act d 1“ odbranila je sa ocenom 10 (deset). U periodu od 2016. do 2019. godine, Milena O. Zlatanova je bila nosilac stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2019. do 2020. godine bila je nosilac stipendije za izuzetno nadarene studente Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Doktorske akademske studije je upisala 2020. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, pod mentorstvom prof. dr Marije Gavrović-Jankulović. Do sada je položila šest od šest ispita predviđenih planom i programom doktorskih akademskih studija, svaki sa ocenom 10.

Milena O. Zlatanova se od 2020. godine bavi naučno-istraživačkim radom u oblasti imunologije pri Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kad je i zaposlena kao istraživač-pripravnik. Od 2023. godine zaposlena je kao istraživač-saradnik pri istoj Katedri. Od 2020. godine je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ (172049). Od 2023. godine aktivno učestvuje u okviru HORIZON-MSCA-DN-2021 ALLPreT projekta „Allergenicity Prediction Toolbox for Novel Foods“ (ESR6). Od 2020. godine je aktivno angažovana kao saradnik u nastavi pri Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom svog dosadašnjeg rada bila je angažovana na sledećim kursovima: Imunologija (421B2- smer Biohemija, OAS), Molekulske osnove patoloških stanja (422B2- smer Biohemija, OAS), Biohemija proteina i nukleinskih kiselina (401B2 - smer Biohemija, OAS), Bioinformatika (451B2 - smer Biohemija, MAS). Dobitnica je stipendije Federacije evropskih biohemijskih društava (FEBS) za kratak tromesečni naučni boravak za 2025. godinu na departmanu za Sintetičku biologiju i Imunologiju, Hemijskog Instituta, Institut od Nacionalnog značaja za Republiku Sloveniju, u Ljubljani, Slovenija, gde je radila pod mentorstvom dr Ive Hafner-Bratkovič. Autor je 4 publikacija objavljenim u časopisima od međunarodnog značaja, od kojih je prvi autor u dve, a koautor u još 2 publikacije. Aktivno je učestvovala na više naučnih konferencija, gde je prezentovala svoje istraživačke radove. 2022. godine je dobila ICGEB stipendiju za učešće na FEBS ICGEB radionici „Proteolysis: at the interface between health and disease“ održanoj u Bledu, Slovenija, kao i FEBS stipendiju za učešće na FEBS naprednom kursu “360 degrees Lysosome: from structure to genomics, from function to disease“, održanom u Kušadasiju, Turska iste godine. Naredne godine je nagrađena stipendijom za odlazak na međunarodni FEBS kongres u Turu, Francuska. Iste godine, dobila je i stipendiju Evropske federacije društva imunologa (EFIS) za učešće na školi za imunologiju za jugoistočnu Evropu u Trogiru, Hrvatska. Član je Biohemijskog društva Srbije od 2018. godine, član centra za molekularne nauke o hrani Hemijskog fakulteta od 2020. godine, član Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju od 2021. godine i član Evropske federacije društva mladih imunologa od 2021. godine.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милена Златанова

Број индекса ДБ10/2020

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом :

„Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____

Потпис аутора

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Милена Златанова**

Број индекса: **ДБ10/2020**

Студијски програм: **Биохемија**

Наслов рада:

**„Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF- κ B сигналним путем у
ћелијама урођеног имунског система“**

Ментор: др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, _____

Потпис аутора

образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

☒ 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

1. Ауторство. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.