

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације **Милене О. Златанове**, мастер биохемије

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 9. октобра 2025. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени урађене дисертације кандидата Милене О. Златанове, мастер биохемије, пријављене под насловом:

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

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 27.4.2023. године на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: 191/5 од 13.04.2023.) дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-1502/2-23 од 27.4.2023.).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Милене О. Златанове написана је на српском језику на 117 страна А4 формата (Times New Roman, величина слова 12pt, маргине 2cm и проред 1.0). Дисертација садржи 15 табела, 61 слику и 129 литературних навода. Састоји се из следећих поглавља: Увод (1 страна), Преглед литературе (20 страна), Циљеви (1 страна), Наши радови (47 страна), Дискусија (6 страна), Закључак (2 стране), Материјали и методе (14 страна), Литература (10 страна). Поред наведених поглавља дисертација садржи и информације о ментору и комисији (1 страна), захвалницу на српском језику (1 страна), сажетак на српском језику (1 страна), сажетак на енглеском језику (1 страна), листу скраћеница (2 стране), садржај (3 стране), биографију кандидаткиње на српском језику (1 страна), изјаву о ауторству (1 страна), изјаву о истоветности (1 страна) и изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод пружа преглед функција урођеног имунског система и његових компоненти, пре свега рецептора који препознају обрасце патогена, где је посебно издвојен TLR4 и његов значај у преносу сигнала. Детаљно је описан и сигнални пут посредован нуклеарним

фактором κB (NF- κB), његова улога у имунском одговору у различитим патолошким стањима, укључујући алергијске реакције. Поменути су активатори и потенцијални инхибитори његове активације. Представљене су различите стратегије инхибиције NF- κB сигналног пута, као и предности и мане малих инхибиторних молекула из различитих извора и њихов потенцијал у терапији.

Преглед литературе се састоји из 6 целина у којима је дат приказ појмова и механизма који су од значаја за ову докторску дисертацију. Целина **Урођени имунски систем** даје преглед улоге и компоненти урођеног имунског система, укључујући ћелије које га чине и рецепторе који учествују у преносу сигнала у ћелији. Друга целина, **NF- κB сигнални пут**, описује процес преноса сигнала посредован NF- κB сигналним путем и компонентне сигналне каскаде, преглед патолошких стања где долази до активације NF- κB и гена регулисаних од стране NF- κB . Следећа целина, **Рецептори слични Toll-у**, се осврће на структуру, локализацију и улогу ових рецептора, са фокусом на TLR4. Четврта целина, **Алергени као активатори имунског система**, описује проинфламаторни утицај алергена, са посебним освртом на протеазне алергене и цистеин протеазу актинидин (Act d 1). Пета целина, **Модулатори NF- κB посредоване инфламације**, обрађује различите класе молекула који циљају овај сигнални пут, добијене из природних извора као и синтетичке мале молекуле. Последња целина, **In vitro модел системи урођених ћелија имунског система**, обухвата мишје и хумане модел системе који се користе за процену функције антиген-приказујућих ћелија *in vitro*.

Поглавље **Циљеви** наводи постављене циљеве ове докторске дисертације, као и конкретна питања на која је потребно одговорити током њене израде. Главни циљеви ове докторске дисертације су карактеризација молекулског механизма проинфламаторног ефекта Act d 1, успостављање стабилног модел система TNP-1 макрофага и карактеризација имуномодулаторног ефекта одабраних малих молекула, пре свега на активацију NF- κB .

У поглављу **Наши радови** представљени су резултати добијени током израде ове докторске дисертације:

- **Изоловање и карактеризација Act d 1:** Приказан је хроматографски поступак пречишћавања Act d 1 из плода зеленог кивија, као и ниво његове протеолитичке активности након пречишћавања и у присуству одабраних малих молекула.
- **Ефекат Act d 1 и малих молекула на вијабилност ћелија:** Приказан је ефекат Act d 1 алергена као и свих коришћених малих молекула, на ћелијску вијабилност и испитана је њихова потенцијална цитотоксичност.
- **Испитивање природе проинфламаторног ефекта Act d 1:** Окарактерисан је проинфламаторни ефекат Act d 1 на ћелијама урођене имуности, пратећи експресију и производњу цитокина, као и активацију специфичних сигналних путева у присуству и одсуству TLR4.
- **Улога протеолитичке активности у проинфламаторном ефекту Act d 1.** Дефинисан је механизам активације TLR4 од стране Act d 1, зависан од протеолитичке активности овог алергена.
- **Успостављање модел система TNP-1 макрофага за процену имуномодулаторних ефеката:** Оптимизован је поступак диференцијације TNP-1

моноцита у макрофаге и добијени макрофаги су окарактерисани морфолошки и функционално.

- **Утицај малих молекула на проинфламаторне цитокине:** Праћена је генска експресија као и производња проинфламаторних цитокина у више различитих ћелијских модела.
- **Инхибиција активације NF-κB сигналног пута малим молекулима:** Окарактерисан је инхибиторни ефекат одабраних малих молекула на активацију NF-κB, експресију и транслокацију његове главне компоненте.
- **Фенотипске промене у TLR-1 макрофагима под утицајем Act d 1 и малих молекула:** Анализом површинских маркера окарактерисан је фенотипски профил макрофага под утицајем коришћених проинфламаторних стимулуса и малих молекула.
- **Антиоксидативно дејство малих молекула:** Процењена је антиоксидативна способност одабраних малих молекула на TLR-1 макрофагима пратећи различите параметре оксидативног стреса.

Поглавље **Дискусија** анализира добијене резултате и даје додатан контекст позивајући се на постојеће литературне податке. Критичким разматрањем резултата и њиховим поређењем са литературним наводима се даје додатно објашњење добијених резултата уз успостављање нових закључака.

Поглавље **Закључак** даје сажет преглед свих резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације и даје одговоре на питања постављена у оквиру циљева.

У поглављу **Материјал и методе** су детаљно описани коришћени реагенси, узорци, опрема и експерименталне методе коришћене при изради ове докторске дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

Током израде ове докторске дисертације главни алерген кивија, цистеин протеаза Act d 1, је изолована из зеленог плода кивија и пречишћена комбинацијом две јоноизмењивачке хроматографије. Принос је био 120 mg Act d 1 из 500 g кивија. Пречишћеном алергену је потврђена ензимска активност, а одсуство његових цитотоксичних ефеката је показано на различитим ћелијским линијама *in vitro* (TLR-1 макрофаги, HEK293 и Saco2 ћелије). Проинфламаторни ефекат Act d 1 је потврђен у имортализованим мишијим макрофагима изведеним из костне сржи (BMDM) третираним растућим концентрацијама Act d 1 (1, 0,1, 0,01 mg/mL), где је показано да Act d 1 доводи до повећања синтезе проинфламаторних цитокина IL-6 и TNF на концентрационо-зависан начин. У репортерској линији мишијих макрофага RAW Blue™ потврђена је и активација NF-κB сигналног пута од стране ове протеазе, такође на концентрационо-зависан начин. Проинфламаторни одговор који је Act d 1 изазвао у вишим концентрацијама (1 и 0,1 mg/mL) је био упоредив са одговором изазваним са 1 μg/mL липополисахарида (LPS), указујући на његов значајан проинфламаторни потенцијал. Коришћењем примарних BMDM из *wild-type* и TLR4-/- (мишеви без функционалног *Tlr4* и експресије TLR4) мишева, потврђено је да је проинфламаторни ефекат Act d 1 зависан од присуства TLR4. У одсуству овог рецептора,

синтеза IL-6 након третмана са Act d 1 је потпуно изостала док је синтеза TNF значајно смањена и примећена је само након третмана ћелија са највишом коришћеном концентрацијом Act d 1 (1 mg/mL). Слични резултати су добијени и на HEK293 ћелијској линији, без и након стабилне трансфекције са плазмидима који кодирају TLR4 и његове костимулаторне молекуле MD2 и CD14. У овом систему је Act d 1-посредована активација NF-κB и IFNβ у потпуности изостала у одсуству TLR4, као и синтеза IL-8. У истом ћелијском ситему, Act d 1 је успешно активирао мутант TLR4 F463A, доводећи до приметне активације NF-κB и синтезе IL-8.

Како би се анализирао улога протеолитичке активности Act d 1 у активацији TLR4, коришћена су два независна приступа за инхибицију његове протеолитичке активности. Act d 1 инактивиран у присуству E64 (16 и 100 μM) довео је до смањене активације NF-κB (57% и 37 %) и синтезе IL-8 у односу на нативни Act d 1 у концентрацији од 1 mg/mL (100% активације NF-κB). Инактивација топлотним третманом на 95°C је такође довела до губитка активности NF-κB, постижући само 35% од иницијалне активности. Како би се додатно расветлио молекулски механизам активације TLR4, HEK293 ћелије трансфектоване плазмидом који кодира хумани TLR4 са с-Мус тагом на N-терминалном домену третиране су активним и Act d 1 инхибираним у присуству 100 μM E64. У имуноблоту узорака третираних активним Act d 1 показан је пад сигнала с-Мус тага у поређењу са нетретираним ћелијама. Ово смањење није забележено након третмана инактивираним алергеном. Додатно, третман HEK293 ћелија које експримирају TLR4 Δ1-563 конструкт, са 1 mg/mL Act d 1 и 100 ng/mL LPS, није довео до додатног повећања NF-κB активације нити производње IL-8 у поређењу са нетретираним ћелијама. Улога протеолитичке активности је потврђена и у THP-1 макрофагима, где је уочено смањење синтезе проинфламаторних цитокина IL-6 и IL-1β, као и смањење активности каталазе у ћелијама, након инхибиције овог алергена у присуству E64.

У циљу процене утицаја малих молекула на проинфламаторни ефекат LPS и Act d 1 и на активацију NF-κB, успостављен је стабилан модел систем макрофага добијених диференцијацијом THP-1 моноцита. За оптимизацију поступка диференцијације примењени су различити периоди инкубације ћелија у медијуму који садржи PMA (100 ng/mL) и одмора у медијуму који не садржи PMA. Микроскопија је показала да продужавање времена одмора у преко 48 сати доводи до значајног повећања површине ћелије, без обзира на дужину периода диференцијације у медијуму са PMA. Површина ћелијских нуклеуса након бојења DAPI-јем пратила је исти тренд временски зависног повећања у медијуму без PMA. Осим тога, забележен је пад концентрације редукованог глутатиона (GSH) независно од дужине периода (24 - 72 h) диференцијације са PMA, што је у корелацији са његовим проинфламаторним својством, а продужено време одмора у медијуму без PMA благо је повећало садржај GSH.

На основу добијених резултата, оптимална диференцијација THP-1 моноцита у макрофаге постигнута је након 48 h инкубације у медијуму са 100 ng/mL PMA, праћене са 72 h инкубације у медијуму без PMA. Овако диференцирани макрофаги су анализирани проточном цитометријом, где је показано повећање експресије површинских маркера који се повезују са правилном функцијом макрофага, укључујући CD54 (ICAM-1) и CD86 (B7).

Проценат CD54⁺ и CD86⁺ ћелија значајно се повећао након диференцијације, где је проценат CD54⁺ ћелија био и преко 80%. На овако диференцираним макрофагима, утврђено је да третман Act d 1 (1 mg/mL) или LPS-ом (100 ng/mL) у трајању од 6 сати изазива изражен проинфламаторни ефекат. Уочено је и значајно повећање експресије *IL-1 β* , *IL-25* и *TNF*, при чему експресија *IL-1 β* и *TNF* достиже максимум након 3 сата, док се експресија *IL-25* постепено повећава и достиже највиши ниво након 12 сати.

Потенцијал одабраних малих молекула да утичу на продукцију и генску експресију проинфламаторних цитокина тестиран је *in vitro* у различитим ћелијским линијама. Генска експресија је праћена PCR методом. Експресија гена за цитокине *IL-1 β* , *IL-25* и *TNF* анализирана је након третмана ћелија са ванилил алкохолом (ВА) и лауринском киселином (ЛА) у концентрацијама од 5 и 25 μ M. У THP-1 макрофагима није уочено значајно повећање експресије цитокина, док је у HEK293 и Сасо-2 ћелијама забележено смањење њихове експресије, указујући на потенцијални антиинфламаторни ефекат ових молекула. Да би се испитао антиинфламаторни ефекат ВА и ЛА, ћелије су третиране LPS-ом или Act d 1, без или након претретмана овим молекулима. У THP-1 макрофагима ВА, у обе концентрације, је смањио експресију *IL-1 β* , *IL-25* и *TNF* изазвану третманима Act d 1 и LPS-ом, док је претретман са ЛА смањио експресију *IL-25* након примене оба проинфламаторна стимулуса. У HEK293 ћелијама, Act d 1 је повећао експресију *IL-1 β* и *IL-25*, али не и *TNF*, уз антиинфламаторни ефекат примећен након претретмана са ЛА. И код LPS- и код Act d 1-стимулисаних Сасо-2 ћелија више концентрације ВА и ЛА су довеле до смањења експресије *IL-1 β* и *TNF*, док је експресија *IL-25* била је значајно смањена након третмана са нижом концентрацијом ЛА. Ефекат претретмана малим молекулима на продукцију проинфламаторних цитокина *IL-1 β* и *IL-6* процењен је ELISA методом у супернатантима THP-1 макрофага. Након третмана са Act d 1 и LPS дошло је до пораста концентрације оба цитокина, при чему је LPS изазвао већи одговор. Претретман са 25 μ M ванилина (ВН) смањио је продукцију *IL-1 β* у оба модела, док су сви молекули смањили продукцију *IL-6* након Act d 1 третмана, а само ванилил-лаурат (ВЛ) и ванилин (ВН) у већој концентрацији након LPS третмана.

Како су LPS и Act d 1 показани активатори NF- κ B пута, испитан је утицај малих молекула на његову активацију и експресију p65 субјединице у различитим моделима. У HEK293 ћелијама стабилно трансфектованим NF- κ B-GFP плазмидом, флуоресцентна микроскопија и проточна цитометрија су показале да ВА и ЛА (25 μ M) значајно инхибирају Act d 1-посредовану активацију NF- κ B. У THP-1 макрофагима, након трансфекције NanoLuc® репортер вектором, Act d 1 је повећао NF- κ B активност, а претретман са ВН смањио ју је до нивоа контроле. При имуноблот анализи експресије p65 у THP-1 макрофагима након Act d 1 нису уочене одговарајуће траке, вероватно услед негативног утицаја протеолитичке активности. Међутим, према резултатима имуноблота, LPS је изазвао повећање експресије p65, која је опадала услед претретмана ВА и ЛА. ELISA анализа нуклеарне транслокације p65 показала је да Act d 1 и LPS повећавају његов ниво у нуклеусу, док су ВА и ЛА значајно смањили ову транслокацију након третмана LPS-ом.

Ради анализе фенотипа THP-1 ћелија, проточном цитометријом испитивана је експресија M1 и M2 површинских маркера коришћењем одговарајућих флуоресцентно обележених антитела. Act d 1 је изазвао повећање експресије M1 маркера CD80 код преко 40% макрофага, показујући јачи ефекат од LPS-а, док је претретман са BH (25 μ M) значајно смањio ову експресију. Експресије CD86 и M2 маркера CD206 и CD163 нису биле значајно измењене, указујући на доминантну M1 поларизацију макрофага након Act d 1 третмана.

Како би се проценио антиоксидативни ефекат одабраних малих молекула, коришћени су THP-1 макрофаги третирани Act d 1 и LPS-ом. Оба третмана су довела до повећања активности каталазе и смањења концентрације редукованог глутатиона (GSH) у ћелијским лизатима, указујући на повећано прооксидативно стање, док су претретмани ванилоидима благо смањили активност каталазе и повећали ниво GSH, иако без статистичке значајности. Повећана производња реактивних кисеоничних врста (ROS) у THP-1 макрофагима након додатка DCFH-DA пробе, изазвана је Act d 1 и LPS-ом и потврђена је спектрофлуориметријском детекцијом. Претретман са BH и ВЛ је значајно смањio производњу ROS, посебно након третмана са Act d 1. За праћење експресије *i*NOS коришћена је qPCR метода. Експресија је значајно повећана након третмана стимулусима, док је претретман са свим ванилоидима смањio експресију *i*NOS, указујући на антиоксидативни ефекат. Концентрација NO, праћена колориметриским есејом, порасла је након Act d 1 третмана, а ВЛ и BH (5 μ M) статистички су значајно смањили ниво NO. Након третмана LPS-ом није уочен значајан пораст NO, вероватно због ниске концентрације LPS-а или је осетљивост методе била ограничење. Резултати свих анализираних параметара оксидативног стреса су потврдили антиоксидативно дејство тестираних малих молекула.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Инфламација представља основни механизам преживљавања организма, али прекомерна активност и продукција проинфламаторних медијатора може довести до оштећења ткива и развоја различитих инфламаторних болести. Због тога су антиинфламаторни молекули предмет интензивних истраживања као потенцијални терапеутски агенси¹. NF- κ B је кључни транскрипциони фактор у регулацији инфламаторних процеса, урођене и адаптивне имуности, и укључен је у патогенези разних обољења, као што су аутоимунске болести, алергије, и разна хронична запаљења¹.

Један од циљева ове дисертације био је молекулска карактеризација проинфламаторног ефекта алергена Act d 1 из зеленог кивија и његов механизам активације NF- κ B, уз испитивање ефеката одабраних биоактивних малих молекула на активност NF- κ B и последице настале активацијом овог сигналног пута. Досадашња истраживања потврђују снажан проинфламаторни ефекат алергена Act d 1 у епителним ћелијама *in vitro*, као и у *in vivo* мишјим моделима^{2,3}. Међутим, његов ефекат на ћелије имунског система није испитиван. У овој дисертацији показано је да Act d 1 изазива снажан проинфламаторни одговор у мишјим макрофагима, са концентрационо-зависном продукцијом TNF и IL-6,

без цитотоксичних ефеката, при чему је део одговора посредован NF-κB активацијом и TLR4-зависним механизмима. Према добијеним резултатима, активација NF-κB и продукција IL-6 су у потпуности зависни од присуства TLR4, док је производња TNF само делимично регулисана овим рецептором и претпоставља се да може бити регулисан и активацијом алтернативних рецептора. Поред активације NF-κB, Act d 1 је показао и способност активације IFNβ на концентрационо-зависан начин, чиме се потврђује његова способност да активира оба TLR4-посредована сигнална пута. Препознавање LPS-а од стране TLR4 се постиже везивањем лиганда за хидрофобни џеп унутар рецептора⁴, а специфичне мутације унутар TLR4 повезане су са смањеним или потпуним одсуством одговора на LPS⁵. Резултати ове дисертације су потврдиле да TLR4 мутант F463A задржава способност одговора на Act d 1, указујући на кључну разлику у механизму активације овог рецептора у односу на LPS. Потенцијално, активација TLR4 у присуству Act d 1 се не заснива искључиво на класичној интеракцији лиганд-рецептор, већ укључује и протеолитичку модификацију самог рецептора.

Многи алергени поседују специфична својства која им омогућавају да директно подстичу инфламаторне процесе у организму, а једно од најзначајнијих својстава је њихова протеолитичка активност⁶. Протеазна својства су показана и код других алергена (нпр. Der p 1 из кућне прашине) и испитана је њихова кључна улога у изазивању проалергених ефеката. Слична својства поседују и ензими из хране, као што су папаин из папаје и актиндин из кивија⁷⁻⁹. Значај протеолитичке активности актинидина примећен је у контексту нарушавања епителне баријере, деградације протеина чврстих веза и подстицања производње проалергених и проинфламаторних цитокина^{3,10,11}. У овом раду, инхибицијом протеазне активности Act d 1 топлотом и цистеин протеазним инхибитором E64, је показано да је протеолитичка активност Act d 1 кључна за активацију TLR4. Алерген чија је протеазна активност била инхибирана је имао значајно мањи утицај на активацију NF-κB и производњу цитокина IL-8, IL-6 и IL-1β. Ови резултати указују на могућност да Act d 1 може директно изазвати протеолизу специфичних делова ектодомена TLR4 чиме се постиже спонтана димеризација рецептора и последична активација сигналних путева који укључују NF-κB и IFNβ промоторе. Експерименти који показују да третман Act d 1 смањује нивое детектованог с-Мус-тагованог TLR4, осим када је његова протеазна активност блокирана присуством E64 инхибитора, додатно подржавају овај закључак. Такође, Act d 1 не може додатно повећати активност NF-κB код већ скраћеног TLR4 конструкта (TLR4 Δ1-563), коме недостаје већина ектодомена¹². Резултати из првог дела ове докторске дисертације, показују да цистеин протеаза Act d 1 изазива снажан проинфламаторни одговор зависан од присуства TLR4 који доводи до активације NF-κB. Примећени ефекти су директно повезани са протеолитичком активношћу овог алергена, који активира TLR4 неконвенционалним механизмом, протеолизом његовог ектодомена.

Макрофаги као ћелије урођеног имунског система играју кључну улогу у одржавању хомеостазе ткива и у процесу запаљења, кроз експресију цитокина и површинских рецептора који појачавају имунски одговор¹³. Због ограничене доступности примарних хуманих макрофага, њихове варијабилности између донора и етичких изазова, често се користе *in vitro* ћелијске линије као што је THP-1 ћелијска линија моноцита¹⁴. Иако често

коришћене, протокол за диференцијацију ових макрофага није стандардизован у литератури и значајно варира. У овој дисертацији оптимизован је протокол диференцијације ТНР-1 моноцита у макрофаге са 100 ng/mL РМА, при чему је оптимално време диференцијације 48 h у медијуму који садржи РМА и 72 h одмора у медијуму без РМА. Овај третман је довео до формирања стабилних, морфолошки потпуних макрофага са уравнотеженим односом величине нуклеуса и ћелије и стабилним нивоом редукованог глутатиона. Овако диференцирани макрофаги су показали одговарајући проинфламаторни одговор на LPS и алерген Act d 1, који карактерише повећање експресије *IL-1 β* , *TNF* и *IL-25* и површинских маркера CD86 и CD54. Ови резултати потврђују способност ТНР-1 макрофага да се додатно поларизују као одговор на различите стимулусе, мењајући фенотип и експресију цитокина, и указују да су ТНР-1 макрофаги поуздан модел систем погодан за испитивање имуномодулаторних ефеката¹⁴.

Након утврђивања механизма активирања NF- κ B од стране алергена Act d 1, он је коришћен заједно са LPS-ом као стимулус за третман ТНР-1 макрофага и епителних ћелија, како би се развио модел инфламације за испитивање имуномодулаторних ефеката малих молекула из групе ванилоида. Испитивани ВА и ЛА нису показали проинфламаторни или цитотоксични ефекат на НЕК293, Сасо-2 и ТНР-1 ћелијама. Оба молекула су показала селективан имуномодулаторни ефекат на генску експресију проинфламаторних цитокина у овим ћелијским линијама. Оба молекула су успешно инхибирала NF- κ B активност у НЕК293 ћелијама и смањила укупну експресију p65у ТНР-1 макрофагима. Посматрајући само количину активираних p65 компоненте, примећено је да ВА показује бољи инхибиторни ефекат. Ово запажање је у складу са примећеним ефектом ЛА на нивое цитокина и претходних истраживања који показују да поједини алергени хране могу реаговати са малим молекулима као што су масне киселине, што даље утиче на процес препознавања алергена од стране ћелијских рецептора¹⁵.

Додатно, на основу добијених резултата са ВА и ЛА, детаљније је испитана имуномодулаторна улога молекула из групе ванилоида на ТНР-1 макрофагима. Поред ВА, коришћени су и ВН и ВЛ. Act d 1 и LPS подстичу поларизацију макрофага ка М1 фенотипу који карактерише повећање експресије CD80 и продукција проинфламаторних цитокина (*IL-1 β* и *IL-6*)¹⁶. Тестирани ванилоиди, посебно ВН, смањили су експресију CD80 и продукцију *IL-6*, а ВН је такође редуковао *IL-1 β* у Act d 1-третираним макрофагима. Показано је и да ефекти ванилоида нису последица директне инхибиције Act d 1, већ њихових имуномодулаторних својстава. Луциферазни репортер тест потврдио је да ВН инхибира NF- κ B активност у макрофагима стимулираним Act d 1. Поларизација макрофага у процесу инфламације је веома сложен процес на који утичу различити фактори¹⁷. Ови резултати указују да ванилоиди могу делимично ублажити М1 инфламаторни одговор и синтезу проинфламаторних цитокина, али њихова способност да потпуно блокирају М1 поларизацију је ограничена. Подаци у литератури показују да ванилоиди могу деловати преко TRPV1 рецептора, чија експресија варира између типова ћелија, што би могло да објасни примећене разлике у ефекту ових молекула на различитим ћелијским линијама^{18,19}.

Померај макрофага ка M1 проинфламаторном фенотипу повезан је са повећаним оксидативним стресом¹⁶. Након третмана Act d 1, у THP-1 макрофагима су забележена повећања продукције ROS и NO и активности каталазе, уз смањење нивоа GSH. LPS третман је изазвао сличан пораст ROS и каталазе. Претретман са ванилоидима ВЛ и ВН значајно је смањио производњу ROS и NO, доводећи их до базалног нивоа, као и експресију *iNOS*, кључног ензима M1 фенотипа, потврђујући имуномодулаторни ефекат ових молекула. Иако ванилоиди ефикасно ублажавају оксидативни стрес, њихов утицај варира зависно од анализираног параметра. Ови резултати указују да ванилоиди могу сузбити оксидативни стрес изазван проинфламаторним стимулусима, доприносећи ограничавању M1 поларизације макрофага и смањењу проинфламаторног одговора.

THP-1 макрофаги су се показали као поуздан модел систем ћелија урођеног имунског система, а биоактивни мали молекули из групе ванилоида су показали потенцијал за ублажавање алергијских и инфламаторних процеса посредованих активацијом NF-κB. Иако молекулски механизми активације NF-κB сигналног пута актинидиног и LPS-ом деле поједине сличности, пре свега у активацији TLR4, постоји и значајна разлика. Ова разлика се преноси и на ефекат малих молекула у инхибицији проинфламаторног одговора, где се јасно уочава разлика у способности да утичу на неке од специфичних параметара анализираних у овој дисертацији. Биоактивни мали молекули који су предмет истраживања овог рада су показали значајан ефекат у контексту ублажавања алергијских и инфламаторних процеса али би даља истраживања, укључујући валидацију у животињским моделима, допринела бољем разумевању њихових механизма.

Референце:

1. Gasparini, C. & Feldmann, M. NF-κB as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr Pharm Des* **18**, 5735–5745 (2012).
2. Nešić, A. *et al.* The kiwifruit allergen act d 1 activates NF-κB signaling and affects mRNA expression of TJ proteins and innate pro-allergenic cytokines. *Biomolecules* **9**, (2019).
3. Cavic, M. *et al.* The effect of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cysteine protease actinidin on the occludin tight junction network in T84 intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* **72**, 61–68 (2014).
4. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
5. Arbour, N. C. *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Gene* **25**, 187–191 (2000).
6. Soh, W. T. *et al.* Protease allergens as initiators–regulators of allergic inflammation. *Allergy* **78**, 1148–1168 (2023).
7. 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* **136**, 1523–1525 (2016).

8. Cayrol, C. *et al.* Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nature Immunology* **19**, 375–385 (2018).
9. 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* **142**, 398–400 (2018).
10. Grozdanovic, M. M. *et al.* Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *BiochimBiophysActa Gen Subj* **1860**, 516–526 (2016).
11. Nešić, A. *et al.* Activation of epithelial cells by the major kiwifruit allergen Act d 1 in human and mouse-derived intestinal model. *J Funct Foods* **62**, 103556 (2019).
12. Panter, G. & Jerala, R. The ectodomain of the toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 23334–23344 (2011).
13. Ariel, A., Maridonneau-Parini, I., Rovere-Querini, P., Levine, J. S. & Mühl, H. Macrophages in inflammation and its resolution. *Front Immunol* **3**, 37814 (2012).
14. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* **23**, 37–45 (2014).
15. Chruszcz, M. *et al.* Allergens and their associated small molecule ligands—their dual role in sensitization. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **76**, 2367–2382 (2021), preprint at <https://doi.org/10.1111/all.14861>
16. Luo, M., Zhao, F., Cheng, H., Su, M. & Wang, Y. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Front Immunol* **15**, 1352946 (2024).
17. Forrester, M. A. *et al.* Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol* **332**, 58–76 (2018).
18. Bujak, J. K., Kosmala, D., Szopa, I. M., Majchrzak, K. & Bednarczyk, P. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Front Oncol* **9**, 1087 (2019).
19. Andrei, C., Zanzfirescu, 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* **12**, 339 (2023).

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације су проистекле следеће публикације:

Радови:

1) Међународни часопис изузетних вредности (M21a)

- Zlatanova, M., Grubač, J., Trbojević-Ivić, J., Gavrović-Jankulović, M. (2025). Phenotypic Changes and Oxidative Stress in THP-1 Macrophages in Response to Vanilloids Following Stimulation with Allergen Act d 1 and LPS. *Antioxidants*, 14(8), 949. <https://doi.org/10.3390/antiox14080949>, (IF 6.6, (2024))

2) Врхунски међународни часопис (M21)

- Zlatanova, M., Nešić, A., Trbojević-Ivić, J., Četić, D., Gavrović-Jankulović, M. (2024). Targeting NF-κB signaling: selected small molecules downregulate Pro-Inflammatory cytokines in both food allergen and LPS-Induced inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5798. <https://doi.org/10.3390/ijms25115798>, (IF 5.6, (2022))

Саопштења:

1) Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

- **Zlatanova M.**, Hafner-Bratković I., Gavrović-Jankulović M., “Proteolytically active Act d 1 induces TLR4-dependent pro-inflammatory response”, Book of Abstracts of the FEBS3+ Meeting: “Advances in Molecular Biosciences: From Genes to Personalized Therapies”, September 2025, Belgrade, Serbia.
- **Zlatanova M.**, Trbojević-Ivić J., Gavrović-Jankulović M., “Modulation of NF-κB mediated inflammation via inhibition of p65 translocation”, Book of Abstracts of the 47th FEBS Congress: “Together in bioscience for a better future”, SpT-02.2-4, July 2023, Tours, France.
- **Zlatanova M.**, Gavrović-Jankulović M., “Food allergen Act d 1 promotes inflammation and antigen uptake in macrophages in vitro”, Book of Oral Presentations of the FEBS Advanced Course: „360 degrees Lysosome: from Structure to Genomics, from Function to Disease“, p. 47-48, October 2022, Kusadasi/Izmir, Turkey.
- **Zlatanova M.**, Trbojević-Ivić J., Gavrović-Jankulović M., “Attenuation of the NF-κB mediated proinflammatory effect of kiwifruit cysteine protease Act d 1”, Book of Abstracts of the FEBS ICGEB Advanced Course: “Proteolysis, at the interface between health and disease”, p-73, September 2022, Bled, Slovenia.
- **Zlatanova M.**, Trbojević-Ivić J., Gavrović-Jankulović M., “Pro-inflammatory effect of kiwifruit allergen on THP-1 derived macrophages and its inhibition”, Book of Abstracts of the 11th SBS Conference: “Amazing Biochemistry“, p-160, September 2022, Novi Sad, Serbia.

1) Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

- **Zlatanova M.**, Nešić A., Trbojević-Ivić J., Gavrović-Jankulović M., “Small molecules attenuate activation of the NF-κB signalling in epithelial cells by Act d 1 kiwifruit allergen”, Book of Abstracts of the 10th SBS Conference: “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms“, p-186, September 2021, Kragujevac, Serbia.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је урађена провера оригиналности докторске дисертације под насловом „Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система“, аутора **Милене О. Златанове**, констатујемо да утврђено подударанье текста износи **13%**. Добијени степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Стога сматрамо да је ова докторска дисертација у потпуности оригинална и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу приказаних података и резултата, Комисија закључује да је у поднетој дисертацији под називом „Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система“ кандидаткиња Милена О. Златанова успешно одговорила на задате циљеве. У оквиру ове докторске дисертације, окарактерисан је молекулски механизам активације NF-κB сигналног пута од стране цистеин протеазног алергена актинидина. Испитивана је улога TLR4 и значај протеолитичке активности актинидина приликом изазивања проинфламаторног одговора у ћелијама урођеног имунског система. На основу добијених резултата предложен је механизам којим актинидин активира NF-κB на TLR4-зависан начин, не класичном интеракцијом лиганд-рецептор већ неконвенционалним механизмом директно зависним од протеолитичке активности актинидина, протеолизом ектодомена TLR4. Додатно, успостављен је и протокол за диференцијацију THP-1 моноцита у макрофаге у присуству РМА, и потврђен је значај времена одмора у медијуму без РМА за постизање очекиваних морфолошких карактеристика макрофага. Присуство специфичних површинских маркера на добијеним макрофагима и њихова способност да одговарају на стимулусе су детаљно испитани. Имуномодулаторни потенцијал ванилил алкохола и лауринске киселине, као представника две класе малих молекула, је испитиван у три различите ћелијске линије, НЕК293, Сасо2 и THP-1. Иако су примећене разлике у инхибицији генске експресије проинфламаторних цитокина након стимулације Act d 1 и LPS-ом, и ванилил алкохол и лауринска киселина су успешно инхибирали активацију NF-κB, као и експресију и транслокацију p65 компоненте у нуклеус. Како је ванилил алкохол показао бољи имуномодулаторни потенцијал, панел малих молекула је проширен са фокусом на ванилоиде, додатком ванилил-лаурата и ванилина. У THP-1 макрофагима, ванилоиди су успешно инхибирали синтезу проинфламаторних цитокина, смањивали параметре оксидативног стреса и активацију NF-κB. Након свеобухватне анализе, посебно је издвојен ванилин, као молекул са највећим имуномодулаторним потенцијалом, који има способност да инхибира активацију NF-κB сигналног пута, поларизацију макрофага у M1

фенотип, оксидативни стрес и продукцију проинфламаторних цитокина након стимулације различитим проинфламаторним стимулусима.

Резултати научно-истраживачког рада проистеклог из израде ове докторске дисертације су објављени у два научна рада категорија M21a и M21, и саопштени на 6 скупова, од којих су 5 међународног а један националног значаја. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Милене О. Златанове, под насловом „Модулација малим молекулима инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, _____

КОМИСИЈА

Др Тања Ћирковић-Величковић, редовни професор

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Редовни члан САНУ

Др Милица Поповић, ванредни професор

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Др Маријана Стојановић, научни саветник

Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Институт од националног значаја за Републику Србију,

Универзитет у Београду