

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET**

Milena V. Veljković

**NIVO ANTI-VIP/GP120 ANTITELA KOD
AKTIVNIH SPORTISTA, PACIJENATA
SA MALIGNIM BOLESTIMA I
PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM
DOKTORSKA DISERTACIJA**

Beograd, 2013. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Milena V. Veljković

**ANTI-VIP/GP120 ANTIBODIES IN
ATHLETES, CANCER PATIENTS AND
PATIENTS WITH HIV INFECTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor

dr Violeta Dopsaj, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

dr Nevena Arsenović Ranin, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet

dr Đorđe Jevtović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem

Profesorki Violeti Dopsaj koja mi je omogućila da kroz izradu ove doktorske disertacije usavršim svoje veštine i koja je nesebičnom ljubavlju učinila da moje doktorske studije budu jedno dragoceno životno iskustvo.

Koleginici Brankici Gulan koja je svojim velikim iskustvom i zalaganjem doprinela da se mnogi problemi sa kojima sam se susretala tokom izrade teze sa lakoćom reše.

Profesoru Milivoju Dopsaj sa Fakulteta sporta i fizičke kulture na odabiru sportista i prikupljenim uzorcima.

Članovima komisije Prof. Neveni Arsenović Ranin i Prof. Đorđu Jevtoviću na strpljenju i sugestijama tokom izrade doktorske disertacije.

Kolegama Maji Jovović, Jeleni Martinović i Nadi Vasiljević, koje su mi obezbedile sve potrebne uslove za izradu eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

Koleginici Ani Đorđević-Vujičić na divnom druženju i nesebičnoj podršci pravog prijatelja.

Mojim roditeljima i porodici koji su bili moja inspiracija, najstroža kritika i najtoplija podrška.

NIVO ANTI-VIP/GP120 ANTITELA KOD AKTIVNIH SPORTISTA, PACIJENATA SA MALIGNIM BOLESTIMA I PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM

Rezime

Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) ima brojne biološke uloge u organizmu, deluje kao imunomodulator, vazodilatator, bronhodilatator, neurotransmiter i regulator genske ekspresije. VIP takođe ima važnu ulogu u kancerogenezi malignih oboljenja, jer deluje kao faktor rasta za ćelije karcinoma dojke i prostate, koje na svojoj površini eksprimiraju veliki broj VPAC1 receptora. Obzirom na učešće VIP-a u brojnim biohemijskim procesima u organizmu, njegov nivo u cirkulaciji je pod strogom fiziološkom kontrolom, koja se ostvarje posredstvom prirodnih anti-VIP autoantitela.

Ustanovljeno je da pacijenti inficirani HIV-om imaju povišen nivo neutrališućih anti-VIP/gp120 antitela u asimptomatskoj fazi bolesti. Anti-VIP/gp120 antitela usporavaju progresiju sindroma stečene imunodeficijencije (SIDE) i predstavljaju poslednju liniju odbrane organizma u HIV infekciji. NTM peptid iz konzerviranog C2 domena glikoproteina gp120 HIV virusa sadrži epitop koji vezuje anti-VIP/gp120 antitela i ima visok stepen strukturne i informacione sličnosti sa VIP-om. NTM sadrži aminokiselinski motiv FTD (Phe-Thr-Asp), koji je uključen u direktnu interakciju VIP-a sa VPAC1 receptorima. Ovaj domen glikoproteina gp120 ima strukturnu sličnost i sa drugim humanim proteinima uključujući i imunoglobuline, zbog čega ga imuni sistem prepoznaje kao sopstveni antigen. Molekularna mimikrija između glikoproteina gp120 i ljudskih proteina osnovna je prepreka u dizajniranju vakcine, koja bi omogućila povećanu produkciju anti-VIP/gp120 antitela. Fizička aktivnost povećava nivo VIP-a u cirkulaciji, što za posledicu ima i porast anti-VIP/gp120 antitela i predstavlja jedini stimulans za produkciju ovih prirodnih autoantitela.

Populacione i kliničke studije potvrdile su pozitivne efekte, koje fizička aktivnost ima u prevenciji nastanka tumora dojke i prostate, ali i u sprečavanju pojave recidiva u fazi remisije bolesti. Molekularni mehanizmi na kojima se zasniva protektivno delovanje fizičke aktivnosti još uvek su nepoznati. Polazeći

od činjenice da profesionalni sportisti i osobe inficirane HIV-om, kod kojih je nivo anti-VIP/gp120 antitela povišen, imaju smanjen rizik od nastanka karcinoma dojke i prostate u poređenju sa opštom populacijom, može se pretpostaviti da ova antitela igraju značajnu ulogu u prevenciji ovih bolesti.

Određivanje anti-VIP/gp120 antitela pre i 30 minuta nakon fizičke aktivnosti u grupi vaterpolista, potvrdilo je da fizička aktivnost dovodi do porasta anti-VIP/gp120 antitela. Sa druge strane pokazano je da aktivni sportisti imaju statistički značajno viši nivo anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na zdravu fizički neaktivnu populaciju. Za detekciju anti-VIP/gp120 antitela korišćen je NTM1 peptid. Ovaj peptid sačinjen od 8 aminokiselina, znatno je kraći od ranije korišćenog NTM peptida za detekciju anti-VIP/gp120 antitela i predstavlja najmanji segment strukturne i informacione sličnosti između VIP-a i NTM peptida.

Ranija istraživanja su pokazala da je za direktnu interakciju VIP-a sa VPAC1 receptorom odgovoran FTD motiv, koji se nalazi unutar NTM1 peptida za koga se vezuju neutrališuća anti-VIP/gp120 antitela. Navedeni podaci sugerišu da su anti-VIP/gp120 antitela antagonisti VPAC1 recetora i predstavljaju važnu kariku između fizičke aktivnosti i prevencije nastanka karcinoma dojke i prostate, na koju ukazuju brojne kliničke i epidemiološke studije. Određivanje anti-VIP/gp120 antitela u grupi pacijenata obolelih od karcinoma dojke i prostate, potvrdilo je da postoji snižen nivo anti-VIP/gp120 antitela kod ove grupe pacijenata, što potencira delovanje VIP-a kao faktora rasta i proangiogenog faktora u ovim malignim bolestima.

Istraživanje prikazano u ovom radu nedvosmisleno ukazuje da fizička aktivnost dovodi do porasta anti-VIP/gp120 antitela, kao i da aktivni sportisti imaju statistički značajno viši nivo anti-VIP/gp120 antitela u cirkulaciji u odnosu na zdravu fizički neaktivnu populaciju. Takođe, potvrđeni su rezultati ranijih istraživanja prema kojima HIV pozitivni pacijenti imaju povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela, ali i da se epitop za ova prirodna autoantitela nalazi unutar NTM1 peptida.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da fizičko vežbanje predstavlja prirodan, neškodljiv i svima dostupan način prevencije karcinoma dojke i prostate. Istovremeno vežbanje treba da bude sastavni deo

terapije HIV pozitivnih pacijenata u cilju poboljšanja kvaliteta života i usporavanja progresije bolesti.

Ključne reči: Anti-VIP/gp120 antitela, vazoaktivni intestinalni peptid, fizička aktivnost, prevencija, karcinom dojke, karcinom prostate, HIV infekcija.

Naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 616-097 : 796.071.2 (043.3)

616-006.041 : 616.98 : 578.828 (043.3)

ANTI-VIP/GP120 ANTIBODIES IN ATHLETES, CANCER PATIENTS AND PATIENTS WITH HIV INFECTION

Abstract

VIP is pleiotropic peptide exerting a wide range of biological activities, such as pulmonary and coronary vasodilatation, bronchodilation, anti-inflammatory effects, immunomodulatory effects and regulation of gene expression. Also, VIP plays an *important* role in pathogenesis of *breast* and *prostate cancer* acting as an autocrine growth factor which up regulates the expression of vascular endothelial cell growth factor in cancer cells, carrying a large number of VPAC₁ receptors on the cell surface. Involvement of VIP in numerous biochemical processes in the organism requires strong control of its level in the circulation, which is performed by natural anti-VIP antibodies. Therefore, it is reasonable to expect that the natural autoantibodies controlling VIP have an important protective role against breast and prostate cancer.

Increased level of neutralizing anti-VIP/gp120 antibodies has been documented in HIV patients in its asymptomatic phase of disease. The studies indicate that anti-VIP/gp120 antibodies slow down AIDS progression and represent the last line of defense against the disease progression. The anti-VIP/gp120 antibodies bind to NTM peptide from the conserved C2 domain of the HIV glycoprotein gp120. The NTM peptide has high level of structural and informational similarities with VIP and encompasses the structural motif FTD (Phe-Thr-Asp), which is involved in direct interaction between VIP and VPAC₁ receptor. Due to structural similarity between the C2 domain of the glycoprotein gp120 and other human proteins, including immunoglobulins, the immune system recognizes it as a self antigen. As a result of this molecular mimicry between the gp120 and host proteins, anti-VIP/gp120 antibodies cannot be induced with vaccination. The physical activity elicits anti-VIP/gp120 antibodies by increasing the level of VIP in circulation and therefore, represents the unique stimulus for production of these natural autoantibodies.

Epidemiological and clinical studies confirmed positive effects of physical activity in prevention of breast and prostate cancer. Molecular mechanisms involved in protective role of physical activity are still elusive. Nevertheless, the

fact that professional athletes and HIV-infected patients with increased level of anti-VIP/gp120 antibodies have lower incidence of breast and prostate cancer comparing to general population, indicates that these antibodies have significant role in prevention of these diseases.

Investigation of the level of anti-VIP/gp120 antibodies 30 minutes after physical activity in the group of waterpolo players showed increase in level of these antibodies due to the physical activity. Also, it has been demonstrated that active athletes have significantly higher level of anti-VIP/gp120 antibodies comparing to healthy physically inactive population. For investigation of the level of anti-VIP/gp120 antibodies in serum, the ELISA immuno assay based on NTM1 peptide was developed. NTM1 peptide, encompassing only 8 residues, is significantly shorter than previously used NTM peptide and represents its shortest segment resembling structural and informational properties of VIP.

Earlier studies showed that FTD sequence is involved in direct interaction between VIP and VPAC1 receptor. This sequence is located within the epitope of neutralizing anti-VIP/gp120 antibodies in NTM1 peptide. This suggests that anti-VIP/gp120 antibodies act as antagonists of VPAC1 receptor and represents important link between physical activity and prevention of breast and prostate cancer. Determination of the level of anti-VIP/gp120 antibodies in the group of patients with breast and prostate cancer showed decrease in level of anti-VIP/gp120 antibodies in this group of patients. This suggests that VIP acts as a growth factor, as well as proangiogenog factor in tumor cells binding to VPAC1 receptors which are expressed on their surface.

Results of this study unequivocally show that physical activity leads to increase in the level of anti-VIP/gp120 antibodies and that active athletes have significantly higher level of these natural antibodies in comparison to healthy, physically inactive, population. Also, results of previous studies demonstrating an increased level of anti-VIP/gp120 antibodies in HIV patients and interaction between these natural antibodies with NTM1 peptide, have been confirmed.

Based on the results presented in this study, it can be concluded that physical exercise represents natural, safe and widely available prevention for breast and prostate cancer and also that physical exercise should be integrated as a part of therapy for HIV patients, which could slow-down of disease progression and improves the general life quality of patient.

Keywords: anti-VIP/gp120 antibodies, *vasoactive intestinal polypeptide*, physical exercise, prevention, *breast cancer*, *prostate cancer*, *HIV infection*.

Scientific field: *Medical biochemistry*

UDC number: 616-097 : 796.071.2 (043.3)

616-006.041 : 616.98 : 578.828 (043.3)

SKRAĆENICE

ADP - adenzin difosfat (engl. adenosine diphosphate, ADP)

ATCH - adenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone, ATCH*)

ATP - adenzin trifosfat (engl. adenosine-5'-triphosphate, ATP)

BMI - indeks telesne težine (engl. *body mass index, BMI*)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin, BSA*)

cAMP - ciklični adenzinmonofosfat (engl. cyclic adenosine monophosphate, cAMP)

CCR5 - C-C hemokinski receptor tip 5 (engl. C-C chemokine receptor type 5, CCR5)

CD - klaster diferencijacija (engl. cluster of differentiation, CD)

cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina (engl. complementary DNA, cDNA)

COX - ciklooksigenaza (engl. cyclooxygenase, COX)

CXCR4 - C-X-C hemokinski receptor tip 4 (engl. C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)

CV - koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation, CV*)

DHEA - dehidroepiandrosteron (engl. dehydroepiandrosterone, DHEA)

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor, EGFR*)

ELISA - enzimski imunosorbent test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

FTD motiv - niz aminokiselina Phe-Thr-Asp

HAART - visoko aktivna antiretrovirusna terapija (engl. highly active antiretroviral therapy, HAART)

HER2 - receptor humanog epidermalnog faktora rasta (engl. human epidermal growth factor receptor 2, HER2)

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus, HIV*)

IL - interleukin (engl. interleukin, IL)

ISM - metod informacionih spektara (engl. *informational spectrum method, ISM*)

LTNP - spori progresori (engl. *Long-term nonprogressors, LTNP*)

O.D. - optička gustina (engl. *optical density, O.D.*)

PKA - protein kinaza A (engl. *protein kinase A, PKA*)

RNK - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid, RNA*)

SIDA - sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome, AIDS*)

SOC - sekvencijalni oligopeptidni nosač (engl. *sequential oligopeptide carriers, SOC*)

TNF - tumor nekroza faktor (engl. *tumor necrosis factors*)

VEGF - vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*)

VIP - vazoaktivni intestinalni peptid (engl. *vasoactive intestinal peptide, VIP*)

VPAC - receptor za vazoaktivni intestinalni peptid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Vazoaktivni intestinalni peptid	1
1.1.1. Receptori vazoaktivnog intestinalnog peptida	2
1.1.2. Uloge vazoaktivnog intestinalnog peptida u imunom sistemu	5
1.1.3. Uloge vazoaktivnog intestinalnog peptida u infekciji HIV-1 virusom	6
1.1.4. Uloge vazoaktivnog intestinalnog peptida u malignim bolestima	11
1.1.4.1. Uloga vazoaktivnog intestinalnog peptida u karcinomu dojke	11
1.1.4.2. Uloga vazoaktivnog intestinalnog peptida u karcinomu prostate	14
1.2. Anti-VIP autoantitela	19
1.2.1. Fizička aktivnost i anti-VIP/gp120 antitela	20
1.2.2. Detekcija anti-VIP/gp120 antitela	22
1.3. VRC antitela	23
1.4. Fizička aktivnost	25
1.4.1. Fizička aktivnost i virus humane imunodeficijencije	26
1.4.2. Fizička aktivnost i karcinom dojke	27
1.4.3. Fizička aktivnost i karcinom prostate	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
3. MATERIJALI I METODE	31
3.1. Ispitanici	31
3.2. Sakupljanje i čuvanje uzoraka krvi	34
3.3. ELISA metoda za detekciju anti-VIP/gp120 antitela	34
3.3.1. Hemikalije, reagensi i rastvori za ELISA detekciju anti-VIP/gp120 antitela	35
3.3.2. Peptid (NTM1)4-SOC4	37
3.3.3. Postupak za detekciju anti-VIP/gp120 antitela	38
3.4. Metoda informacionih spektara (ISM) korišćena za analizu VIP/VPAC interakcije	39

3.5. Ispitivanje reaktivnosti VRCO1 antitela i NTM1 peptida primenom AMF mikroskopije	46
3.6. Statistička obrada podataka	48
4. REZULTATI	49
4.1. Dizajniranje i analitička optimizacija ELISA testa za detekciju anti-VIP/gp120 antitela	49
4.1.1. Analiza strukturne i informacione sličnosti između VIP-a i peptida korišćenih za detekciju anti-VIP/gp120 antitela ELISA metodom	49
4.1.2. Odabir adekvatne količine (NTM1) ₄ -SOC ₄ peptida oblaganje ploče	51
4.1.3. Izbor optimalnog razblaženja seruma	52
4.1.4. Izbor optimalnog razblaženja detekcionih antitela	53
4.1.5. Izbor optimalnog razblaženja rastvora za blokiranje ploče	53
4.1.6. Provera nepreciznosti u seriji	54
4.1.7. Provera nepreciznosti iz dana u dan	55
4.2. Ispitivanje prisustva anti-VIP/gp120 antitela kod različitih grupa ispitanika	55
4.2.1. Testiranje seruma zdravih, fizički neaktivnih osoba, na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela	56
4.2.2. Testiranje seruma aktivnih sportista na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela	57
4.2.2.1. Vaterpolo - žene	58
4.2.2.2. Plivanje - žene	58
4.2.2.3. Odbojka - žene	59
4.2.2.4. Veslanje - muškarci	59
4.2.2.5. Rvanje - muškarci	60
4.2.2.6. Karate - muškarci	60
4.2.2.7. Vaterpolo - muškarci	61
4.2.2.8. Kik boks - muškarci	61
4.2.3. Uticaj pola na porast anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista	62
4.2.4. Uticaj vrste sporta na nivo anti-VIP/gp120 antitela	62

4.2.5. Ispitivanje anti-VIP/gp120 antitela kod vaterpolista pre i nakon fizičke aktivnosti	64
4.3. Testiranje seruma HIV pozitivnih osoba na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela	65
4.4. Testiranje seruma osoba obolelih od karcinoma dojke i prostate na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela	66
4.5. Analiza interakcije između NTM-SOC antigena i neutrališućeg anti-HIV monoklonskog antitela VRC01 primenom elektronske mikroskopije	68
4.6. Analiza interakcije VIP/VPAC receptori	72
4.7. Određivanje domena na receptorima VPAC 1 i VPAC 2, koji su odgovorni za interakciju sa VIP-om	75
5. Diskusija	79
5.1. Optimizacija ELISA metode za detekciju anti-VIP/gp120 antitela	80
5.2. Uticaj pola na nivo anti-VIP/gp120 antitela	84
5.3. Uticaj vrste sporta na produkciju anti-VIP/gp120 antitela	86
5.4. Analiza interakcije između VIP-a i VPAC receptora	87
5.5. Značaj anti-VIP/gp120 antitela u HIV infekciji	88
5.6. Značaj anti-VIP/gp120 antitela u malignim bolestima	93
5.6.1. Anti-VIP/gp120 antitela i karcinom dojke	93
5.6.2. Anti-VIP/gp120 antitela i karcinom prostate	98
5.7. Značaj N-terminalnog domena primarne strukture VPAC1 receptora za selekciju antagonista VIP-a	103
6. Značaj istraživanja i naučni doprinos	104

1. UVOD

1.1. Vazoaktivni intestinalni peptid

Vazoaktivni intestinalni peptid prvi put je izolovan 1960. godine iz zdravog tkiva pluća i tom prilikom je ustanovljeno da uzrokuje produženu perifernu vazodilataciju i relaksaciju glatke muskulature, zbog čega je inicijano nazvan vazoinhibitorni peptid. Međutim, kasnije je ustanovljeno da ovaj peptid uzrokuje mnogo izraženiju vazodilataciju iz uzorka ekstrahovanog iz duodenalnog sadržaja i dodeljeno mu je danas prihvaćeno ime vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) [1]. VIP je peptid od 28 aminokiselina i pripada grupi neuropeptida u koju se takođe svrstavaju sekretin i glukagon (gastrointestinalni hormoni). Prekursor u sintezi VIP-a je prepro-VIP molekul sačinjen od 170 aminokiselina, koji se metaboliše do pro-VIP molekula (148 aminokiselina) i konačno do VIP molekula (28 aminokiselina) [2].

Primarna struktura VIP-a je:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

i u daljem tekstu biće prikazana slovnim oznakama aminokiselina :

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

VIP se sintetiše u hipotalamusu, crevima i pankreasu, a deluje kao višefunkcionalni hormon, koji reguliše funkciju velikog broja različitih ćelija i sistema organa u organizmu. Među najvažnijim ulogama VIP-a su one u:

- centralnom nervnom sistemu, gde učestvuje u regulaciji rada hipofize, stimulaciji oslobađanja prolaktina, ATCH i vazopresina, kao i u regulaciji cirkardijalnog ritma, regulaciji stresa, učenju i memoriji;
- perifernom nervnom sistemu, gde je uključen u sekreciju insulina od strane pankreasa i sekreciju kateholamina iz nadbubrežne žlezde [3];
- sistemu organa za varenje, gde indukuje relaksaciju glatkih mišića, stimuliše izlučivanje vode u pankreasni sok i žuč, inhibira izlučivanje želudačne kiseline. U crevima VIP stimuliše izlučivanje vode, stimuliše kontrakciju glatkih mišića u zidu creva, pospešuje dilataciju perifernih krvnih sudova i pankresnu sekreciju bikarbonata, a takođe inhibira gastrinom-stimulisanu sekreciju želudačne kiseline [4].

Jedna grupa istraživača VIP svrstava u citokine, s obzirom da ga sintetišu pomoćnički Th2 limfociti i da utiče autokrino i parakrino na imuni sistem. U prilog ovoj klasifikaciji VIP-a ide i činjenica da se VIP oslobađa iz neurona, čiji su završeci prisutni u limfnim organima i na taj način direktno učestvuje u imunom odgovoru [5].

1.1.1. Receptori vazoaktivnog intestinalnog peptida

Biološku ulogu VIP ostvaruje posredstvom receptora, koji su prema međunarodnoj uniji za bazičnu i kliničku farmakologiju, označeni kao receptori vazoaktivnog intestinalnog peptida (VPAC receptori). VPAC receptori pripadaju grupi GPCR receptora (engl. G protein-coupled receptor).

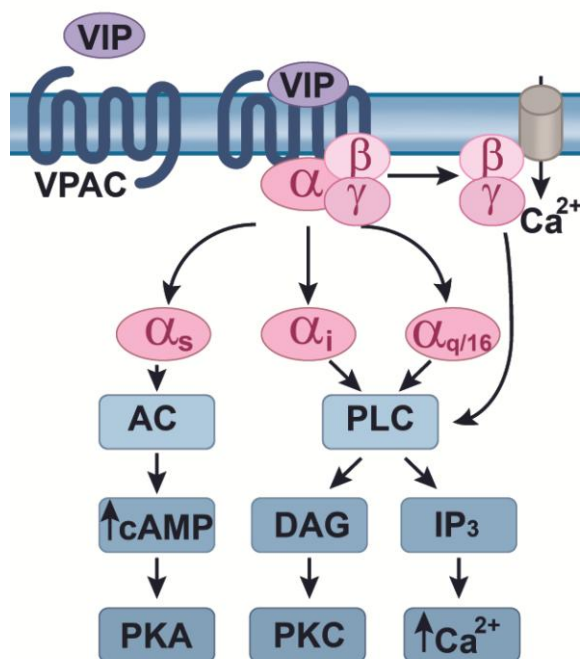
Dva glavna VIP-ova receptora su VPAC1 i VPAC2. Ova dva proteina imaju međusobno veoma malu sličnost na nivou primarnih struktura (homologija je <50%), a razlikuju se i po distribuciji u tkivima:

- VPAC1 receptori su prisutni u CNS, dojčkama, bubrezima, jetri, plućima, prostati, slezini i mukozi gastrointestinalnog trakta. U imunom sistemu VPAC1 receptori su prisutni u T ćelijama, monocitima i makrofagama.
- VPAC2 receptori su eksprimirani u CNS, u srži nadbubrežne žlezde, krvnim sudovima, plućima, pankreasu, glatkim mišićima i tiroidnoj žlezdi. U imunom sistemu prisutni su na aktiviranim T limfocitima i makrofagama.

Vezivanje VIP-a za VPAC receptore uzrokuje konformacione promene receptora, koje dovode do promena i na citoplazmatskim domenima, što dalje ima za posledicu razgradnju heteroproteinskog kompleksa sačinjenog od tri subjedinice [3].

VPAC receptori su prvenstveno vezani za Gas subjedinicu, koja dovodi do aktivacije adenilat-ciklaze i povećanja sinteze cAMP. Intracelularna akumulacija cAMP aktivira protein-kinazu A (PKA) i tako pokreće unutrašnji signalni put, koji dovodi do ćelijske proliferacije i diferencijacije (uloga VIP-a kao faktora rasta) [6]. Aktivacija PKA takođe uzrokuje i aktivaciju signalnih puteva transkripcionih faktora, što rezultuje povećanom sintezom antiinflamatornih citokina i smanjenom sintezom proinflamatornih citokina (antiinflamatorna aktivnost VIP-a) [7].

Nekoliko studija ukazuju da se vezivanjem za $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, ili $G_{\alpha_{16}}$ subjedinice aktivira fosfolipaza C (PLC) i povećava intracelularna koncentracija kalcijuma. Detaljan mehanizam, kojim VIP dovodi do povećanja intracelularnog kalcijuma još nije poznat. Jedino je dokazano da su različiti mehanizmi povezani sa aktivacijom VPAC1 i VPAC2, koja dovodi do povećanja intracelularnog kalcijuma (**Slika 1**) [3].



Slika 1. Signalni putevi povezani sa aktivacijom VPAC receptora. **AC**-adenilat ciklaza, **cAMP**- ciklični adenzin-monofosfat, **PKA**- protein-kinaza A, **PKC** protein-kinaza C, **PLC**-fosfolipaza C, **DAG**-diacilglicerol, **IP₃**- inozitol 1,4,5-trifosfat

U cilju dizajniranja aktivnih mimetika VIP-a (agonista i antagonista), koji bi se mogli koristiti u terapijske svrhe, određen je deo primarne strukture VIP-a, koja je ključna za interakciju sa receptorima VPAC1 i VPAC2. Koristeći metod sukcesivne zamene pojedinačnih aminokiselina alaninom i desno orijentisanim aminokiselinama u primarnoj strukturi VIP-a, Igarashi i saradnici su pokazali sledeće :

1. aminokiseline ključne za vezivanje VIP-a za receptor VPAC1 su [8]:

Phe⁶, Thr⁷, Asp⁸ na NH₂-kraju

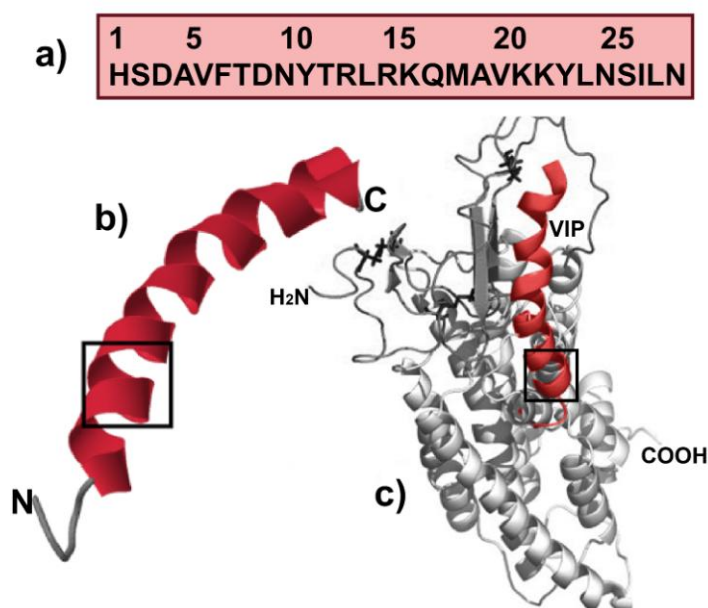
Val¹⁹, Lys²¹, Thr²², Ile²⁶ na COOH-kraju molekula.

Navedeni autori su pokazali da na afinitet vezivanja VIP-a za VPAC1 receptor u najvećoj meri utiče zamena Phe sa Ala na poziciji 6 , što smanjuje afiniteta za više od 1000 puta:

2. prostorna orijentacija bočnih nizova aminokiselina veoma je značajna za vezivanje VIP-a za VPAC2. Zamene levo orjentisanih aminokiselina sa desno orjentisanim aminokiselinama na sledećim pozicijama u strukturi VIP-a, značajno smanjuje vezivanje VIP-a za receptor VPAC2 [9]:

D-Phe⁶, D-Thr⁷, D-Asp⁸, D-Tyr¹⁰, D-Thr¹¹, D-Arg¹⁴, D-Lys¹⁵, D-Met¹⁷, D-Val¹⁹, D-Lys²¹, D-Tyr²² i D-Ile²⁶

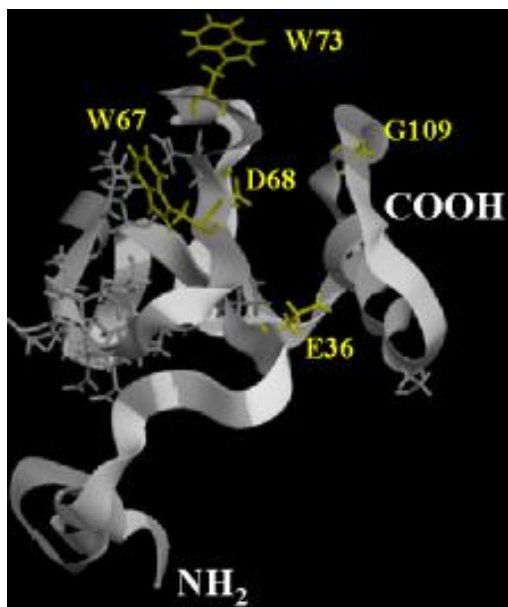
Iz rezultata funkcionalnog mapiranja VIP-a, izveden je zaključak da FTD motiv, na poziciji 6 – 8 VIP-a, predstavlja najduži kontinuirani deo primarne strukture, koji učestvuje u hemijskom vezivanju VIP-a za receptore VPAC1 (**Slika 2**), kao i da amino kiselina Phe⁶ ima ključnu ulogu u vezivanju za oba receptora.



Slika 2. (a) Pozicija FTD aminokiselina u primarnoj strukturi VIP-a; **(b)** Pozicija FTD aminokiselina u 3D strukturi VIP-a (označena je crnim kvadratom); **(c)** Direktni kontakt FTD aminokiselina sa receptorom VPAC1 u kompleksu VIP/VPAC1 [10] .

Na N-terminalnom delu VPAC1 receptora, koji obuhvata aminokiseline 8-117 (pozicije odgovaraju nematuriranom proteinu u koji je uključen signalni peptid) označene su aminokiseline koje su odgovorne za interakciju VIP-a sa

VPAC1 receptorom. Na **slici 3**, jasno su naglašene aminokiseline W67, D68, W73 i G109 u nematuriranom proteinu (W37, D38, W43 i G79 u proteinu bez signalnog peptida) za koje je dokazano da učestvuju u direktnom vezivanju VIP-a za VPAC1 receptor [11].



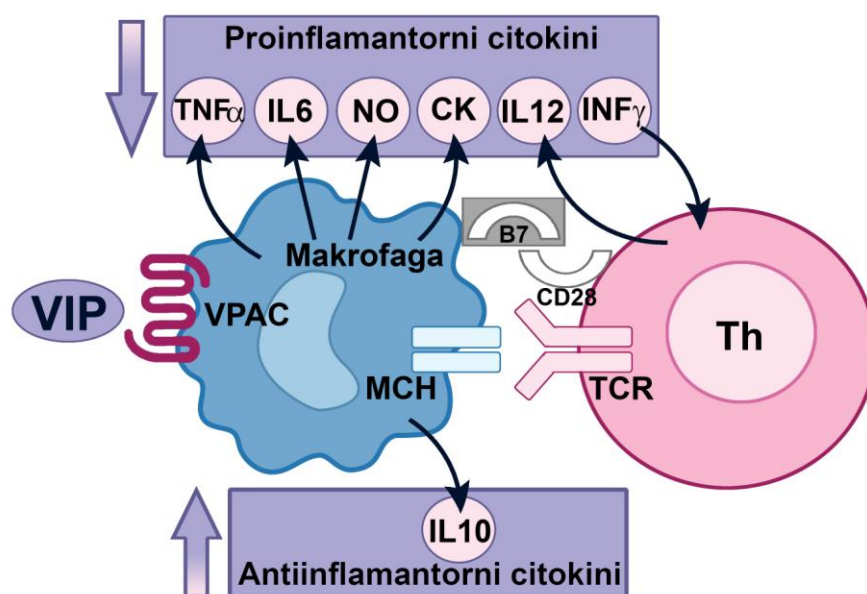
Slika 3. 3D struktura N-terminalnog dela VPAC1 receptora

Podaci o 3D strukturi VPAC2 receptora nisu dostupni u bazi proteinskih struktura.

1.1.2. Uloge VIP-a u imunom sistemu

VIP je snažan imunomodulator koji utiče na čitav niz važnih komponenti imunog sistema: pokretljivost limfocita i magrofaga, fagocitozu, proliferativni odgovor limfocita, produkciju citokina i imunoglobulina, kao i aktivnost NK ćelija [12]. Činjenica da se na površini limfocita nalaze različiti receptori za peptide koji ulaze u satav prepro-VIP molekula, sugeriše važnu imunomodulatornu ulogu VIP-a [13]. VIP vezivanjem za specifične receptore (VPAC1, VPAC2) inhibira sintezu proinflamatornih molekula: TNF α , IL-6, azot-monoksida (NO), hemokina i IL-12. Indirektno preko IL-12 VIP inhibira sintezu IFN γ od strane antigen stimulisanih pomoćničkih Th ćelija. Stimuliše sintezu antiinflamatornog citokina IL-10. VIP smanjuje ekspresiju kostimulatornih molekula B7.1 i B7.2 na makrofagama i tako sprečava pokretanje proliferacije pomoćničkih Th ćelija (**Slika 4**) [14].

VIP utiče na sintezu IL-2 i IL-4 u CD4 T ćelijama. Produkcija IL-2 je regulisana VIP-om na transkripcionom nivou, putem inhibicije sinteze IL-2 mRNK, dok je produkcija IL-4 modulisana na posttranskripcionom nivou [15]. Pretpostavlja se da VIP, inhibirajući sintezu IL-2 i IL-4, utiče na razvoj T ćelija u timusu [16]. Imunomodulatorne osobine VIP-a imaju važnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti: Parkinsonove i Alchajmerove bolesti, reumatoidnog artritisa i multiple skleroze [17].

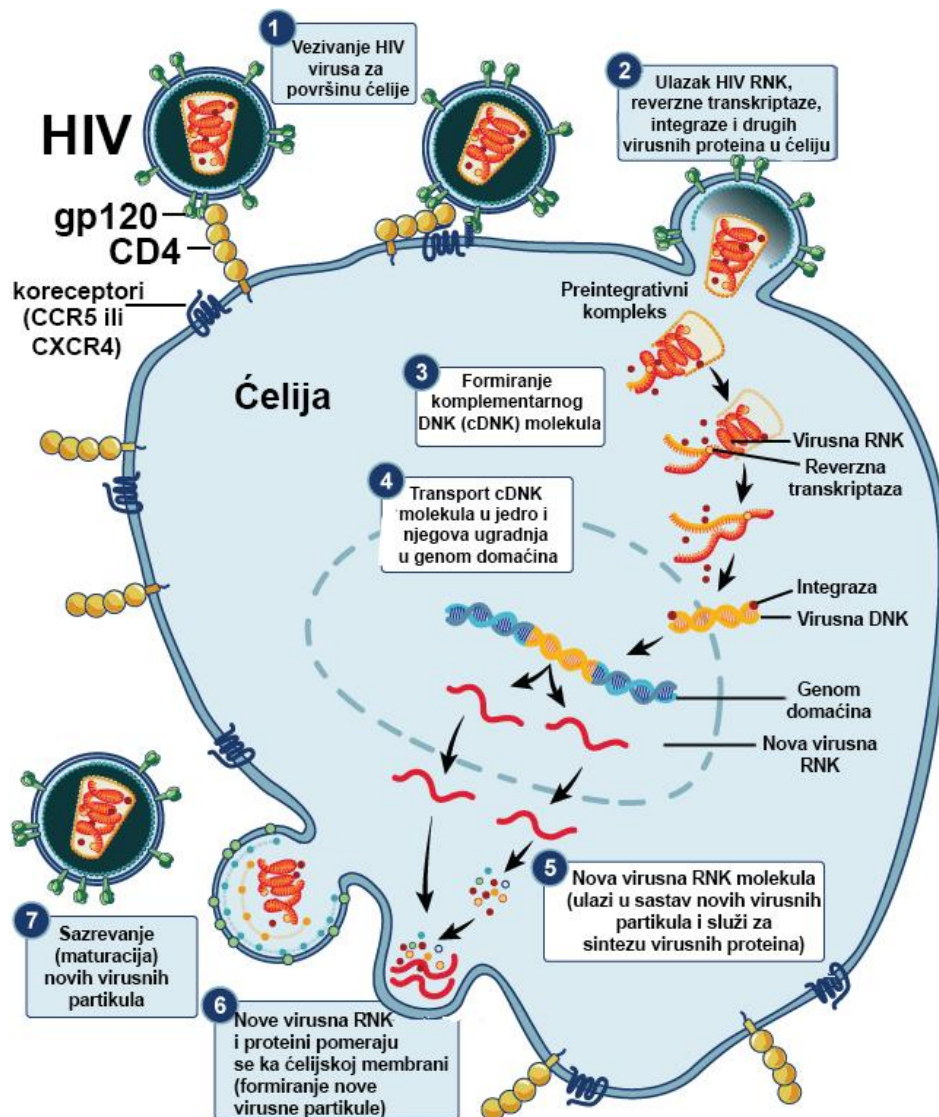


Slika 4. Uticaj VIP-a na sintezu proinflamatornih i antiinflamatornih citokina

1.1.3. Uloge vazoaktivnog intestinalnog peptida u infekciji HIV-1 virusom

Ustanovljeno je da postoji strukturna i informaciona sličnost između glikoproteina gp120 virusa HIV-1 sa VIP-om. Ova prirodna mimikrija dva proteina omogućava interakciju proteina gp120 sa VPAC receptorima i njihovo aktivno učešće u HIV infekciji [18].

Virus humane imunodeficijencije (HIV) je retrovirus koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (SIDA), stanje u kome imuni sistem postepeno slabi dovodeći do po život opasnih oportunističkih infekcija. Infekcija ćelije domaćina HIV virusom i replikacija virusa odvija se kroz nekoliko koraka, koji su prikazani na **Slici 5**.



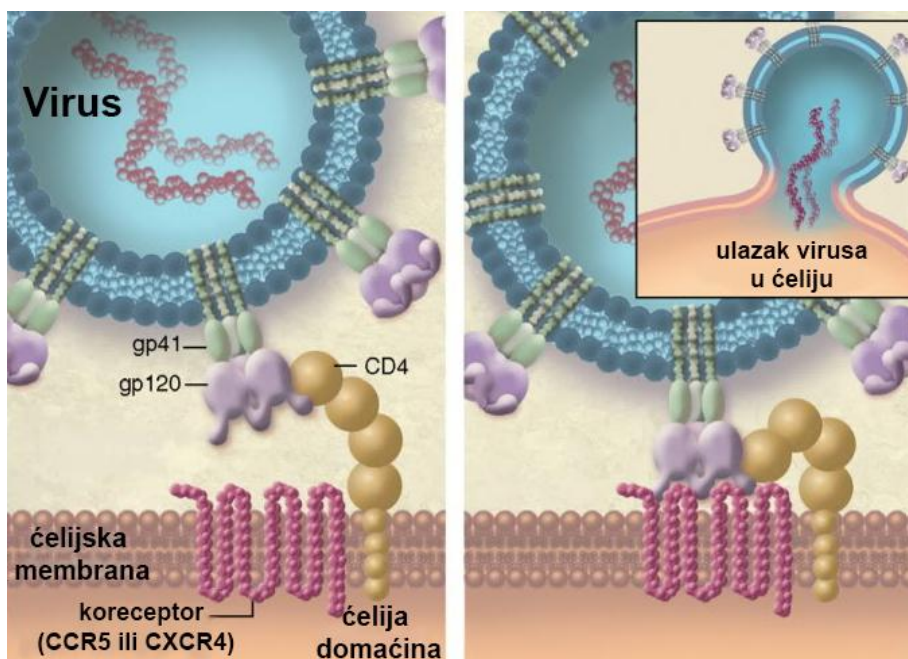
Slika 5. Ciklus replikacije HIV virusa

The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (www.niaid.nih.gov)

Dva glavna parametra koja se prate kod pacijenata zaraženim HIV virusom, a koja nam govore o napredovanju bolesti su: broj virusnih kopija/ml (eng.viral load) i broj CD4 ćelija. Kada je broj CD4 ćelija visok, broj virusnih kopija/ml je obično mali. Ako broj CD4 ćelija padne ispod $350/\mu\text{L}$ uključuje se antiretroviralna terapija, koja ima za cilj povećanje broja CD4 ćelija i pad broja virusnih kopija/ml.

Glikoprotein gp120, prisutan je na površini HIV virusa i odgovoran je za ulazak virusa u ćeliju, jer ima ključnu ulogu u interakciji virusa sa receptorima na površini ćelije. Naziv "gp120" ovog glikoproteina potiče od njegove molekularne težine, koja iznosi 120 kDa. Konzervirani region proteina gp120

odgovoran je za interakciju HIV virusa sa CD4 receptorom na pomoćničkim Th limfocitima [19].



Slika 6. Interakcija glikoproteina gp120 i CD4 receptora

Yost R, Pasquale TR, Sahloff EG. Maraviroc: a coreceptor CCR5 antagonist for management of HIV infection. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66 : 715-726.

Epitop unutar C-terminalnog kraja drugog konzerviranog regiona glikoproteina gp120, koji obuhvata amino kiseline 280 - 236 (RSANFTDNAKTIIVQLNESVEINCTRP) označen je kao C2 peptid. Unutar C2 peptida selektovan je deo, tzv. NTM peptid (RSANFTDNAKTIIVQLNESVEIN), koji je strukturno i informaciono sličan sa delom VIP-a. NTM peptid uključuje FTD strukturni motiv VIP-a, koji učestvuje u direktnoj interakciji VIP-a i VPAC1 receptora [20].

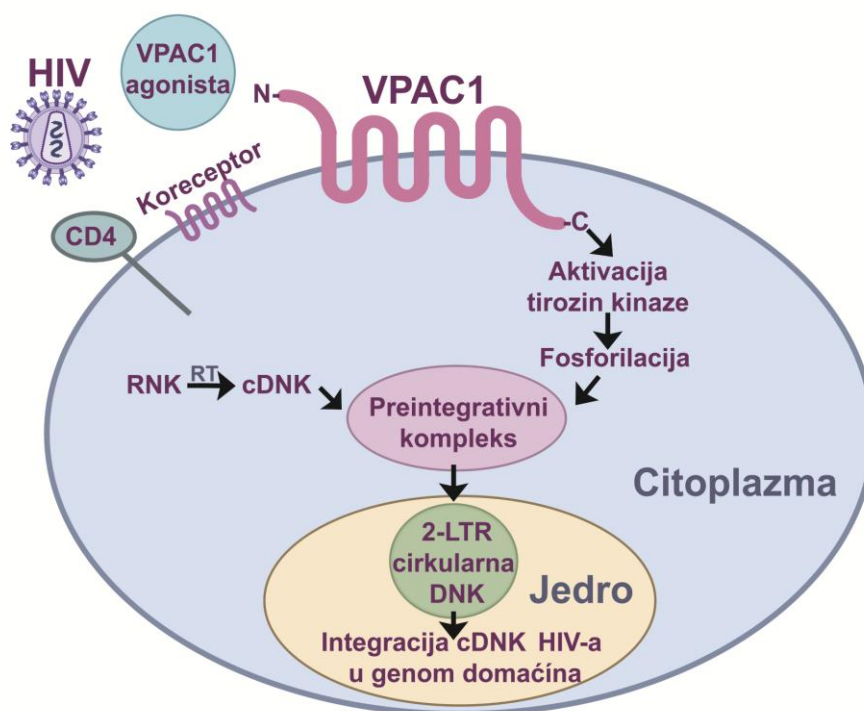
C2 peptid RSANFTDNAKTIIVQLNESVEINCTRP

NTM peptid RSANFTDNAKTIIVQLNESVEIN

Strukturna i informaciona sličnost između glikoproteina gp120 i VIP-a omogućava interakciju gp120 sa VPAC1 i VPAC2 receptorima na površini CD4 ćelija. Prema predloženom mehanizmu HIV ne koristi VPAC1 receptore da bi inficirao ćeliju, već da bi pospešio integraciju virusne cDNK u genom domaćina [18].

Pretpostavlja se da je za integraciju virusne DNK značajna aktivacija tirozin kinaze [21], koja fosforiliše tirozin u matriksnom proteinu HIV-a, čime omogućava formiranje preintegrativnog kompleksa [22,23].

Vezivanje virusa za CD4 receptore i koreceptore CCR5 i CXCR4 omogućava spajanje virusa sa ćelijskom membranom i translokaciju HIV proteina i virusne RNK u ciljnu ćeliju. Reverzna transkriptaza konvertuje RNK u komplementarnu DNK (cDNK), koja gradi preintegrativni kompleks sa fosforilisanim matriksnim proteinom (p17), integrazom i virusnim proteinom R (Vpr). Za fosforilaciju matriksnog proteina p17, odgovorna je tirozin kinaza, koja se aktivira u signalnom putu. Aktivaciju tirozin kinaze pokreće vezivanje prirodnih liganda sekretina, VIP-a ili gp120 za VPAC1 receptor. Formirani preintegrativni kompleks omogućava transport virusne cDNK u jedro i formiranje 2-LTR-cirkularne DNK, koja se ugrađuje u genom domaćina (Slika 7).

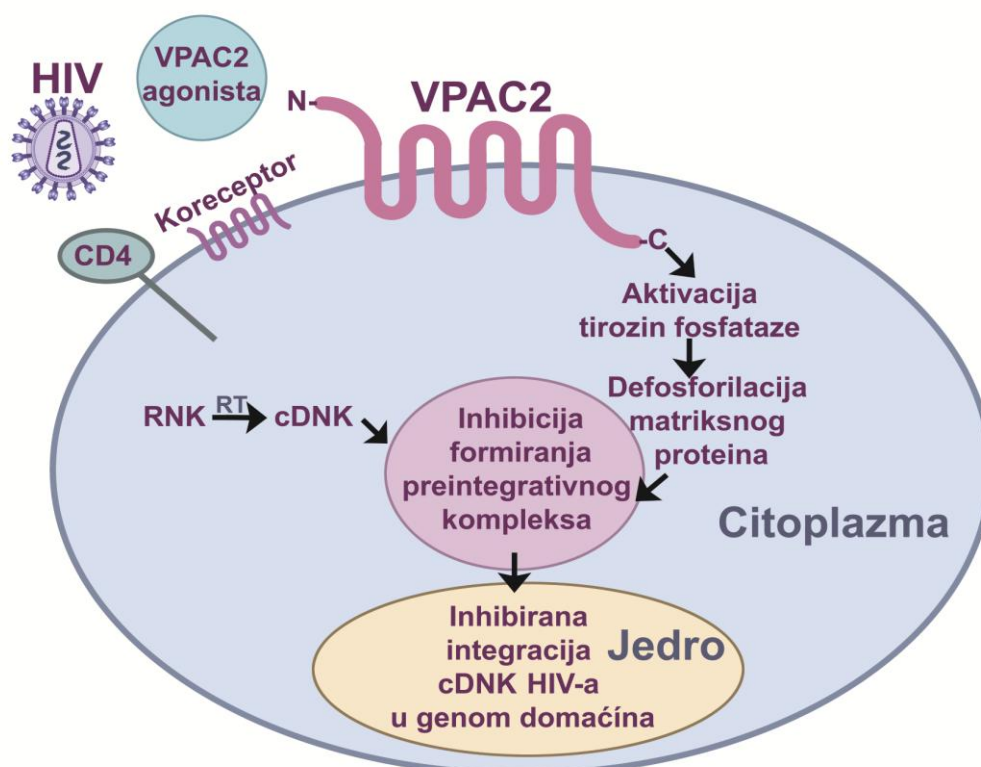


Slika 7. Predloženi mehanizam formiranja preintegrativnog kompleksa u HIV infekciji, koji uključuje VPAC1 receptore.

Donald R. Branch, Neuropeptide Receptors: Novel Targets for HIV/AIDS Therapeutics. Pharmaceuticals 2011; 4: 485-493.

Stimulacija VPAC2 receptora od strane specifičnih agonista dovodi do aktivacije tirozin-fosfataze, koja vrši defosfataciju tirozina u matriksnom proteinu i time inhibira formiranje preintegrativnog kompleksa (**Slika 8**) [24].

Navedena istraživanja sugerišu da od aktivacije odgovarajućeg VIP-ovog receptora zavisi formiranje preintegrativnog kompleksa, jer aktivacija VPAC1 receptora omogućava ugradnju virusne cDNK u genom domaćina, dok aktivacija VPAC2 receptora onemogućava formiranje preintegrativnog kompleksa i time sprečava ugradnju cDNK virusa u genom domaćina.



Slika 8. Šematski prikaz uloge receptora VPAC2 u formiranju preintegrativnog kompleksa

Donald R. Branch, Neuropeptide Receptors: Novel Targets for HIV/AIDS Therapeutics. Pharmaceuticals 2011; 4: 485-493.

1.1.4. Uloga vazoaktivnog intestinalnog peptida u malignim bolestima

Vazoaktivni intestinalni peptid ima važnu ulogu u patogenezi karcinoma dojke i prostate.

VIP učestvuje u:

- proliferaciji i diferencijaciji maligno transformisanih ćelija;
- procesu neoangiogeneze, odnosno procesu proširivanja starih i stvaranja novih krvnih sudova u području u kome je došlo do nastanka tumora;
- interakciji sa drugim faktorima rizika za nastanak ovih karcinoma.

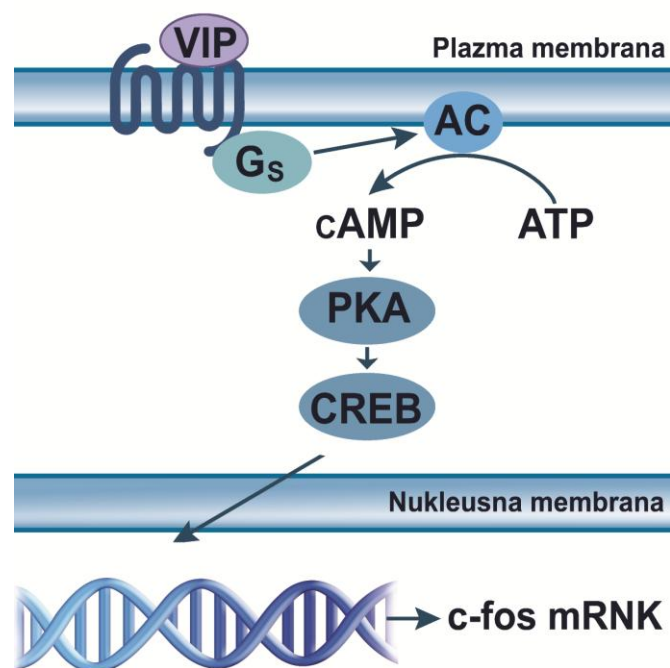
1.1.4.1. Uloga vazoaktivnog intestinalnog peptida u karcinomu dojke

Prema rezultatima Svetske zdravstvene organizacije, rak dojke je najrasprostranjenija, ali i najsmrtonosnija vrsta karcinoma među ženama u Evropi i svetu. Svake godine otkrije se oko milion novoobolelih žena, a skoro pola miliona žena godišnje umire od ove bolesti. U Srbiji svake godine oboli oko 4.000 žena, dok hiljadu i po svake godine umre od karcinoma dojke. Prognoza bolesti i mortalitet zavisi od vrste karcinoma dojke, stadijuma bolesti, terapije i razvijenosti zemlje (stepen preživljavanja je veći u razvijenim zapadnim zemljama).

VIP i VPAC receptori uključeni su u proliferaciju, preživljavanje i diferencijaciju ćelija tumora dojke. VIP istovremeno utiče na neke od faktora rizika za nastanak karcinoma dojke (npr. telesnu težinu). Ustanovljeno je da postoji povećana gustina VPAC1 i VPAC2 receptora na tumorskim ćelijama karcinoma dojke u odnosu na zdravo tkivo dojke. Ekspresija velikog broja VPAC1 receptora na površini tumorskih ćelija raka dojke sugeriše da VPAC1/cAMP sistem igra značajnu ulogu u patogenezi ove bolesti [25].

1) Predloženi mehanizmi uloge VIP-a, kao faktora rasta za ćelije karcinoma dojke:

- Postoji zavisnost između koncentracije VIP-a i indukovane količine cAMP u ćelijama karcinoma dojke. Ustanovljeno je da nanomolarne koncentracije VIP-a stimulišu sintezu c-fos i c-mic onkogeni, kao i da primena VIP antagonista blokira rast tumorskih ćelija [26].



Slika 9. Signalni put VIP-a odgovoran za povećanu ekspresiju c-fos onkogenā. VIP vezivanjem za VPAC1 receptor, aktivira adenilat-ciklazu (**AC**) preko (**G_s**) subjedinice receptora. Porast **cAMP** (cikličnog adenozinmonofosfata) aktivira protein-kinazu A (**PKA**), koja fosforiliše **CREB** protein (eng. cAMP response element-binding protein). CREB je ćelijski transkripcioni faktor, koji reguliše transkripciju c-fos onkogenā.

- VIP deluje kao faktor rasta na ćelije raka dojke kroz transaktivaciju i stimulaciju fosforilacije EGFR receptora i tirozin kinaznog receptora HER2 (receptori humanog epidermalnog faktora rasta). Porast HER2 receptora na malignim ćelijama udružen je sa brzim tumorskim rastom, povećanim rizikom od pojave recidiva posle hirurške intervencije, slabim odgovorom na konvencionalnu hemioterapiju, hormonsku terapiju i kraće preživljavanje. Vezivanjem VIP-a za VPAC receptore aktivira se signalni put koji dovodi do transaktivacije faktora rasta EGFR i receptora HER2 [27]. Eksperimenti sa siRNA (engl. small-interference RNA) su pokazali da je za navedene procese odgovoran VIP/VPAC1 signalni put i da antagonisti VIP-a koji se vezu za receptor VPAC1 blokiraju ove procese zbog čega su predloženi kao potencijalni terapijski agensi za rak dojke [28].

2) VIP stimuliše proliferaciju i diferencijaciju maligno transformisanih ćelija karcinoma dojke.

- Nedavno je otkriveno da VIP stimuliše translokaciju VPAC₁ iz plazma membrane u jedro, gde je ovaj receptor uključen u diferencijaciju i proliferaciju ćelija raka dojke [29].
- Povećan broj VPAC receptora na tumorskim ćelijama direktno je odgovoran za njihovu proliferaciju [30]. Na osnovu ovog rezultata, predloženo je da se receptor VPAC₁ koristi kao dijagnostički marker i terapijski target za rak dojke [31,32].

Podatak da maligne ćelije karcinoma dojke same sintetišu znatno veće količine VIP-a i VPAC receptora u odnosu na druga tkiva, pokrenulo je razmatranje mogućnosti primene analoga VIP-a obeleženih radionuklidima (⁶⁴Cu i ^{99m}Tc), kao markera za neinvazivno, rano otkrivanje tumorskih promena uz pomoć PET kamera [33].

3) VIP-ov signalni put, takođe je povezan sa povećanom ekspresijom i lučenjem vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u ćelijama tumorskog tkiva što ukazuje na proangiogenu ulogu VIP-a u razvoju karcinoma dojke [34].

4) Uticaj VIP na telesnu težinu, kao faktora rizika za nastanak karcinoma dojke

Povišen BMI (eng. Body mass index) kod žena u menopauzi povezan je sa rizikom za nastanak karcinoma dojke. Primenom PBGW analize (eng. Pathway-Based Genom-Wide), na uzorku od 1000 ispitanika, analizirano je preko 500.000 polimorfizama i 963 signalna puta vezanih za povećanje telesne težine. Rezultat je pokazao da su signalni putevi vezani za VIP najodgovorniji, kako za regulaciju BMI, tako i za i ukupan sadržaj masti u organizmu [35]. Ovaj uticaj se prvenstveno ostvaruje preko VPAC₂ receptora. Ustanovljeno je da postoji značajno smanjenje sinteze VIP kod gojaznih ljudi [36] kao i da je VIP uključen u regulisanje apetita (povećane količine VIP-a dovode do anoreksije) [37].

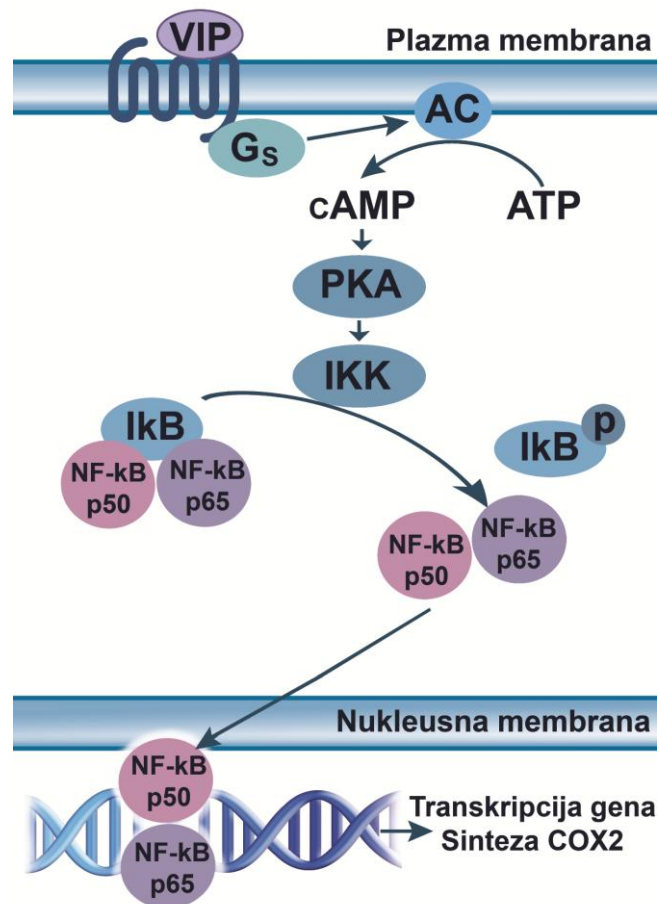
1.1.4.2. Uloga vazoaktivnog intestinalnog peptida u karcinomu prostate

Karcinom prostate se gotovo isključivo javlja kod muškaraca starijih od 40 godina. Kod polovine muškaraca, starih preko 70 godina, mogu se ustanoviti mikroskopski tumori prostate. Karcinom prostate je jedan od najčešćih karcinoma u muškoj populaciji. Globalno se nalazi na trećem mestu po učestalosti u svetu, a na drugom mestu po broju smrtnih ishoda, iza raka pluća. U Srbiji se nalazi na drugom mestu po učestalosti, iza raka debelog creva [38].

Istraživanja su pokazala da je VPAC2 pretežno eksprimiran na zdravom tkivu prostate, dok maligno transformisane ćelije dominantno eksprimiraju receptor VPAC1 [39].

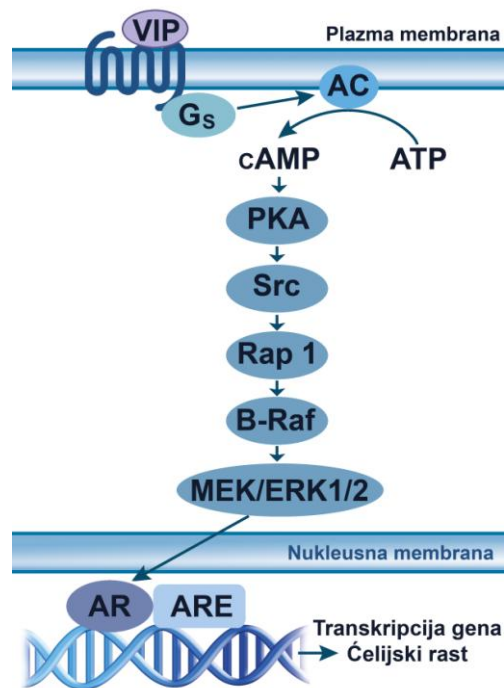
Glavne uloge VIP-a na razvoj karcinoma prostate:

- 1) VIP indukuje sintezu COX2 (ciklooksigenaze 2) u malignim ćelijama karcinoma prostate, proporcionalno stadijumu bolesti. Povećana sinteza COX2 u tumorskom tkivu tesno je povezana sa biohemijskim promenama, prisustvom udaljenih metastaza i stepenom preživljavanja (povećana ekspresija COX2 vezana je za visok stepen smrtnosti). Ustanovljeno je da inhibicija sinteze COX2 može da poboljša efekte terapije zračenjem [40]. Najveća produkcija COX2 stimulisana od strane VIP je u agresivnoj fazi progresije karcinoma i od strane androgen nezavisnih tumorskih ćelija. VIP preko VPAC1 receptora deluje na NF κ B, omogućavajući odvajanje I- κ B subjedinice i translokaciju kompleksa p65/p50 u jedro. Kompleks p65/p50 pokreće transkripciju gena za COX2 (**Slika 10**). Navedeni podaci sugerišu da bi COX2 mogao biti ciljni molekul preko koga bi se smanjio uticaj VIP na progresiju karcinoma prostate [41].



Slika 10. Aktivacija gena za COX-2 preko VPAC1 receptora

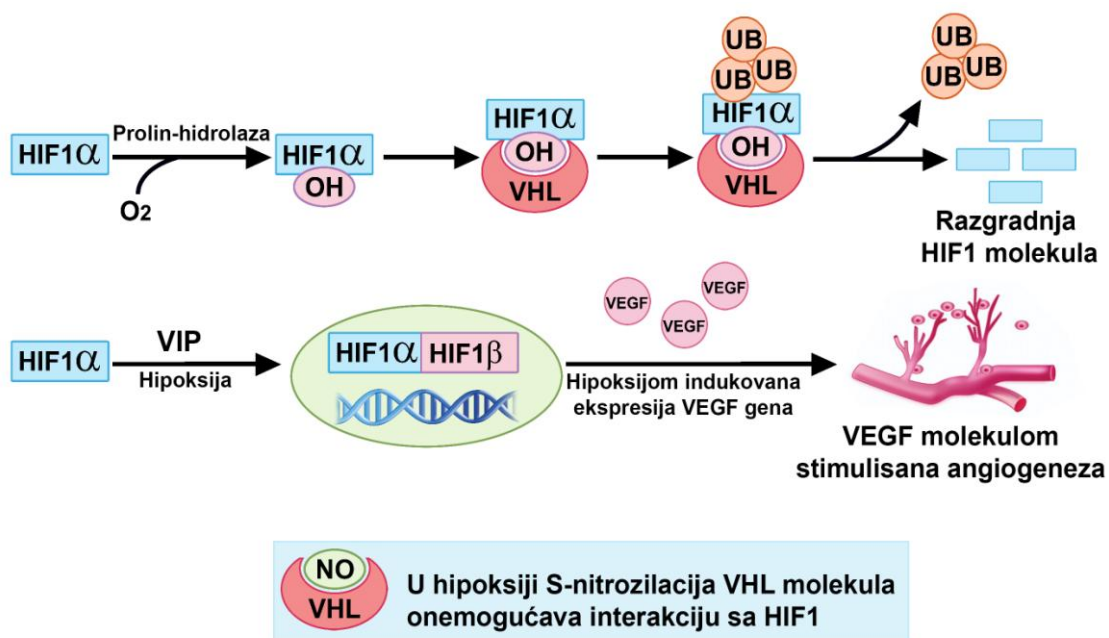
- 2) VIP ima autokrino delovanje na maligne ćelije tumora prostate posredstvom kinaza: ERK (eng. extracellular signal-regulated kinase) i MEK (eng. mitogen-activated protein kinase), što ima za posledicu aktivaciju intracelularnog androgenog receptora. Poznato je da androgeni hormoni, preko intracelularnog androgenog receptora, modulišu gensku ekspresiju u maligno transformisanim ćelijama i imaju važnu ulogu u ranom stadijumu razvoja tumora prostate. VIP omogućava aktivaciju intracelularnog androgenih receptora nezavisno od androgena i na taj način direktno podstiče rast tumorskog tkiva (**Slika 11**) [42].



Slika 11. Aktivacija intracelularnog androgenog receptora posredstvom VIP molekula. VIP vezivanjem za VPAC receptor, aktivira adenilat-ciklazu (AC) preko (Gs) subjedinice. Porast cAMP (ciklicnog adenozinmonofosfata) aktivira protein-kinazu A (PKA) i omogućava fosforilaciju **Src regulatornog proteina** (Src protein kinaza). Src protein fosforiliše **Rap 1** (malu GTPazu, mali citozolni molekul) koji ima važnu ulogu u prenosu signala i koji pokreće **Raf/MEK/ERK** signalni put i vezivanje **AR** (androgenog receptora) za **ARE** (engl. androgen response element), čime je omogućena transkripcija gena i ćelijski rast, nezavisno od prisustva androgenih molekula.

- 3) VIP ima proangiogeni potencijal kod razvoja tumora prostate, jer stimuliše sekreciju vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF). VIP indukuje transkripciju VEGF gena posredstvom VPAC1 receptora. VEGF deluje autokrino i parakrino, omogućavajući rast maligno transformisanih ćelija i neovaskularizaciju tumorskog tkiva, čime se olakšava širenje malignih ćelija do udaljenih organa i tkiva [43]. Neovaskularizacija, zbog sporog protoka plazme kroz novoformirane krvne sudove, dovodi do razvoja hipoksije. Sa jedne strane, hipoksija stimuliše povećanu sintezu VIP-a u ćelijama tumora prostate, a sa druge strane aktivira hipoksija-induktivni faktor (HIF-1), koji pokreće ekspresiju VEGF gena i omogućava dalju vaskularizaciju tumorskog

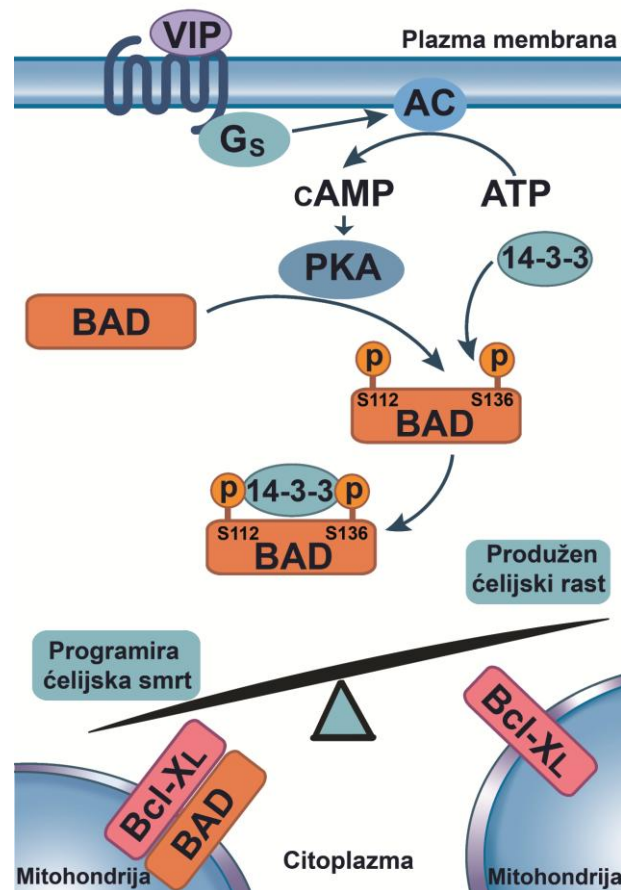
tkiva. HIF-1 molekul izgrađen je od dve subjedinice: α i β . HIF1 α subjedinica je smeštena u citoplazmi i u nehipoksičnim uslovima ona je prisutna u malim količinama, jer se razgrađuje od strane proteozoma. U uslovima hipoksije, hidroliza HIF1 α subjedinice je inhibirana, što dovodi do akumulacije navedenog molekula u citoplazmi. HIF1 α subjedinica prelazi u jedro, vezuje se za HIF1 β i omogućava transkripciju VEGF gena. VIP u uslovima hipoksije ne stimuliše transkripciju HIF1 gena, već povećava translokaciju HIF1 α iz citoplazme u jedro. S obzirom da VIP ne moduliše efekte inhibitora HIF1 α , smatra se da je njegovo dejstvo indirektno (**Slika 12**) [44].



Slika 12. Uticaj hipoksije i VIP-a na transkripciju VEGF gena i angiogenezu.

U prisustvu kiseonika **VHL protein** (engl.von Hippel Lindau tumor suppressor protein) omogućava ubikvitizaciju HIF1 α subjedinice ubikvitinom (**UB**). Ubikvitinacija je proces post-translacijske modifikacije proteina, koja nastaje povezivanjem jednog ili više ubikvitinskih monomera, preko kovalentne veze. Najznačajnija uloga ubikvitina je označavanje oproteina koji će se razgraditi u proteozomu. U hipoksičnim uslovima i pod uticajem VIP molekula HIF1 α subjedinica prelazi iz citoplazme u jedro i omogućava transkripciju gena za **VEGF** (vaskularni endotelijalni faktor rasta) i pokreće VEGF molekulom stimulisanu angiogenezu.

- 4) VIP sprečava apoptozu ćelija karcinoma prostate kroz fosforilaciju BAD proteina, koji ima značajnu ulogu u kompleksnom procesu apoptoze. BAD protein se visokom afinitetom vezuje za Bcl-XL antiapoptotički protein (protein iz familije Bcl-2 proteina) na membrani mitohondrija i pokreće apoptozu. VIP indukuje fosforilaciju BAD proteina na poziciji Ser112, aktivacijom VPAC1 i PKA. U fosforilaciji BAD proteina na poziciji Ser112 i Ser136 učestvuje i EGF (epidermalni faktor rasta) posredstvom Ras proteina. Fosforilacija BAD proteina na poziciji Ser112, Ser136 ili na obe pozicije omogućava interakciju BAD proteina sa 14-3-3 proteinom i zadržavanje BAD proteina u citoplazmi, čime je onemogućeno njegovo vezivanje za Bcl-XL protein na membrani mitohondrija, oslobađanje citohroma c, pokretanje kaspaza i apoptoze (**Slika 13**) [45].



Slika 13. Uticaj VIP-a na produžen ćelijski rast

1.2. Anti-VIP autoantitela

S obzirom na imunomodulatornu aktivnost VIP-a, kao i širok spektar bioloških uloga VIP molekula, jasno je da ovaj multifunkcionalni peptid mora biti pod strogom kontrolom u organizmu. Osnovnu ulogu u kontroli nivoa VIP u cirkulaciji imaju anti-VIP autoantitela.

Rezultati dva nezavisna istraživanja ukazuju da postoje dve vrste anti-VIP antitela: katalitička i neutrališuća antitela.

Paul i saradnici su pokazali da po završetku fizičke aktivnosti, dolazi do porasta anti-VIP antitela u cirkulaciji. Uloga ovih antitela je uklanjanje viška VIP-a sintetisanog u toku fizičke aktivnosti [46,47]. Anti-VIP antitela, koja su izučavali Paul i saradnici spadaju u grupu katalitičkih antitela, koja deluju kao enzimi. Navedena antitela predstavljaju VIP-aze, vezuju se za C-terminalni deo VIP-a i vrše njegovu proteolizu, tako što seku peptid između aminokiselina Lys20 i Lys21 i između aminokiselina Lys21 i Tyr22 [48].

Neurath i saradnici su ispitivali antitela kod HIV-1 pozitivnih pacijenata u različitim stadijumima bolesti. Ustanovili su da su antitela, koja se vežu za epitop unutar C-terminalnog kraja drugog konzerviranog regiona glikoproteina gp120, koji obuhvata aminokiseline 280-236 označenog kao peptid C2 (RSANFTDNAKTIIVQLNESVEINCTRP), prisutna samo u asimptomatskoj fazi bolesti. U terminalnom stadijumu bolesti nije zabeleženo prisustvo ovih antitela ni u jednom od 9 ispitivanih seruma. Izveden je zaključak da antitela, koja reaguju sa C peptidom u asimptomatskoj fazi bolesti, imaju protektivni efekat u razvoju SIDE (sindroma stečene imunodeficijencije) kod HIV-1 pozitivnih pacijenata, odnosno da usporavaju progresiju bolesti [49]. Polazeći od ovoga, Neurath i saradnici su predložili terapiju koja bi se zasnivala na održavanju visoke koncentracije ovih antitela kod HIV pacijenata, bilo aktivnom imunizacijom antigenima koji bi uključivali peptid 280 - 306, bilo pasivnom imunizacijom (direktnim unošenjem ovih antitela u cirkulaciju).

NTM peptid (selektovan iz C2 peptida glikoproteina gp120) je strukturno i informaciono sličan sa delom VIP-a koji uključuje FTD strukturni motiv (odgovoran za interakciju VIP-a sa VPAC1 receptorom) [20]. Antitela koja se vezuju za NTM peptid, anti-VIP/gp120 antitela, ne deluju kao VIP-aze, već predstavljaju neutrališuća antitela. Vezivanje anti-VIP/gp120 antitela za epitop na VIP-u, koji uključuje FTD strukturni motiv, blokira vezivanje vazoaktivnog

intestinalnog peptida za VPAC₁ receptor. Značajno je napomenuti da se neutrališuća anti-VIP/gp120 antitela, za razliku od VIP-aza, vezuju za N-terminalni deo VIP-a (**Slika 14**) [50].



Slika 14. Prikaz strukturnih motiva u primarnoj strukturi VIP-a, koji su odgovorni za interakciju VIP-a sa katalitičkim antitelima (VIP-aze, plavo) i neutrališućim antitelima (anti-VIP/gp120, crveno).

Testiranja seruma dobrovoljnih davalaca krvi na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela, pokazala su da približno 5 % zdravih osoba ima prirodno povećan titar ovih antitela u krvi [51].

1.2.1. Fizička aktivnost i anti-VIP/gp120 antitela

NTM peptid, koji vezuje anti-VIP/gp120 antitela, uključuje veoma efikasan T-ćelijski epitop, koji nije aktivan u humanom imunom sistemu [52-56]. Razlog za blokadu ovog T-ćelijskog epitopa najverovatnije je sličnost NTM peptida sa humanim imunoglobulinima, ali i brojnim drugim proteinima u organizmu (**Slika 15**) [49]. Visok stepen strukturne, funkcionalne i imunološke sličnosti gp120 proteina HIV-a sa humanim proteinima, posebno onim koji učestvuju u imunom odgovoru, predstavljaju glavnu prepreku u razvoju vakcine za SIDU [57].

Strukturna sličnost i imunološka krosreaktivnost glikoprotein gp120 sa VIP-om, izdvojili su VIP kao mogući prirodni molekul, koji bi mogao stimulisati proizvodnju anti-VIP/gp120 antitela. Izučavanje biohemijskih procesa vezanih za fizičku aktivnost pokazalo je da prilikom fizičkog vežbanja dolazi do porasta koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP-a) u krvi. Ispitivan je porast nivoa VIP-a tokom različitih oblika fizičke aktivnosti:

- kod zdravih osoba podvrgnutih fizičkoj vežbi u trajanju od 16 do 32 minuta, koncentracija VIP-a u plazmi je porasla sa 3.3 na 5.6 pmol/L [58];
- nakon tročasovne vožnje bicikla koncentracija VIP-a u plazmi se povećava sa 1.8 na 22.3 pmol/l [59];

- tokom vežbe vojnih specijalaca koja je trajala 5 dana i podrazumevala skoro neprekidnu fizičku aktivnost, nivo VIP-a u cirkulaciji je porastao od početnih 8.8 pmol/l na maksimalnih 23.4 pmol/l u toku drugog dana [60].

Izučavanjem anti-VIP autoantitela na populaciji zdravih ispitanika pokazano je da njih 8 od 33 imaju prirodno povišen nivo ovih antitela. S obzirom na raznoliku zastupljenost anti-VIP autoantitela kod 8 ispitanika, koja se kretala između 2,6% do 46,7%, izveden je zaključak da je sinteza ovih prirodnih autoantitela individualna karakteristika (razlikuje se od osobe do osobe) [46]. Detaljnije ispitivanje osoba sa povišenim nivoom ovih autoantitela u krvi, dovelo je do zaključka da fizička aktivnost ispitanika predstavljaju važan faktor, koji utiče na produkciju anti-VIP autoantitela. Prema rezultatima ovih istraživanja, specifična anti-VIP autoantitela bila su prisutna u povećanoj koncentraciji u plazmi, kod 29,6% zdravih ispitanika, koji su se redovno bavili fizičkom aktivnošću, a samo kod 2,3% ispitanika koji su vodili pasivan način života [47].

Konstanta vezivanja VIP-a za vipazu, enzim koji razgrađuje VIP u jetri, bubrezima i mozgu, je 80 do 1300 puta manja nego kada je u pitanju vezivanje VIP-a za anti-VIP autoantitela izolovana iz krvi osoba koje su se redovno bavile fizičkom aktivnošću [47]. Istraživanja su pokazala da je izvor anti-VIP autoantitela je veoma značajan kada je u pitanju njihova funkcija, pošto su Paul i saradnici otkrili da se osobine ovih antitela razlikuju u zavisnosti od toga da li su ona izolovana iz krvi zdravih osoba ili osoba obolelih od astme kod kojih je takođe povišen nivo ovih antitela [61].

peptid NTM	R S A N F T D N A K T I I V Q L N X S V E I N
	* * * * *
VIP	A V F T D N Y T L R L K Q M A V K K Y L N
	* * * * *
CD31	A N F T I Q K E D T I
	* * * * *
laminin	F Q E N A V E I T R Q T N E S
	* * * * *
platelet fac.	K K I I K K L L E S
	* * * * *
desmoplakin	K T T I H Q L
	* * * * *
biliary gp.	K T I I V
	* * * * *
IERP	T I H V Q L N D Y V D I
	* * * * *
ICAM-1	T I I V
	* * * *
IL-1-Rec.	I I V T L
	* * * * *
EGF-Rec.	I I - Q L N E
	* * * *
LDNAP	I I V K L
	* * * * *
c-erb-B2	I V Q L N Q
	* * * * *
CSF-1	I V Q L Q E S
	* * * *
IgVhIII	V Q L V E S
	* * * * *
CD28	V Q L Q Q S
	* * * * *
apoptosis protein	S V E I N C

Slika 15. Sličnost humanih proteina sa NTM peptidom, koji je selektovan iz C2 peptida glikoproteina gp120 omotača HIV virusa

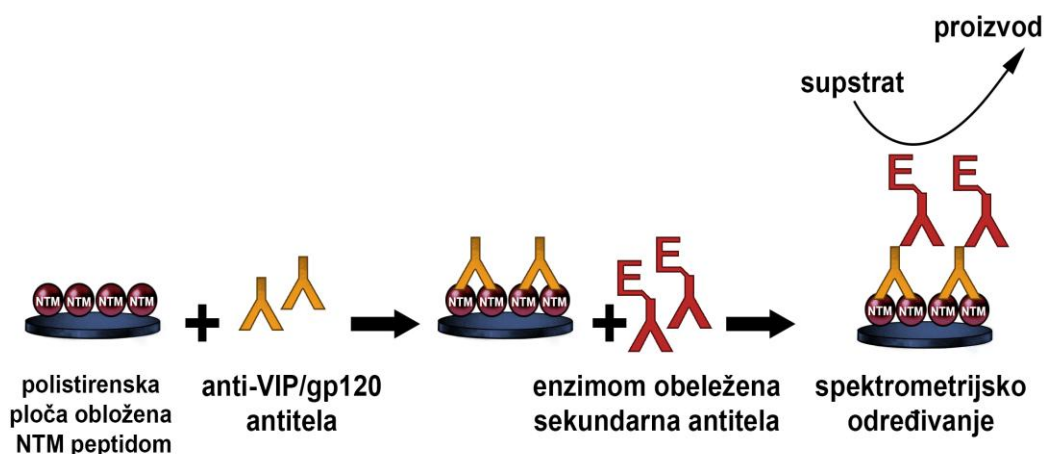
1.2.2. Detekcija anti-VIP/gp120 antitela

Za detekciju prirodnih anti-VIP/gp120 antitela ne postoji komercijalni test. U dosadašnjim istraživanjima za detekciju anti-VIP/gp120 antitela korišćena je ELISA metoda (direktan test). Mikrotitarska ploča je oblagana NTM peptidom, koji je korišćen kao antigen za detekciju anti-VIP/gp120 antitela [62]. Princip detekcije anti-VIP/gp120 antitela ELISA metodom prikazan je na **Slici 16**.

a)

VIP HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (28 aminokiselina)
NTM RSNFTDNAKTIIVQLNESVEIN (23 aminokiseline)

b)



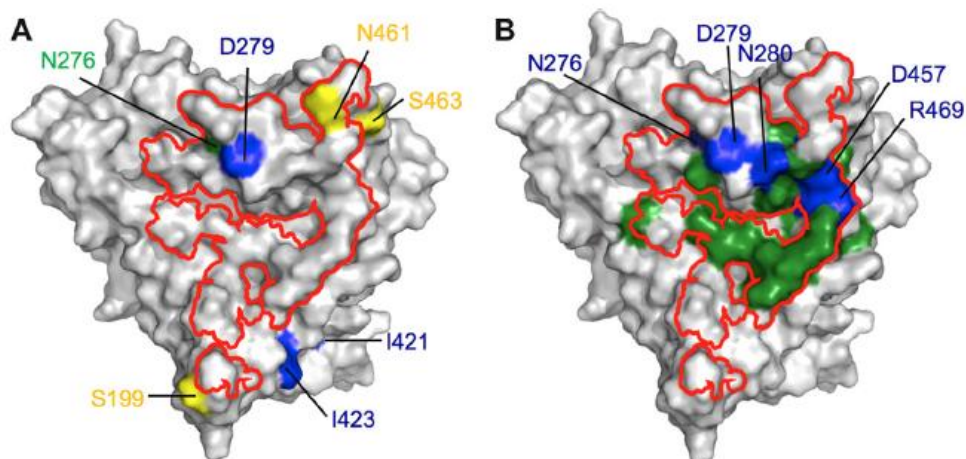
Slika 16. a) Poređenje primarne strukture NTM peptida i VIP-a; **b)** Princip detekcije anti-VIP/gp120 antitela ELISA metodom sa NTM peptidom

1.3. VRC01 antitelo

Jedan od najvećih izazova u borbi protiv HIV infekcije u poslednje dve decenije predstavlja razvoj efikasne i bezbedne vakcine protiv HIV virusa. Vakcina bi trebalo da stimuliše produkciju specifičnih antitela usmerenih na konzervirane epitope (epitopi koji ne podležu modifikaciji tokom mutacije HIV virusa). Do danas je izolovano nekoliko neutrališućih antitela usmerenih na konzervirane epitope glikoproteina gp120 i gp41 omotača HIV virusa [63]. Jedan od epitopa, za koga je izolovano više vrsta neutrališućih antitela predstavlja i mesto vezivanja CD4 receptora na glikoproteinu gp120. Ispitivana su neutrališuća antitela u eksperimentima sa makaki majmunima zaraženim SIV virusom (eng. simian immunodeficiency virus), koji je analog HIV virusa prisutan u populaciji majmuna. U navedenim eksperimentima pokazano je da ispitivana neutrališuća antitela ne kontrolišu replikaciju virusa (ne utiču na broj

virusnih kopija/ml), ali usporavanju razvoja bolesti. Nedavno je identifikovano VRC01 antitelo, koje neutrališe 90% najrasprostranjenijih izolata virusa HIV-1 [64]. Ovo antitelo je izolovano iz seruma sporo progresirajućih HIV pacijenata i deluje tako što sprečava infekciju HIV-1 virusom, vezivanjem za konzervirani domen C2 glikoproteina gp120, koji je odgovoran za interakciju virusa sa CD4 receptorom [65]. Kristalografske studije su pokazale da vezivanje VRC01 za gp120 uzrokuje konformacione promene slične onima koje indukuje CD4 receptor [66]. Epitop na glikoproteinu gp120 za neutrališuća VRC01 antitela uključuje aminokiseline N276 i D279. Mesto vezivanja receptora CD4 za glikoprotein gp120 uključuje njegove tri aminokiseline N276, D279 i N280, koje se nalaze u strukturnom motivu ANFTDN unutar peptide NTM, koji je homologan sa VIP-om (**Slika 17**).

Važno je naglasiti da antitela iz klase VRC nije moguće indukovati pomoću vakcine [64].



Mesto vezivanja VRC01 antitela
za glikoprotein gp120

Mesto vezivanja CD4 receptora za
glikoprotein gp120

Slika 17. 3D struktura glikoproteina gp120 sa odgovarajućim vezivnim mestima za VRC01 antitela i CD4 receptor

Falkowska E, Ramos A, Feng Y, Zhou T, Moquin S, Walker LM, Wu X, Seaman MS, Wrin T, Kwong PD, Wyatt RT, Mascola JR, Poignard P, Burton DR. PGVo4, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4. *J Virol.* 2012; 86:4394-4403.

1.4. Fizička aktivnost

Blagotvorni efekti, koje fizička aktivnost ima na ljudsko zdravlje, vezani su za "umerenu" fizičku aktivnost, a ne intenzivno vežbanje. Epidemiološki podaci sugerišu da "umereno" fizičko vežbanje pozitivno utiče na imuni sistem. Umerena fizička aktivnost smanjuje za 29% učestalost infekcije gornjih disajnih puteva, dok intenzivna fizička aktivnost, koja se odvija u dužem vremenskom periodu (npr. maraton), povećava rizik od infekcije disajnih puteva. Jedan od mogućih razloga povećanog rizika je inhibicija NK ćelija tokom produženog fizičkog vežbanja pojačanog intenziteta [67].

Povećana fizička aktivnost (90-95% VO_2 Max) može dovesti do hipertrofije srčanog mišića, iako nema jasnih dokaza da ova promena utiče na povećanje morbiditeta i mortaliteta [68]. Prema rezultatima nekih studija intenzivno vežbanje, kod zdravih osoba, može dovesti do porasta endorfina i tako uzrokovati „vežbanjem indukovanu euforiju“ i stvaranje zavisnosti [69]. Navedeni efekti nisu uočeni kod umerene fizičke aktivnosti.

Postoje značajne varijacije u individualnom odgovoru na fizičko vežbanje. Aerobno vežbanje kod jednog dela populacije doprinosi udvostručavanju iskoristljivosti kiseonika, dok je kod drugog dela populacije ovaj efekat manji ili u potpunosti izostaje [70]. Studije su pokazale da efekat koji fizička aktivnost ima na ljudsko zdravlje ne mora biti trenutni. Fizičko vežbanje u mlađim danima doprinosi poboljšanju fizičkih sposobnosti u poznim godinama [71]. Pored brojnih studija, koje su pratile efekte fizičke aktivnosti na zdravlje, malo je onih koje predlažu konkretne mehanizme ovog preventivnog i terapijskog efekta fizičke aktivnosti.

Najekonomičniji izvor energije za mišićni rad su aerobni biohemijski procesi. Aerobni procesi su relativno spori i odvijaju se brzinom, koja je približno jednaka 1/3 brzine kojom se razlaže ATP. Ovo uslovljava da fizička aktivnost, koja koristi energiju iz ovog izvora, mora biti nižeg intenziteta. Sa druge strane, u energetske pogledu aerobni procesi su daleko ekonomičniji, jer obezbeđuju 20 puta veću količinu ATP-a u odnosu na anaerobne procese pri istom utrošku glikogena.

Najveći aerobni efekat imaju one vežbe, koje angažuju velike grupe mišića uz povećanje nivoa: srčane aktivnosti, brzine disanja i telesne temperature. Plivanje, angažuje praktično celokupnu muskulaturu, dok trčanje i

hod angažuju relativno velike grupe mišića, ali ne u tolikoj meri kao plivanje. Iz navedenih razloga efekti trčanja i hoda u većoj meri zavise od intenziteta aktivnosti (ista količina energije i kiseonika utroši se u toku 30 minuta laganog trčanja , 10 - 20 minuta intenzivnog trčanja i u toku jednog sata hoda).

Poznavanje stepena fizičke sposobnosti i optimalne doze opterećenja od presudnog je značaja, kako za uspeh vežbanja, tako i za izbegavanje komplikacija koje mogu nastati u toku vežbanja.

Svaki trening bi trebao da traje između 20 i 60 minuta sa ponavljanjem od 2-3 puta nedeljno (učestalost) i sa intenzitetom od 50-80% maksimalne srčane frekvencije (maksimalnog broja otkucaja). Tokom prvih petnaest minuta aerobne aktivnost glavni izvor energije je glikogen. Nakon 15-20 minuta vežbanja energija za mišićni rad se dobija sagorevanjem (metabolisanjem) masti. Ovo je i razlog zbog koga bi aerobni trening trebao da traje najmanje 30 minuta. Tokom aerobnih treninga dužih od jednog časa, organizam nastavlja da sagoreva masti ali ne istom brzinom kao u prvih sat vremena. Učestalosti aerobnih vežbi ne bi trebalo da bude veća od pet puta nedeljno, jer preterana fizička aktivnost ne pruža mogućnost potpunog oporavka, čime se smanjuje otpornost organizma i veća podložnost za razvoj različitih oboljenja.

1.4.1. Fizička aktivnost i virus humane imunodeficijencije

HIV infekcija povezana je sa gubitkom mišićne mase, mišićnom slabošću, umorom, smanjenjem radne sposobnosti, depresijom i generalno smanjenjem kvaliteta života pacijenata. Fizička aktivnost pozitivno deluje na smanjenje ovih efekata, s obzirom da doprinosi poboljšanju fizičkih i psihičkih sposobnosti HIV pacijenata. Intenzivna fizička aktivnost smanjuje efikasnost imunog sistema (povećava sintezu inflamatornih interleukina TNF α , IL6) i samim tim pogoduje razvoju SIDA, zbog čega se HIV pozitivnim pacijentima preporučuje samo umerena fizička aktivnost. Primećeno je da postoji različit uticaj fizičke aktivnosti na parametre koji se koriste za praćenje HIV pacijenata (broj virusnih kopija/ml i broj CD4 ćelija). Prema literaturnim podacima fizička aktivnost ne utiče na broj CD4 ćelija, ali je registrovan srednji pad broja virusnih kopija (0.65 log₁₀ kopija) kod HIV pacijenata koji su bili izloženi umerenoj i intenzivnoj fizičkoj aktivnosti, u odnosu na kontrolnu grupu. Najveći pad broja virusnih

kopija ($0.9 \log_{10}$ kopija) bio je u grupi pacijenata, koja je vežbala umerenim intenzitetom [72,73].

Istraživanja su pokazala da je za HIV pacijente optimalno da vežbaju najmanje tri puta nedeljno u trajanju od 20-40 minuta [74]. Program vežbi, koji se preporučuje HIV pozitivnim pacijentima, uključuje aerobne vežbe, vežbe istezanja i vežbe snage. Fizička aktivnost je delotvornija kod mlađih u odnosu na starije HIV pacijente. U većini studija se navodi da je mali broj uzoraka prepreka da bi se detaljnije ispitali pozitivni efekti, koje fizička aktivnost ima na kvalitet života HIV pacijenata.

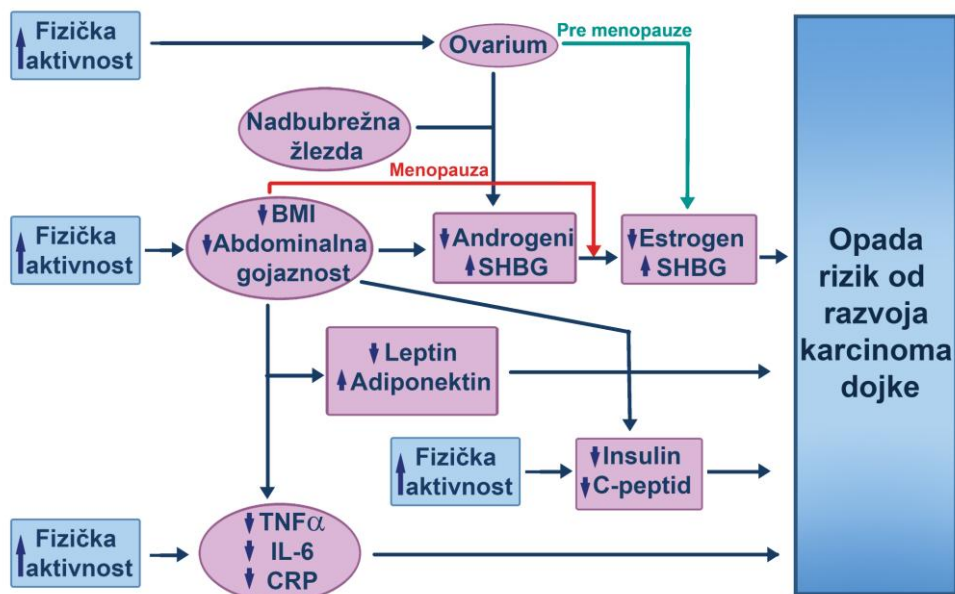
1.4.2.Fizička aktivnost i karcinom dojke

Brojne populacione i kliničke studije su ispitivale preventivne efekte, koje fizičke aktivnosti ima na razvoj karcinoma dojke, a izvedeni zaključci su veoma raznoliki. Podaci iz populacione studije, koja je obuhvatila 218.169 žena iz devet evropskih zemalja, starosti od 20 do 80 godina, pokazuju da je fizička aktivnost povezana sa značajnim smanjenjem rizika od pojave raka dojke kod žena u menopauzi [75]. Prema populacionoj studiji rađenoj u Japanu na 21.353 žena, fizičko vežbanje (dva puta nedeljno ili češće), smanjuje rizik od raka dojke bez obzira na status menopauze [76].

Redovna fizička aktivnost u toku akademskog i preakademskog školovanja smanjuje rizik od raka dojke tokom celog života [77,78].

Grupa autora objavila je rad, koji je objedinio različita istraživanja iz ove oblasti. Prema autorima 29 od 73 objavljene studije (40%) ukazuju da postoji statistički značajno smanjenje rizika za razvoj tumora dojke kod žena koje se bave fizičkom aktivnošću u odnosu na žene, koje vode pasivan način života. Prosečna vrednost smanjenja rizika je oko 25% [79].

Predloženi su brojni biološki mehanizmi preventivnog delovanja fizičke aktivnosti, ali nijedan u potpunosti nije definisao jasnu uzročno-posledičnu vezu. Potpuno razjašnjenje uzročno–posledične veze između karcinoma dojke i fizičke aktivnosti otežava veliki broj fizioloških činilaca i signalnih puteva uključenih u kancerogenezu i u fiziološke procese koje pokreće fizička aktivnost.



Slika 18. Algoritam predloženih mehanizama koji imaju ulogu u preventivnom delovanju fizičke aktivnosti

Gojaznost predstavlja faktor rizika za nastanak karcinoma dojke kod žena u menopauzi, dok kod žena pre menopauze gojaznost ima i određeni protektivni efekat, s obzirom da je povezana sa smanjenim brojem ovulacija. Studije pokazuju da se kod žena u menopauzi povećava rizik za 12% na svaki porast BMI od 5kg/m^2 (npr. porast BMI sa 25kg/m^2 na 30kg/m^2). Mnoge studije u zadnjih 30 godina pokazuju da je smrtnost veća kod gojaznih žena kojima se dijagnostikuje karcinom dojke u odnosu na smrtnost žena sa normalnom telesnom težinom. Žene sa invazivnim karcinomima dojke i $\text{BMI} > 25\text{kg/m}^2$ imaju 2,5 puta veći rizik za smrtni ishod u narednih pet godina od postavljanja dijagnoze u odnosu na žene sa vrednostima $\text{BMI} < 21\text{kg/m}^2$. Umerena fizička aktivnost (brza šetnja 120 minuta/nedeljno), povezana je sa skromnim, ali povoljnim promenama telesne težine, koje smanjuju mortalitet među ženama obolelim od karcinoma dojke [80].

Dugotrajno prisustvo blago povišenih koncentracija inflamatornih molekula u krvi $\text{TNF}\alpha$, IL-6, CRP i serumskog amiloida A (SAA) povezano je sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke. Navedeni markeri inflamacije najverovatnije utiču na apoptozu, proliferaciju, angiogenezu malignih ćelija, kao i širenje maligno transformisanih ćelija do udaljenih organa i tkiva (metastaziranje). Ustanovljeno je da fizička aktivnost, za sada nepoznatim mehanizmima, suzbija hroničnu inflamaciju, kroz redukciju telesne težine i

uticajem na distribuciju masnog tkiva u organizmu. Inflamatorni molekuli u velikoj meri koreliraju sa telesnom težinom. Do danas je malo poznat mehanizam uticaja fizičke aktivnosti na TNF α , IL-6 i CRP [80].

1.4.3. Fizička aktivnost i karcinom prostate

Rezultat obimne studije, koja je obuhvatila pregled literature i meta-analizu 19 populacionih i 24 kliničke studije sa ukupno 88 294 pacijenta, ukazuje da postoji veza između fizičke aktivnosti i smanjenog rizika za razvoj tumora prostate. Na osnovu rezultata ove analize izveden je zaključak da fizička aktivnost, bilo da je vezana za profesionalno bavljenje sportom ili rekreaciju, smanjuje rizik od nastanka karcinoma prostate [81].

Studija, koja je uključila 1455 pacijenata obolelih od karcinomom prostate, pokazala je da tri sata nedeljno brze šetnje u značajnoj meri može da uspori ili potpuno obustavi progresiju bolesti [82].

Na osnovu analize 2.750 muškaraca s dijagnozom raka prostate pokazano je da intenzivna fizičke aktivnosti (biciklizam, tenis, trčanje, plivanje) u trajanju od tri sata nedeljno, mogu značajno smanjiti smrtnost od raka prostate [83].

2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

- 1.** Dizajniranje i analitička optimizacija ELISA testa za detekciju anti-VIP/gp120 antitela
- 2.** Ispitivanje prisustva anti-VIP/gp120 antitela kod:
 - zdrave, fizički neaktivne, kontrolne grupe muškaraca i žena;
 - sportista (ispitivanje uticaja različitih sportskih disciplina na produkciju anti-VIP/gp120 antitela)
 - HIV pozitivnih pacijenata u asimptomatskoj fazi bolesti;
 - pacijenata obolelih od karcinoma dojke i prostate;
- 3.** Ispitivanje uticaja fizičke aktivnosti na promenu koncentracije anti-VIP/gp120 antitela u serumima sportista, pre i nakon opterećenja.
- 4.** Utvrđivanje mogućeg imunološkog mehanizma preventivnog delovanja fizičke aktivnosti kod sindroma humane imunodeficijencije (SIDE), kao i razvoja tumora dojke i prostate.
- 5.** Određivanje, primenom bioinformatičke metode, mesta vezivanja VIP-a na receptoru VPAC₁, kao mogućeg terapijskog targeta za SIDU , tumore dojke i prostate.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo 149 ispitanika, od toga 62 žene i 87 muškaraca, prikazanih u Tabeli 1. Ispitivani su uzorci pacijenata, koji nisu bili na imunosupresivnoj terapiji i kod svih ispitanika je određivana samo specifična promena u nivou anti-VIP/gp120 antitela.

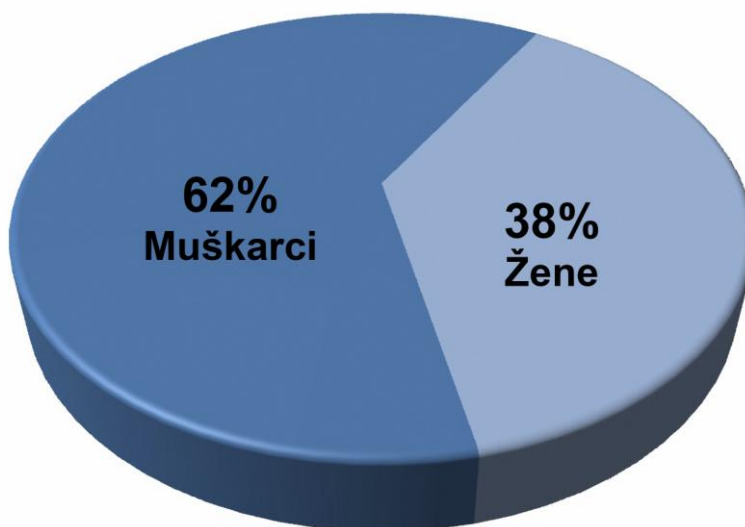
Tabela 1.

Ispitanici	Ukupno	Muškarci	Žene	Godine života
Sportisti	73	45	28	17-24
Kontrolna grupa	37	20	17	18-26
Karcinom dojke	15	-	15	36-64
Karcinom prostate	17	17	-	48-70
HIV pozitivni pacijenti	7	5	2	29-46

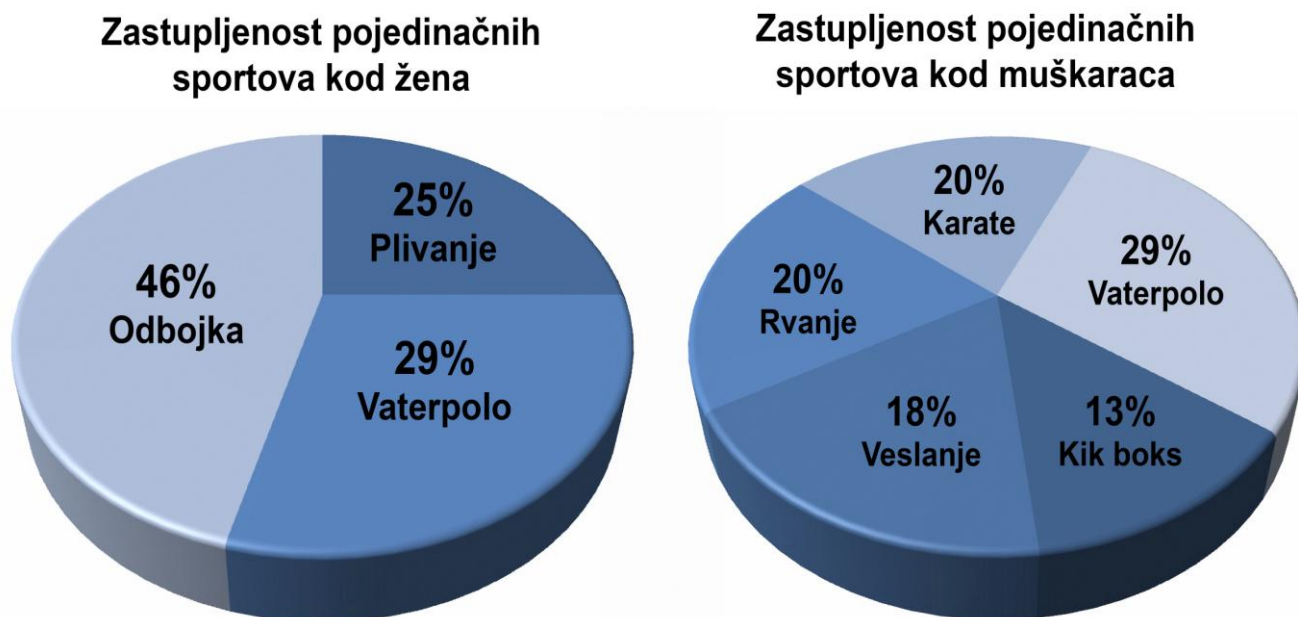
A. Sportisti

U ovom radu ispitivano je prisustvo anti-VIP/gp120 antitela u grupi aktivnih sportista, koji su bili u dobrom opštem stanju, ukupna IgG antitela su bila u granicama referentnog intervala (IgG 11 ± 2.9 g/l, referentni interval 7-16 g/l), negirali su povrede u toku tekuće takmičarske sezone i nisu bili ni pod kakvom terapijom. Na **Slici 19** prikazana je distribucija svih ispitanika, koja je uključivala 28 žena (38%) i 45 muškaraca (62%). Na osnovu ostvarenih rezultata svi ispitanici su rangirani u skladu sa nacionalnom kategorizacijom sportista. Prosečan trenažni staž za žene je bio $11,5 \pm 6,3$ godine, a za muškarce $12,1 \pm 4,2$ godine. Uzorci sportista su sakupljeni četiri nedelje pre takmičarskog trenažnog perioda, osim u slučaju 17 vaterpolista, čiji su uzorci testirani pre i 30 minuta posle treninga. Svi sportisti su bili na aktivnom odmoru, koji je podrazumevao treninge malog intenziteta 1-2h dnevno.

U grupi sportistkinja najzastupljenije su bile odbojkašice 13(46%), vaterpolistkinje 8 (29%) i plivačice 7 (25%). Grupu sportista činili su vaterpolisti 13 (29%), veslači 8 (18%), rvači 9 (20%), karatisti 9 (20%) i kik bokseri 6 (13%).



Slika 19. Distribucija sportista po polu



Slika 20. Zastupljenost pojedinačnih sportova u ispitivanoj grupi aktivnih sportista (žene i muškarci)

B. Kontrolna grupa

Kontrolna grupa je bila sastavljena od zdravih, fizički neaktivnih osoba, koje dnevno rade na računaru 6-8 sati i rekreativno se ne bavi fizičkom aktivnošću. Grupu od 37 ispitanika činilo je 20 muškaraca i 17 žena. Starost ispitanika kontrolne grupe odgovarala je starosti ispitivanih sportista. Ispitanici u kontrolnoj grupi negirali su pušenje, konzumiranje alkohola, hronične bolesti, kao i druge faktore rizika koji bi mogli da utiču na imuni sistem.

C. Pacijenti oboleli od karcinoma dojke i prostate

Ispitivani su uzorci 15 žena sa karcinomom dojke, starosti od 36 do 64 godine, kao i 17 muškaraca sa karcinomom prostate, starosti od 48 do 70 godina. Pacijenti su bili u različitim stadijumima bolesti (od II do IV stadijuma), ali su svi pacijenti imali normalne vrednosti ukupnih IgG antitela i nisu bili podvrgnuti imunosupresivnoj terapiji (IgG 11 ± 2.7 g/l, referentni interval 7-16 g/l).

D. HIV pozitivni pacijenti

Gruppu HIV pozitivnih pacijenata činilo je 7 ispitanika. Pet ispitanika nije bilo na terapiji, a dvoje je primalo HAART (eng. Highly Active Anti-Retroviral Therapy). Za svakog pacijenta određen je broj CD4 ćelija i broj virusnih kopija/ml (eng. viral load). Svi pacijenti su svrstani u HIV progresore, jer je u proseku prošlo 6 godina od infekcije do određivanja anti-VIP/gp120 antitela.

3.2. Sakupljanje i čuvanje uzoraka krvi

Uzorci krvi su sakupljeni posle noćnog gladovanja i u slučaju sportista, 24h nakon poslednjeg treninga u 9 ujutru u vakutajnerima (BD Vacutainer SST II Advance). Izuzetak je napravljen kod ispitivanja uticaja fizičke aktivnosti na produkciju anti-VIP/gp120 antitela, kada su uzorci sportista sakupljeni 30 minuta nakon treninga. Sakupljeni uzorci krvi su potom centrifugirani, a zatim su serumi zamrzavani i čuvani na -80°C do određivanja. Eksperimenti su rađeni u saradnji sa Institutom za nuklearne nauke „Vinča“, Centrom za medicinsku biohemiju KCS, Fakultetom sporta i fizičkog vaspitanja, Institutom za transfuziju krvi Srbije, laboratorijom Poliklinike "Labea Medica Dijagnostika", Institutom za biomedicinska istraživanja "Georg-Speyer-Haus", Nemačka i laboratorijom za organsku hemiju i biohemiju Univerziteta u Janjini, Grčka. Svi učesnici u studiji su pre uzimanja krvi davali pisanu saglasnost i popunjavali su upitnik.

3.3. ELISA metoda za detekciju anti-VIP/gp120 antitela

Enzimski imunodređivanja (eng. Enzyme Immuno Assays-EIA) koriste enzime kao obeleživače za detekciju i kvantifikaciju u imunološkim reakcijama. U toku testa sa ligandom prvo reaguju enzimski obeležena antitela, nakon čega se dodaje enzimski supstrat. U zavisnosti od vrste supstrata detekcija može da bude fotometrijska, fluorescentna ili hemiluminiscentna.

ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je heterogena EIA tehnika u kojoj je jedna od reakcionih komponenti nespecifično adsorbovana ili kovalentno vezana za površinu čvrste faze (bazen mikrotitarske ploče). Kada je protein (antigen ili antitelo) vezan za čvrstu fazu, molekuli vode koji okružuju protein su pravilnije organizovani nego u rastvoru. Ovakva organizacija

molekula vode doprinosi lakšem stvaranju nekovalentnih veza, kao što su van der Valsove interakcije. U takvim uslovima se postiže niži nivo detekcije s obzirom da je olakšano formiranje kompleksa antigena i antitela [84,85].

ELISA metoda može da se izvodi u nekoliko oblika. Ukoliko je antitelo imobilisano za čvrstu fazu, radi se o tzv. "sendvič" metodama, koje služe za detekciju antigena. Kada je imobilisan antigen radi se o direktnim ili indirektnim testovima, koji se obično koriste za analizu imunog odgovora na antigen [86]. U ovom radu je primenjen heterogeni direktni ELISA test, kojim je ispitivan imuni odgovor na peptidni NTM1 molekul.

Detekcija prirodnih anti-VIP/gp120 antitela je zahtevala dizajniranje posebanog ELISA testa, jer komercijalni test za određivanje ovih prirodnih autoantitela nije prisutan na tržištu. Za postupak optimizacije metode korišćeni su serumi u kojima je očekivano povišeno prisustvo anti-VIP/gp120 antitela (serumi sportista) i uzorci seruma u kojima je očekivan snižen nivo anti-VIP/gp120 antitela, koji je iznad detekcionog limita (serumi zdravih dobrovoljnih davalaca krvi) [100].

3.3.1. Hemikalije, reagensi i rastvori za ELISA detekciju anti-VIP/gp120 antitela

A. Hemikalije

1. Primarni kalijum hidrogenfosfat (KH_2PO_4)
2. Sekundarni natrijum hidrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
3. Natrijum karbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
4. Natrijum hidrogenkarbonat (NaHCO_3)
5. Natrijum hlorid (NaCl)
6. Kalijum hlorid (KCl)
7. Natrijum hidroksid (NaOH)
8. BSA (Bovine Serum Albumin fraction V),
9. Tween20,
10. Peptid za oblaganje ploče $(\text{NTM1})_4\text{-SOC}_4$, sintetisan na Hemijskom fakultetu, Univerzitet u Janjini, Grčka

B. Reagensi

1. Supstrat za alkalnu fosfatazu preuzet je iz komercijalnog testa za određivanje alkalne fosfataze
 - **R1:** Dietanolamin pufer 1,25 mol/L, pH 10,2
Magnezijum hlorid 0,625 mmol/L
 - **R2:** p-Nitrofenil fosfat 50 mmol/L
2. Sekundarna antitela su kozja anti-humana IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom

C. Rastvori

Za određivanje anti-VIP/gp120 antitela pripremljeni su navedeni rastvori:

1. Bikarbonatni pufer (pufer za oblaganje) pH 9,6

- natrijum karbonat, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ 28,6 g
- natrijum hidrogenkarbonat, NaHCO_3 8,4 g
- destilovana voda H_2O do 1000 ml

2. Fosfatni pufer pH 7.4

- primarni kalijum hidrogenfosfat, KH_2PO_4 0,2 g
- sekundarni natrijum hidrogenfosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g
- natrijum hlorid, NaCl 8,0 g
- kalijum hlorid, KCl 0,2 g
- destilovana voda, H_2O do 1000 ml

Fosfatni i bikarbonatni puferi su sterilisani na 110°C i do upotrebe čuvani na $+4^\circ\text{C}$.

3. Rastvor BSA u fosfatnom puferu

Tokom eksperimenta je korišćen 5% BSA u fosfatnom puferu. Rastvor je čuvani na $+4^\circ\text{C}$.

4. Rastvor za ispiranje

Za ispiranje ploče korišćen je 0,05% Tween u fosfatnom puferu, koji je dobijen rastvaranjem 0,5 mL Tween 20 (deterdžent) u 1L fosfatnog pufera.

5. Supstrat

Za detekciju sekundarnih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom korišćen je p-nitrofenil-fosfat u DEA puferu. Neposredno pred korišćenje je rastvaran p-nitrofenil-fosfat u odnosu 1:10 u DEA puferu.

6. Rastvor za zaustavljanje reakcije

Nakon dodatka supstrata za alkalnu-fosfatazu, reakcija se zaustavlja sa 3M NaOH

3.3.2. Peptid (NTM1)₄-SOC₄ za detekciju anti-VIP/gp120 antitela

Postupak za sintezu peptida za oblaganje ploče, prema uputstvima saradnika sa Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Janjini, Grčka, koji su sintetisali peptid. Postupak je podrazumevao sintezu konjugata (NTM1)₄-SOC₄ manuelnim putem sa višestepenim postupkom sinteze peptida na čvrstoj fazi uz korišćenje BOC-Gly-OCH₂-Pam smole (1g, kapacitet 0,25 mmol/g).

Oligopeptidni nosač (eng. Sequential Oligopeptide Carrier, SOC_n) za NTM1 peptid sačinjen je od ponavljajućeg niza Lys-Aib-Gly. Procedura sinteze podrazumeva:

- kuplovanje korak po korak zasićenih ostataka aminokiselina, korišćenjem kompatibilnih grupa tetrabutiloksikarbonil(Boc)/benzil(Bzl) na SOC₄ nosač na smoli. Lizin se uvodi u obliku Boc-Lys(Fmoc)-OH. Fmoc je 9-fluorenilmetiloksikarbonil grupa.
- Posle uklanjanja Fmoc protektivne grupe sa ε-amino grupe lizina uz pomoć 20% piperidina u dimetilformamidu, sinteza epitopa FTDNAKTI (NTM1 peptid) je vršena simultanim vezivanjem svake rezidue u četiri kopije. Treonin je uvođen kao Boc-Thr(Bzl)-OH, lizin kao Boc-Lys(2,6-Di-Cl-Bzl)-OH i asparaginska kiselina kao Boc-Asp(OBzl)-OH.
- Peptid je odvojen od smole korišćenjem tečnog fluorovodonika (HF) u prisustvu fenola i anizola u toku 30 minuta na -8°C i 1,5 h na 0°C.
- Ekstrakcija je izvršena sa 2M sirćetnom kiselinom.

Peptid dobijen navedenim postupkom prečišćen je korišćenjem reverzno fazne HPLC (eng. high pressure liquid chromatography) tehnike na semipreparativnoj koloni C₁₈ (25 cm x 10 mm, 5 μm). Eluent A je bila 0,1% trifluorosirćetna kiselina u vodi, a eluent B 0,1% trifluorosirćetna kiselina u acetonitrilu. Linearni gradijent je bio 20% do 40% acetonitrila u 0,1% trifluorosirćetnoj kiselini, pri protoku brzine od 4,7 ml/min u toku 30 minuta. Detekcija je rađena na λ=214 nm.

Prečišćeni peptid je potvrđen pomoću analitičke reverzno fazne HPLC metode (t_R=13,2 min) i ESI-MS masene spektrometrije. Karakterizacija strukture je izvršena pomoću nuklearne magnetne rezonance i molekulskog modelovanja.

3.3.3. Postupak za detekciju anti-VIP/gp120 antitela

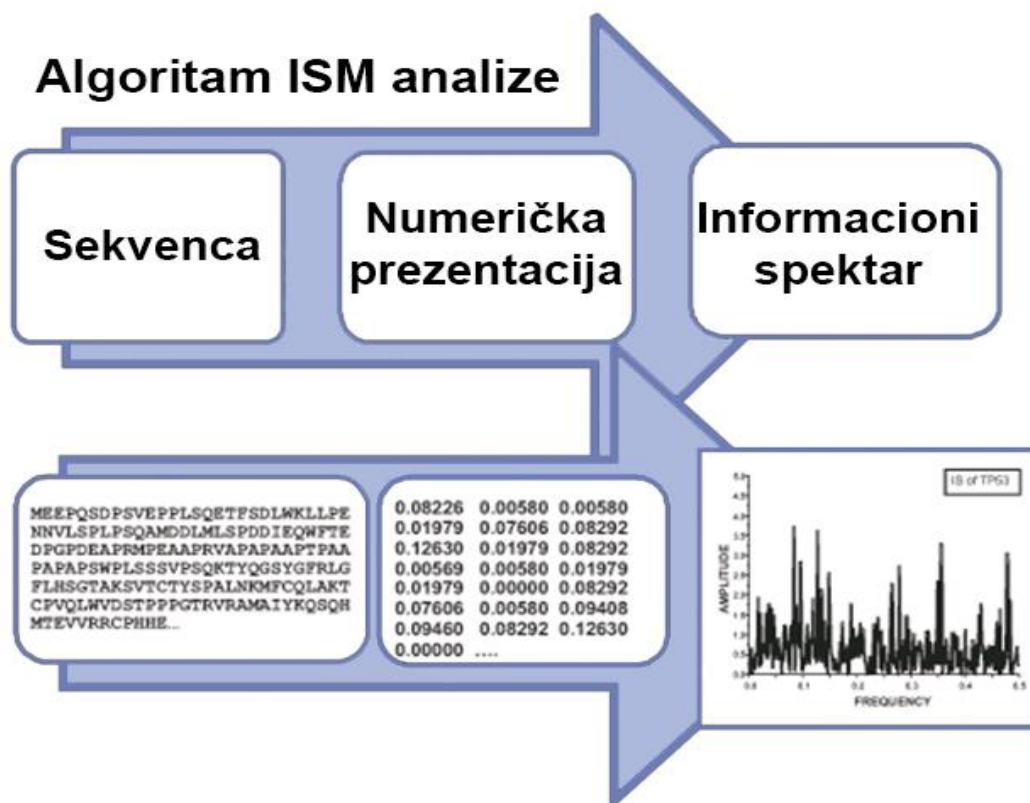
Postupak za detekciju anti-VIP/gp120 antitela, koji je rezultat optimizacije metode podrazumeva sledeće korake:

- 1.** Oblaganje mikrotitarske ploče sa 1 μg peptida (NTM1)₄-SOC₄/otvoru u duplikatu za svaki ispitivan uzorak. Istovremeno se za isti uzorak ploča oblaže sa 0,5 μg SOC₄/otvoru u cilju merenja signala koji potiče od nespecifičnog vezivanja antitela za oligopeptidni nosač SOC_n. Na ploči se nalaze četiri polja za kontrolu kontaminacije ploče tokom izvođenja ELISA metode (eng. *ELISA background signal*). Od pomenuta četiri kontrolna polja, na dva polja se nalazi samo pufer za oblaganje bez peptida (ispituje se nespecifično vezivanje antitela za mikrotitarsku ploču) i dva polja u kojima se ne dodaju primarna antitela (uzorak seruma), već samo sekundarna antitela (ispituje se nespecifično vezivanje sekundarnih antitela za peptid). Prihvataju se rezultati samo sa mikrotitarske ploče, koji imaju zanemarljivo niske signale na kontrolnim poljima. Svako polje ploče je obloženo sa 100 μl rastvora/otvoru.
- 2.** Obložena ploča se inkubira preko noći na temperaturi +4 C° u frižideru.
- 3.** Ciklus od 6 ispiranja sa 300 μl rastvora za ispiranje.
- 4.** Blokiranje ploče sa 200 μl 5% BSA u fosfatnom puferu. Blokiranje traje 2h na sobnoj temperaturi.

5. Ciklus od 6 ispiranja sa 300 μ l rastvora za ispiranje.
6. Nanošenje 100 μ l rastvora primarnih antitela. Rastvor primarnih antitela je rastvor dobijen razblaženjem seruma u 5% BSA u odnosu 1:100. Primarna antitela se ne nanose u kontrolna polja obložena peptidom i SOC nosačem. Ploča sa primarnim antitelima se inkubira 4h na sobnoj temperaturi.
7. Ciklus od 6 ispiranja sa 300 μ l rastvora za ispiranje.
8. Nanošenje 200 μ l rastvora sekundarnih antitela. Rastvor sekundarnih antitela čine kozja anti-humana IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom, razblažena u odnosu 1:2500 sa 5%BSA.
9. Ciklus od 6 ispiranja sa 300 μ l rastvora za ispiranje.
Za detekciju se dodaje 100 μ l supstrat p-nitrofenilfosfata. Reakcija se zaustavlja za 15 minuta sa rastvorom 3M NaOH. Apsorbancija se očitava na 405/620 nm.

3.4. Metoda informacionih spektara (ISM) korišćena za analizu VIP/VPAC interakcije

Funkcionalne osobine proteina i DNK molekula definisane su raspodelom strukturnih motiva (sekvenci) sa određenim fizičko-hemijskim karakteristikama, koji se periodično ponavljaju u primarnim strukturama navedenih makromolekula. Metod informacionih spektara (ISM metod) predstavlja virtuelnu spektroskopsku tehniku, koja omogućava analizu raspodele aminokiselinskih ili nukleotidnih motiva, koji određuju biološku funkciju proteinskih i nukleotidnih sekvenci. U tekstu koji sledi biće opisane osnovne karakteristike ovog bioinformatičkog metoda [87-90].



Slika 21. Šematski prikaz ISM metode

U okviru ovog metoda svaka sekvenca, izgrađena od N aminokiselna ili nukleotida, tretira se kao linearni niz od N članova. Svakom članu niza pridružuje se određena težinska (numerička) vrednost. Numerička vrednost koja se dodeljuje komponentama sekvence predstavlja vrednost potencijala elektron-jon interakcije (eng. *electron-ion interaction potential*, EIIP) [91,92]. Potencijal elektron-jon interakcije određuje elektronske osobine aminokiselina i nukleotida, koje su bitne za njihovu biološku funkciju [93]. U **Tabeli 2** date su vrednosti potencijala elektron-jon interakcije izračunate za 20 aminokiselina.

U prvom koraku analize proteina primenom ISM metode, prevodimo alfabetski kod, kojim je predstavljen redosled aminokiselina u primarnoj strukturi proteina, u numerički niz (**Slika 21**).

Tabela 2. Vrednosti potencijala elektron-jon interakcije za aminokiseline

Aminokiselina	Potencijal elektron-jon interakcije (Ry*)
Leu (L)	0.0000
Ile (I)	0.0000
Asn (N)	0.0036
Gly (G)	0.0050
Val (V)	0.0057
Glu (E)	0.0058
Pro (P)	0.0198
His (H)	0.0242
Lys (K)	0.0371
Ala (A)	0.0373
Tyr (Y)	0.0516
Trp (W)	0.0548
Gln (Q)	0.0761
Met (M)	0.0823
Ser (S)	0.0829
Cis (C)	0.0829
Thr (T)	0.0941
Phe (F)	0.0946
Arg (R)	0.0959
Asp (D)	0.1263

* 1 Ry = 13.61 eV

Dobijeni numerički niz u narednim koracima se tretira kao konačan diskretni signal. U slučaju proteinskih sekvenci diskretni signal ima 20 mogućih vrednosti, a u slučaju nukleinskih sekvenci ima 4 moguće vrednosti. S obzirom na strukturu peptidne veze, može se usvojiti aproksimacija da se bočni nizovi aminokiselina u proteinu nalaze na približno jednakim rastojanjima. Ista pretpostavka važi i za rastojanje između nukleinskih baza u nukleinskim kiselinama. Rastojanje u sekvencama je ekvidistantno ($d=1$). Iz navedenog sledi da je maksimalna frekvencija koja se može analizirati u frekventnom domenu:

$$F = 1 / 2d = 0.5$$

Važno je uočiti da frekventni opseg u kome se vrši analiza ne zavisi od broja tačaka sekvence. Ukupan broj tačaka sekvence utiče isključivo na rezoluciju spektra. U slučaju niza od N tačaka rezolucija u spektru je definisana kao: $f=1/N$.

Svaka spektralna funkcija diskretnog niza je diskretna funkcija i n -ta tačka ove funkcije odgovara frekvenciji:

$$f(n) = n \rightarrow f = n / N$$

Minimalan broj tačaka, koji se može analizirati, određen je željenom rezolucijom spektra.

Prevođenjem genskih sekvenci u numerički niz, moguće je egzaktno odrediti razlike i sličnosti ovakvih nizova. Poznato je iz teorije signala da se za određivanje sličnosti i zajedničkih komponenti numeričkih nizova koristi unakrsna spektralna analiza. Unakrsna analiza primenjuje se i u cilju utvrđivanja sličnosti genskih sekvenci.

Sledeći korak u ISM analizi podrazumeva transformaciju numeričkog niza u frekventni domen primenom diskretne Furijeove transformacije (DFT), koja je definisana na sledeći način:

$$X(n) = \sum_{m=1}^N x(m) e^{-j(2\pi/N)nm}$$

gde je $x(m)$ m -ti član analiziranog numeričkog niza, N ukupan broj tačaka niza, dok je $X(n)$ n -ti koeficijent DFT.

Koeficijenti DFT opisuju amplitudu, fazu i frekvencu sinusoida od kojih se sastoji originalni diskretni signal. Ovi koeficijenti predstavljaju niz kompleksnih brojeva. Absolutna vrednost ovih brojeva opisuje amplitudni spektar analiziranog signala, dok fazni deo definiše fazni spektar:

$$X(n) = |X(n)| e^{-j\zeta(n)}$$

Kompletna informacija o originalnoj sekvenci sadržana je u amplitudnom spektru i faznom spektru. U nekim slučajevima relevantna informacija može biti sadržana samo u jednoj od ove dve spektralne funkcije.

Za analizu genskih sekvenci važan je amplitudni spektar i u tom slučaju je povoljno analizirati spektar gustine energije, koji je definisan na sledeći način:

$$S(n) = X(n)$$

Za sekvence bioloških makromolekula ovako definisana spektralna funkcija nazvana je informacioni spektar (IS).

U cilju utvrđivanja parametara, koji korelira sa biološkom funkcijom određenih sekvenci, važno je odrediti zajedničke karakteristike sekvenci sa zajedničkom biološkom funkcijom. Unakrsna spektralna funkcija (KS), definiše zajedničke frekventne karakteristike dva signala. Za diskretne signale (nizove) unakrsna spektralna funkcija je definisana na sledeći način:

$$S(n) = X(n)Y(n)^* \quad n = 1, 2, \dots, N/2$$

$X(n)$ su koeficijenti DFT niza $x(m)$, a $Y(n)^*$ konjugovano-kompleksni DFT koeficijenti drugog niza $y(m)$. Pikovi u unakrsnoj spektralnoj funkciji definišu zajedničke frekventne karakteristike analiziranih nizova.

Za održavanje zajedničkih frekventnih komponenti za čitavu grupu sekvenci, koristi se višestruka (multipla) spektralna funkcija, (mKS), koja se definiše na sledeći način:

$$M(n) = X_1(n)X_2(n)\dots X_k(n) \quad n = 1, 2, \dots, N/2$$

$X_k(n)$ $x_k(m)$ DFT koeficijenti odgovarajućih $x_k(m)$.

Multipla unakrsna spektralna funkcija za grupu sekvenci sa istom biološkom funkcijom naziva se konsenzus informacioni spektar. Pikovi u višestrukoj unakrsnoj spektralnoj funkciji označavaju zajedničke frekventne komponente za celokupnu analiziranu grupu sekvenci. Kao meru sličnosti analizirane grupe sekvenci uzećemo odnos signal/šum, (S/N) za pikove u unakrsnoj spektralnoj funkciji. Odnos S/N se definiše kao odnos korisnog signala i srednje vrednosti ostalog dela spektra. U slučaju genskih sekvenci teško je unapred reći šta je koristan signal a šta šum, zbog čega je S/N definisan kao odnos svakog značajnog pika (korisnog signala) i srednje vrednosti čitavog spektra. Pretpostavka od koje se polazi podrazumeva da svaki značajni pik može da bude koristan signal.

Prilikom izračunavanja višestruke unakrsne spektralne funkcije javlja se problem množenja spektara sekvenci različite dužine. Poznato je da se spektar numeričkih nizova uvek nalazi u frekventnom opegu (0-0.5), međutim rezolucija spektra zavisi od ukupnog broja tačaka polazne sekvence. Iz navedenih razloga nemoguće je množiti spektre, tačku po tačku, u slučaju sekvenci različite dužine i u tom slučaju je potrebna interpolacija unutar spektra manje rezolucije. Dodavanjem nula na originalni niz ne menja se oblik odgovarajuće spektralne funkcije, ali se broj tačaka u spektralnoj funkciji povećava. Za računsku realizaciju ISM metoda korišćena je brza diskretna Furijeova transformacija, koji zahteva da dužina analiziranog niza bude jednaka nekom stepenu broja dva. Kako bi se zadovoljio navedeni kriterijum potrebno je

podesiti dužinu sekvence dodavanjem nula, čak i u slučaju određivanja spektara pojedinačnih sekvenci. Na isti način se unutar grupe sekvenci, podešava dužina pojedinih sekvenci prema dužini najduže sekvence. Za proteinske sekvence korišćene su standardne dužine nizova od 32, 64, 128, 256, 512 i 1024 tačaka.

3.5. Ispitivanje reaktivnosti VRC01 antitela i NTM1 peptida primenom AMF mikroskopije

AFM (Atomic Force Microscopy) predstavlja mikroskopsku tehniku visoke rezolucije, koja služi za ispitivanje materijala u nanometarskom području [94,95].

AFM mikroskop se sastoji od sonde (nosač sa oštrim vrhom), koja se koristi za skeniranje uzorka. Nosač je obično od silicijuma ili silicijum-nitrita sa prečnikom reda veličine nanometra.

Sonda se spušta do površine uzorka. Između sonde i površine uzorka, deluju sile koje dovode do otklona sonde, koji se meri AFM mikroskopijom. U zavisnosti od vrste ispitivanja AFM mikroskopijom se mogu meriti jačine van der Valsove sile, kapilarne sile, hemijske veze, elektrostatičke sile, magnetne sile, sile solvatacije, itd. Najčešće se otklon meri pomoću laserskog snopa reflektovanog sa vrha sonde prema mreži fotodioda. Ostale metode koriste optičku interferometriju ili kapacitivne senzore.

AFM se može koristiti u različitim režimima rada zavisno od potreba. Generalno AFM mikroskopijom, slika se može dobiti na dva načina: statički (kontaktni) način i nekontaktan (eng. „tapping mode“) način, kada se slika površine uzorka dobija vibriranjem sonde.

U ovom radu AFM je korišćen za ispitivanje reaktivnosti VRC01 antitela sa NTM1 peptidom. Vizuelizacija (NTM1)₄-SOC₄ peptida, antitela i peptid/antitelo kompleksa vršena je sa sisitemom "VECCO scanning probe microscope Quadrex MutiMode IIIe". U ambijentalnim uslovima snimanja korišćena je komercijalna VECCO sonda RFSEP (k = 3 N/m, radijus tipa manji od 10 nm).

Na čistu površinu HOPG (visoko orjentisanog pirolitičkog grafita) nanošena je kapljica vodenog rastvora (NTM1)₄-SOC₄ peptida, SOC₄ nosača i antitela. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi istovremeno je snimana površina u nekontaktnom i faznom SPM modu. Odmah po otpočinjanju snimanja podešeno je da sila interakcije između SPM sonde i HOPG površine bude minimalna, odnosno bliska nuli. Sila je tokom daljeg merenja bila stalno kontrolisana. Topografske slike površine dobijene su korišćenjem vibrirajućeg

moda, dok je fazni mod služio za kontrolu artefakata (razlikovanje slučajnih HOPG neravnina od nanešenih bioloških objekata).

Topografske SPM slike uzoraka predstavljene su bez dodatnih korekcionih procesa podešavanja i uklanjanja šuma, odnosno priložene su neobrađene slike.

3.6. Statistička obrada podataka

U obradi i analizi dobijenih podataka korišćene su sledeće statističke metode:

- deskriptivna statistika za opis podataka: srednja vrednost (\bar{X}), standardna devijacija (SD), minimum (Min) i maksimum (Max)
- Kolmogorov Smirnov test za proveru distribucije podataka
- Student t-test za ispitivanje razlike između grupa (za normalno distribuirane parametre)
- Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) za analiziranje više grupa parametarskih podataka

Značajnost razlika je procenjivana na osnovu postavljenog kriterijuma $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Dizajniranje i analitička optimizacija ELISA testa za detekciju anti-VIP/gp120 antitela

Dizajniranje ELISA metode za detekciju anti-VIP/gp120 antitela podrazumevala je definisanje :

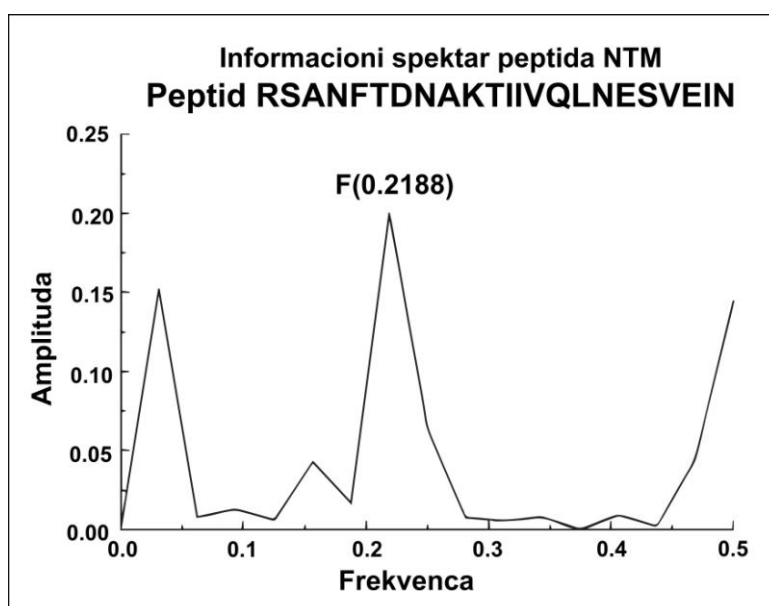
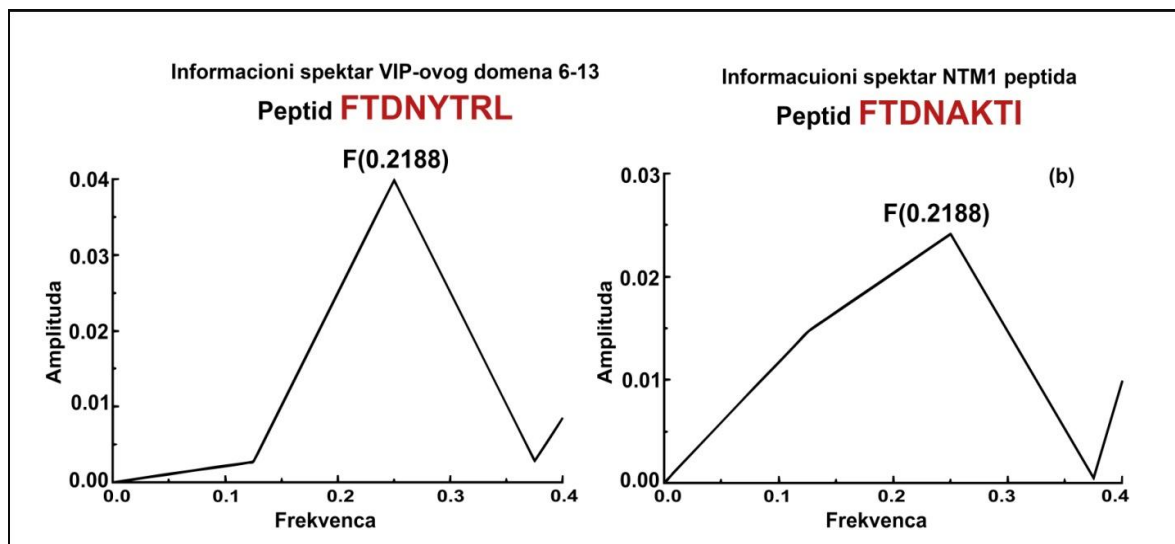
- optimalne količine antigena za oblaganje ploče
- optimalnog razblaženja seruma
- optimalnog razblaženja detekcionih antitela
- optimalnog razblaženja rastvora za blokiranje ploče

4.1.1. Analiza strukturne i informacione sličnosti između VIP-a i peptida korišćenih za detekciju anti-VIP/gp120 antitela ELISA metodom

U ranijim istraživanjima za detekciju anti-VIP/gp120 antitela korišćen je deo gp120 proteina tzv. NTM peptid, koji ima informacionu i strukturnu sličnost sa VIP-om. Homologni domen VIP-a i NTM peptida obuhvata FTD strukturni motiv, važan za interakciju VIP-a sa VPAC1 receptorom. Kombinovanje strukturnih podataka sa podacima dobijenim iz ISM analize za peptide VIP i NTM omogućilo je selekciju novog peptida FTDNAKTI, koji je označen kao NTM1 peptid. NTM1 peptid je najmanji deo glikoproteina gp120 iz omotača HIV virusa, koji ima visok stepen informacione i strukturne sličnosti sa VIP-om. Na **Slici 22** prikazana je sličnost u primarnoj strukturi VIP, NTM i NTM1, kao i njihovi informacioni spektri. Svi prikazani spektri imaju dominantnu frekvencu $F(0,2188)$. Domen VIP proteina koji daje najveći doprinos informaciji sadržanoj u ovoj frekvenci uključuje aminokiseline na poziciji 6-13. Sa druge strane najveći doprinos informaciji sadržanoj u frekvenci $F(0,2188)$ u spektru NTM peptida, koji je ranije korišćen za detekciju anti-VIP/gp120 antitela je mali NTM1 peptid (korišćen za detekciju anti-VIP/gp120 antitela u ovom istraživanju). Ova strukturna i informaciona sličnost ukazuje na funkcionalnu i imunološku krosreaktivnost.

- a) VIP HSD**AVFTDN**YTRLRKQMAVKKYLNSILN (28 aminokiselina)
- NTM RS**ANFTDNAKTI**IVQLNESVEIN (23 aminokiseline)
- NTM1 **FTDNAKTI** (8 aminokiselina)

b)



Slika 22. a) Poređenje primarnih struktura VIP proteina, NTM peptida i NTM1 peptida. Crvenim slovima je prikazana podudarnost u redosledu aminokiselina u primarnoj strukturi navedenih molekula;

b) Informacioni spektri VIP-ovog domena 6-13, NTM1 i NTM peptida

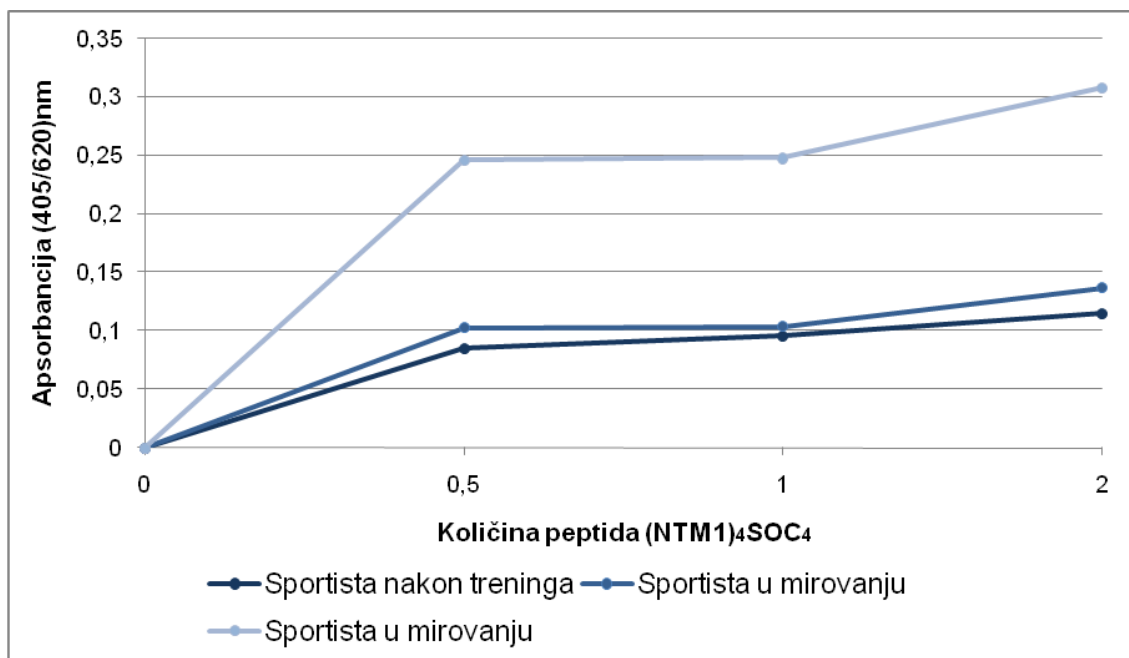
4.1.2. Odabir adekvatne količine (NTM1)₄-SOC₄ peptida za oblaganje ploče

U cilju definisanja optimalne količine peptida za oblaganje mikrotitarske ploče korišćena su serumi sportista u kojima se očekivao povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela. U ovom postupku optimizacije korišćena su tri uzorka sportista. Dva uzorka su uzrokovana od sportista u mirovanju, a jedan uzorak je uzet neposredno nakon fizičke aktivnosti, kada se očekuje najviša koncentracija ovih antitela u cirkulaciji.

Oblaganje je vršeno sa 100 μ l rastvora peptida (NTM1)₄-SOC₄ i 100 μ l rastvora SOC₄ po otvoru. Peptidi i nosač SOC₄ su rastvoreni u bikarbonatnom puferu (pufer za oblaganje). Testirano je oblaganje ploče sa različitim količinama peptida:

- 2 μ g/otvoru (0,02 g/l),
- 1 μ g/otvoru (0,01 g/l)
- 0,5 μ g/otvoru (0,005 g/l).

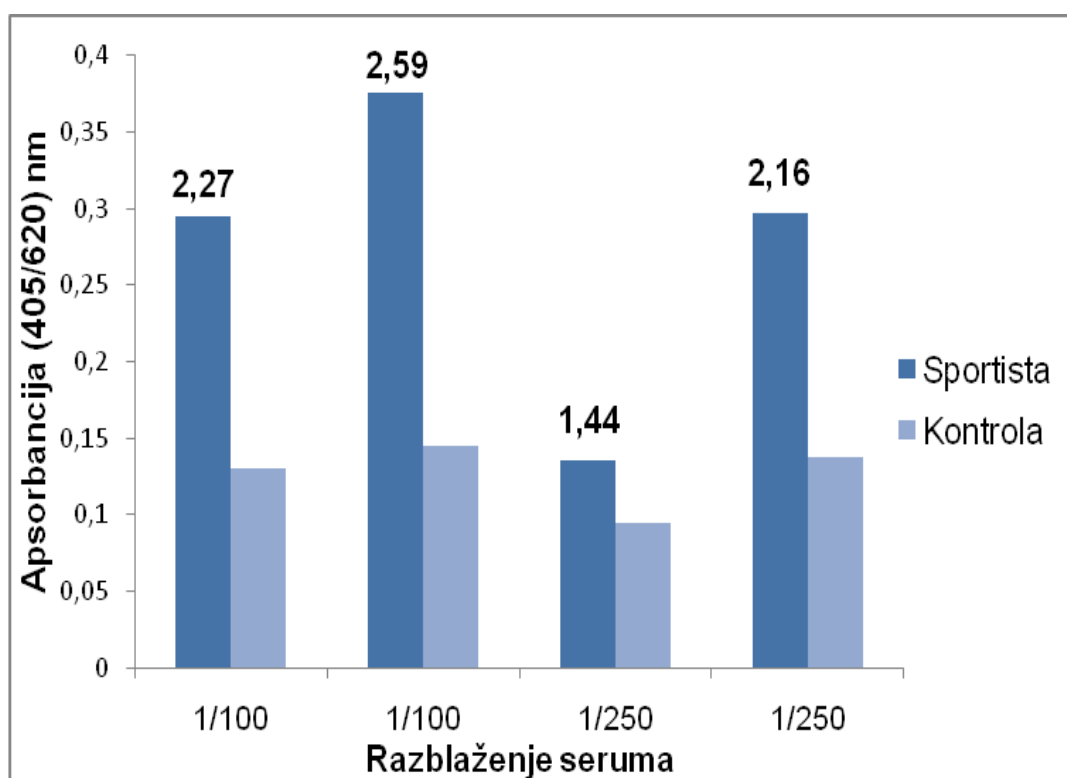
Za negativnu kontrolu su korišćena polja ispunjena sa 100 μ l čistog bikarbonatnog pufera. Ploča je inkubirana preko noći na 4 °C.



Slika 23. Grafički prikaz vrednosti apsorbancije u odnosu na količinu peptida za oblaganje ploče

4.1.3. Izbor optimalnog razblaženja seruma

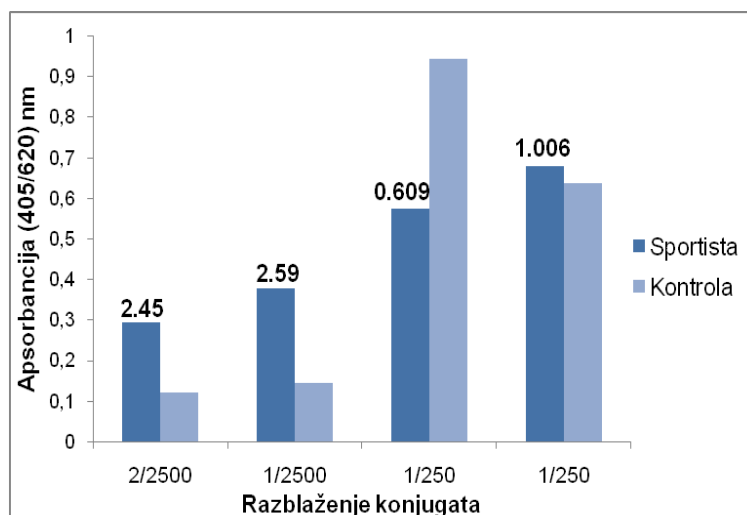
Izabrana su dva uzorka sportista (serumi u kojim su očekivane povišene vrednosti anti-VIP/gp120 antitela) i dva kontrolna uzorka dobrovoljnih davalaca (uzorci u kojima se očekuju snižene vrednosti anti-VIP/gp120 antitela). Svaki uzorak je testiran u duplikatu i izračunata je prosečna apsorbancija. Ploča je obložena sa 1 μg (NTM1)₄-SOC₄ peptida/otvoru. Kako bi odredili signal koji potiče isključivo od specifičnog vezivanja primarnih antitela za NTM1 peptid, kao kontrola na ploči su obložena polja sa rastvorem SOC₄ (nosač za koji je vezan peptid) u puferu za oblaganje. Svaki uzorak seruma je testiran na (NTM1)₄-SOC₄ peptid i nosač SOC₄. Na ovaj način oduzimanjem apsorbancije dobijene vezivanjem primarnih antitela iz seruma za (NTM1)₄-SOC₄ peptid i apsorbancije koja je posledica nespecifičnog vezivanja antitela za nosač SOC₄, dobija se apsorbancija koja je isključivo odraz specifičnog vezivanja anti-VIP/gp120 antitela za NTM1 peptid (engl.optical density O.D.).



Slika 24. Uticaj razblaženja seruma na detekciju anti-VIP/gp120 antitela

4.1.4. Izbor optimalnog razblaženja detekcionih antitela

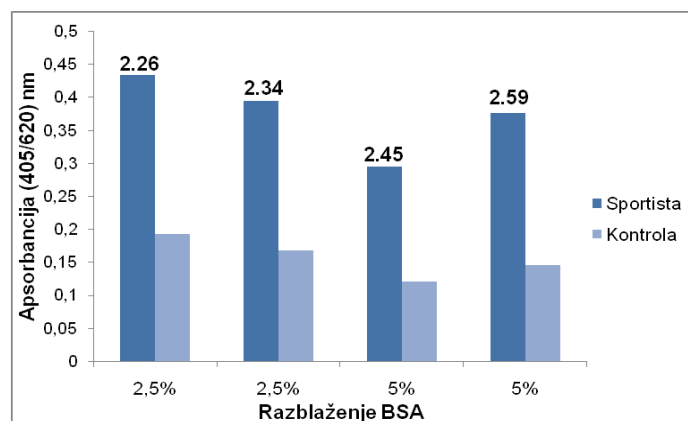
U ovom koraku određivano je optimalno razblaženje konjugata (enzimski obeleženog sekundarnog antitela), koje će istovremeno obezbediti zadovoljavajuću analitičku osetljivost i specifičnost ELISA testa.



Slika 25. Uticaj razblaženja konjugata na detekciju anti-VIP/gp120 antitela

4.1.5. Izbor optimalnog razblaženja rastvora za blokiranje ploče

U poslednjem koraku ispitivan je uticaj razblaženja BSA (eng. Bovin Serum Albumin) rastvora na analitičku osetljivost testa. Testirana je primena 2,5% i 5% rastvora goveđeg serumskog albumina u postupku blokiranja, kao i za rastvaranje primarnih i sekundarnih antitela. Kao i u prethodnim eksperimentima korišćena su dva seruma sportista i dva uzorka kontrole (dobrovoljnih davalaca krvi).



Slika 26. Uticaj razblaženja rastvora BSA na detekciju anti-VIP/gp120 antitela

4.1.6. Provera nepreciznosti u seriji

U cilju provere nepreciznosti metode deset puta je ponovljeno određivanje antitela u istom uzorku na polistirenskoj ploči. U **Tabeli 3** prikazani su rezultati mernja.

Tabela 3. Vrednosti O.D. za deset uzastopnih određivanja anti-VIP/gp120 antitela u istom uzorku

Merenje	O.D.
1	0,225
2	0,236
3	0,243
4	0,258
5	0,236
6	0,242
7	0,256
8	0,255
9	0,266
10	0,269
Xsr	0,249
Sd	0,014
KV (%)	5,62

4.1.7. Provera nepreciznosti iz dana u dan

Za određivanje varijacije merenja iz dana u dan korišćena su dva uzorka sportista (muškog i ženskog pola), kao i dva uzorka kontrole oba pola. Određivanje anti-VIP/gp120 antitela u navedenim uzorcima ponavljano je tokom 5 dana.

Tabela 4 . Vrednosti O.D. za određivanje varijacije iz dana u dan

Dan	Sportista žena	Kontrola žena	Sportista muškarac	Kontrola muškarac
1	0,289	0,077	0,136	0,050
2	0,272	0,072	0,158	0,053
3	0,267	0,078	0,167	0,063
4	0,281	0,062	0,149	0,052
5	0,234	0,077	0,143	0,061
Xsr	0,269	0,073	0,151	0,056
Sd	0,021	0,007	0,012	0,006
KV(%)	7,81	9,59	7,94	10,71

4.2. Ispitivanje prisustva anti-VIP/gp120 antitela kod različitih grupa ispitanika

U ovom radu ispitivali smo prisustvo anti-VIP/gp120 antitela u različitim grupama ispitanika:

- zdravoj, fizički neaktivnoj, kontrolnoj grupi muškaraca i žena;
- u grupi aktivnih sportista
- kod pacijenata obolelih od karcinoma dojke i prostate;
- kod HIV pozitivnih pacijenata u asimptomatskoj fazi bolesti;

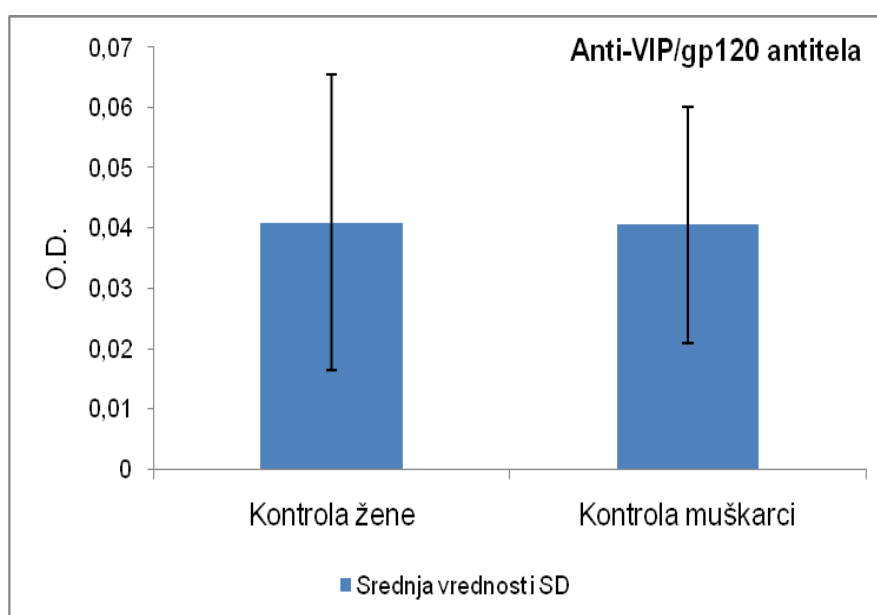
Rezultati svih grupa ispitanika su imali normalnu raspodelu, zbog čega su za analizu korišćeni parametarski statistički testovi.

4.2.1. Testiranje seruma zdravih, fizički neaktivnih osoba, na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela

U cilju utvrđivanja prisustva prirodnih anti-VIP/gp120 antitela kod zdravih osoba testirani su serumi dobrovoljnih davalaca krvi (20 muškaraca i 17 žena). Analiza izmerenih apsorbancija primenom Studentovog t-testa pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između apsorbancija izmerenih za kontrolnu grupu žena i muškaraca ($P=0,9547$).

Tabela 5. Prikaz rezultata O.D. za kontrolnu grupu zdravih, fizički neaktivnih ispitanika

Ispitanici	Xsr	SD	MIN	MAX
Žene (n=17)	0,04094	0,02455	0,0075	0,087
Muškarci (n=20)	0,04052	0,01968	0,0085	0,0765



Slika 27. Uporedni prikaz rezultata anti-VIP/gp120 antitela za kontrolnu grupu muškaraca i žena.

4.2.2. Testiranje seruma aktivnih sportista na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela

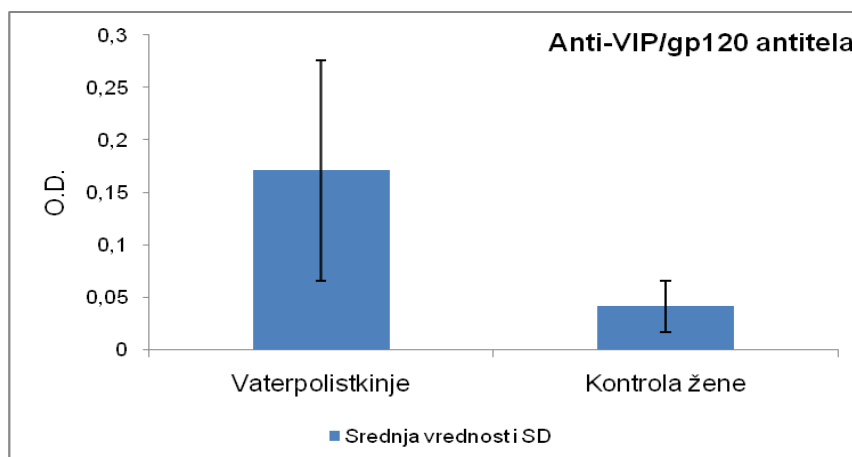
Vrednosti izmerenih apsorbancija, koje odgovaraju nivou anti-VIP/gp120 antitela, za sve grupe sportista imale su normalnu raspodelu. Primenom parametarskih testova uočena je statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela kod svih grupa sportista u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu muškaraca i žena U **Tabeli 6** su date srednje vrednosti, standardne devijacije, kao i minimalne i maksimalne vrednosti za sve sportiste.

Tabela 6. Vrednosti O.D. kod različitih grupa sportista

ISPITANICI	Xsr	SD	Xmin	Xmax
Sportisti - žene (n=28)	0,1644	0,09564	0,049	0,361
Odbojka (n=13)	0,1041	0,03264	0,049	0,163
Plivanje (n=7)	0,269	0,07391	0,135	0,361
Vaterpolo (n=8)	0,1709	0,1050	0,05	0,299
Sportisti - muškarci (n=45)	0,1055	0,04527	0,034	0,23
Vaterpolo (n=13)	0,1047	0,05034	0,04	0,23
Veslanje (n=8)	0,1309	0,04588	0,069	0,2105
Karate (n=9)	0,1082	0,02025	0,082	0,15
Rvanje (n=9)	0,1064	0,05392	0,0385	0,2125
Kik boks (n=6)	0,06783	0,03065	0,034	0,114

4.2.2.1. Vaterpolo - žene

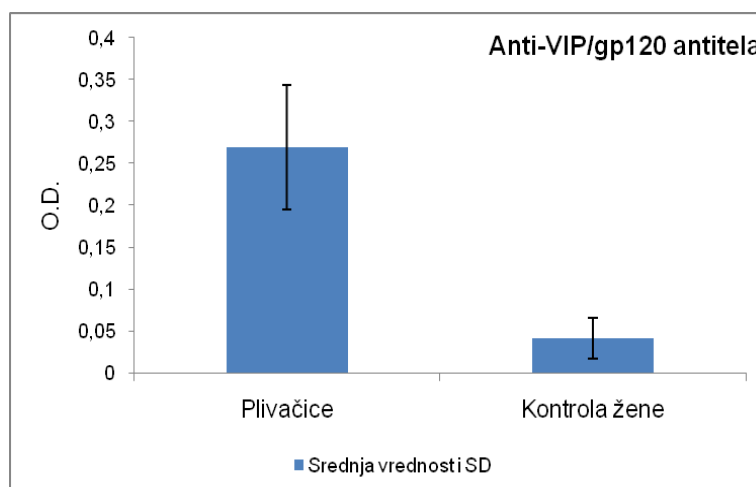
Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između nivoa anti-VIP/gp120 antitela kod vaterpolistkinja u odnosu na kontrolnu grupu žena ($p = 0,0106$). Srednje vrednosti apsorbancije za populaciju vaterpolistkinja je više od 4 puta veća od srednje vrednosti za kontrolnu grupu.



Slika 28. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu vaterpolistkinja i kontrolnu grupu žena

4.2.2.2. Plivanje - žene

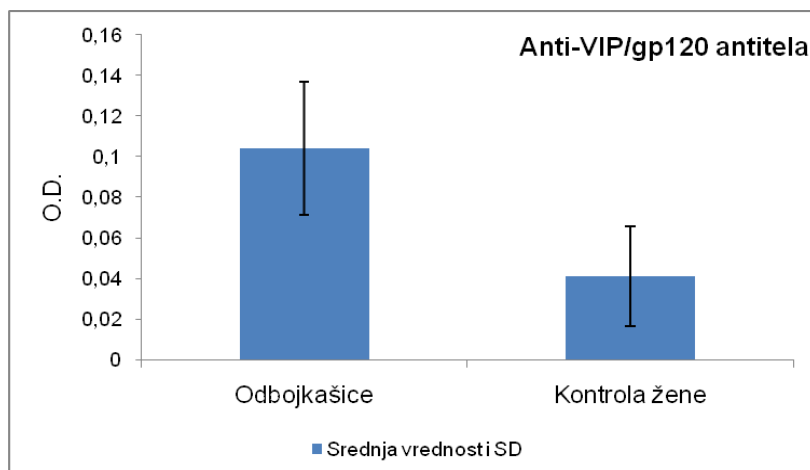
Određivanjem anti-VIP/gp120 antitela u grupi plivačica pokazano je da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,0001$). Srednja vrednost izmerenih apsorbancija je 6,5 puta veća za grupu plivačica od kontrolne grupe žena.



Slika 29. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu plivačica i kontrolnu grupu žena

4.2.2.3. Odbojka - žene

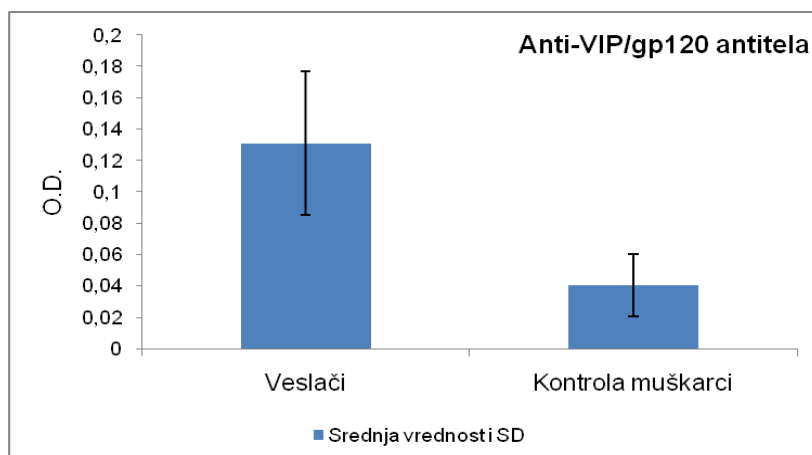
Testiranje seruma odbojkašica na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela pokazalo je da postoji statistički značajna razlika između odbojkašica i kontrolne grupe žene ($p < 0,0001$). Srednja vrednost izmerenih apsorbancija za grupu odbojkašica je oko 2,5 puta veća od kontrolne grupe.



Slika 30. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu odbojkašica i kontrolnu grupu žena

4.2.2.4. Veslanje - muškarci

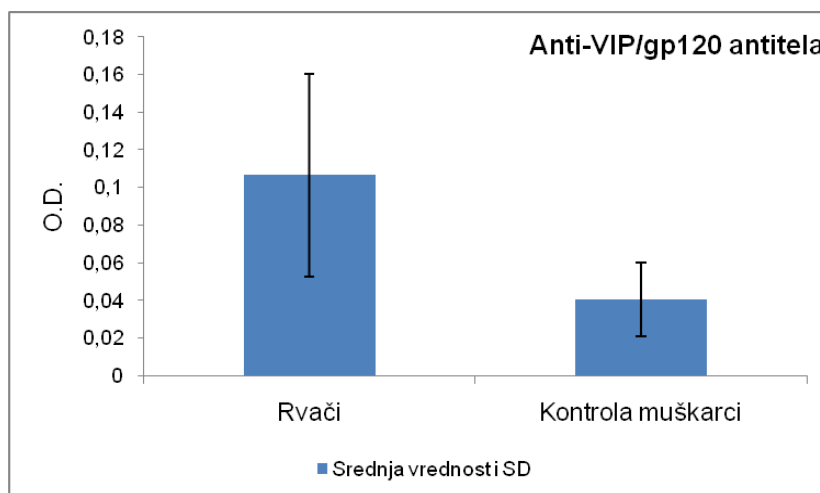
Određivanje anti-VIP/gp120 antitela u grupi veslača pokazalo je da postoji statistički značajna razlika između anti-VIP/gp120 antitela između veslača i kontrolne grupe muškaraca ($p=0,0007$). Izmerena srednja vrednost za veslače je više od tri puta veća u odnosu na srednju vrednost za kontrolne grupe.



Slika 31. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu veslača i kontrolnu grupu muškaraca

4.2.2.5. Rvanje - muškarci

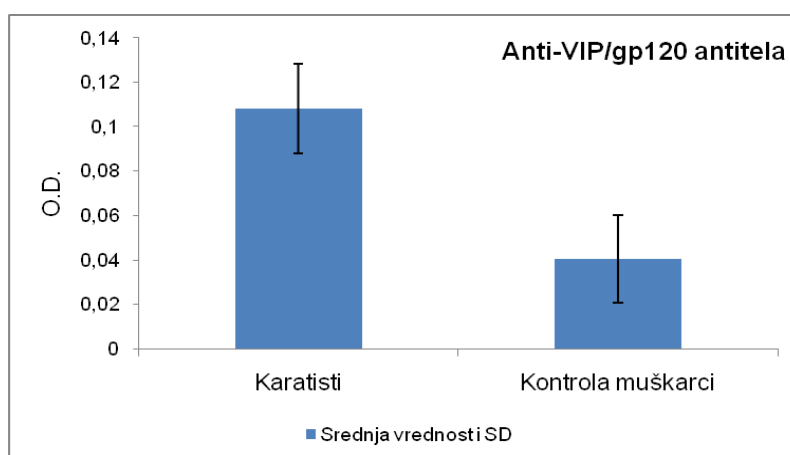
Testiranje nivoa anti-VIP/gp120 antitela u grupi rvača pokazalo je da postoji statistički značajna razlika između grupe rvača i kontrolne grupe muškaraca ($p=0,0061$). Izmerena srednja vrednost apsorbancije je 2,5 puta veća od srednje vrednosti kontrolne grupe.



Slika 32. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu rvača i kontrolnu grupu muškaraca

4.2.2.6. Karate - muškarci

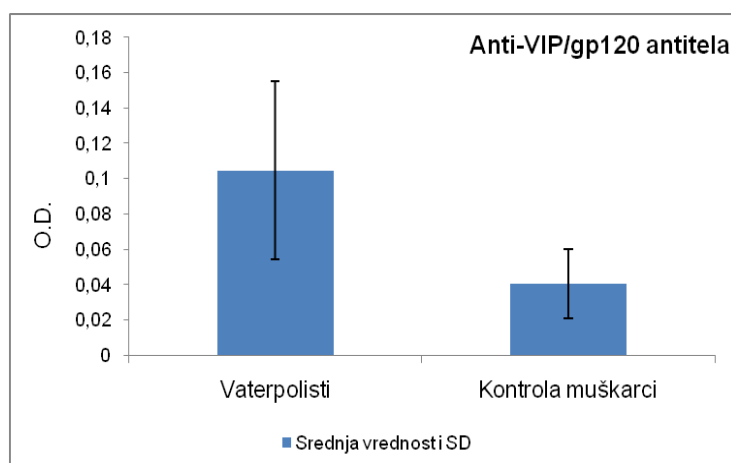
Uočeno je da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela između aktivnih sportista, koji treniraju karate i kontrolne grupe muškaraca ($p < 0,0001$). Srednja vrednost izmerenih apsorbancija za grupu karatista je nešto više od 2,5 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu muškaraca.



Slika 33. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu karatista i kontrolnu grupu muškaraca

4.2.2.7. Vaterpolo - muškarci

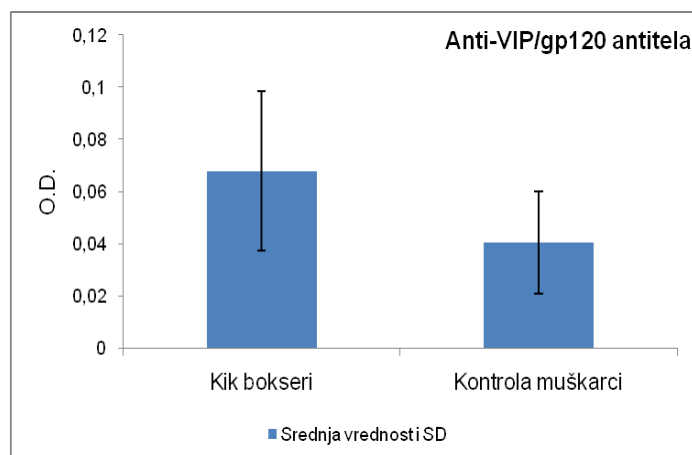
Testiranjem grupe vaterpolista ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika između nivoa anti-VIP/gp120 antitela vaterpolista i nivoa ovih prirodnih antitela u kontrolnoj grupi muškaraca ($p=0,0006$). Izračunata srednja vrednost apsorbancije je oko 2,5 puta veća od srednje vrednosti izračunate za kontrolnu grupu muškaraca.



Slika 34. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu vaterpolista i kontrolnu grupu muškaraca

4.2.2.8. Kik boks - muškarci

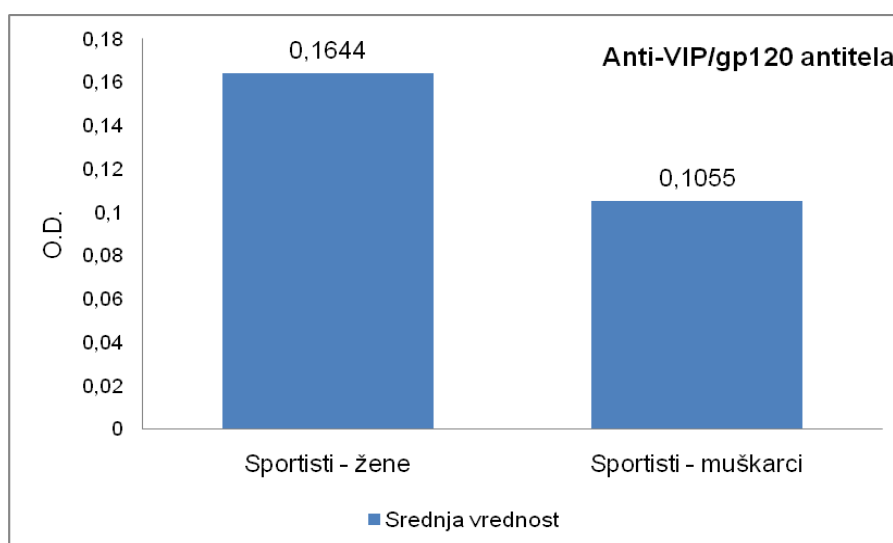
Određivanje nivoa anti-VIP/gp120 antitela u grupi aktivnih sportista koji treniraju kik boks ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela između kik boksera i kontrolne grupe muškaraca ($p=0,0151$). Srednja vrednost apsorbancije za grupu kik boksera je 1,6 puta veća od srednje vrednosti određene za kontrolnu grupu.



Slika 35. Poređenje izmerenih apsorbancija za grupu kik boksera i kontrolnu grupu muškaraca

4.2.3. Uticaj pola na porast anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista

Poređenjem nivoa anti-VIP/gp120 antitela u grupi žena i muškaraca koji se aktivno bave fizičkom aktivnošću, pokazano je da postoji statistički značajna razlika između nivoa anti-VIP/gp120 antitela kod žena sportista u odnosu na muškarce sportiste ($p=0,0043$), iako svi ispitivani sportisti imaju statistički značajano viši nivo anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na kontrolnu grupu. Izračunata srednja vrednost za grupu žena sportista je oko 1,5 puta veća od srednje vrednosti izračunate za grupu muškaraca.

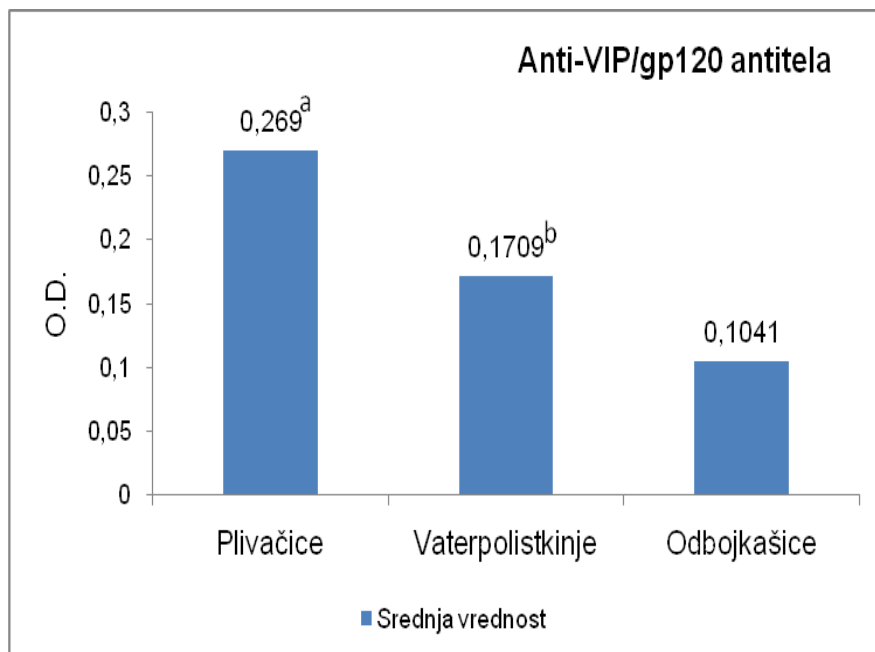


Slika 36. Uticaj pola na nivo anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista

4.2.4. Uticaj vrste sporta na nivo anti-VIP/gp120 antitela

Analiza nivoa anti-VIP/gp120 antitela između pojedinačnih grupa sportista, primenom jednofaktorske analize varijanse, pokazala je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa sportista kod žena ($p<0,05$). Najveći porast anti-VIP/gp120 antitela uočen je kod plivačica, a najmanji kod odbojkašica (**Slika 37**).

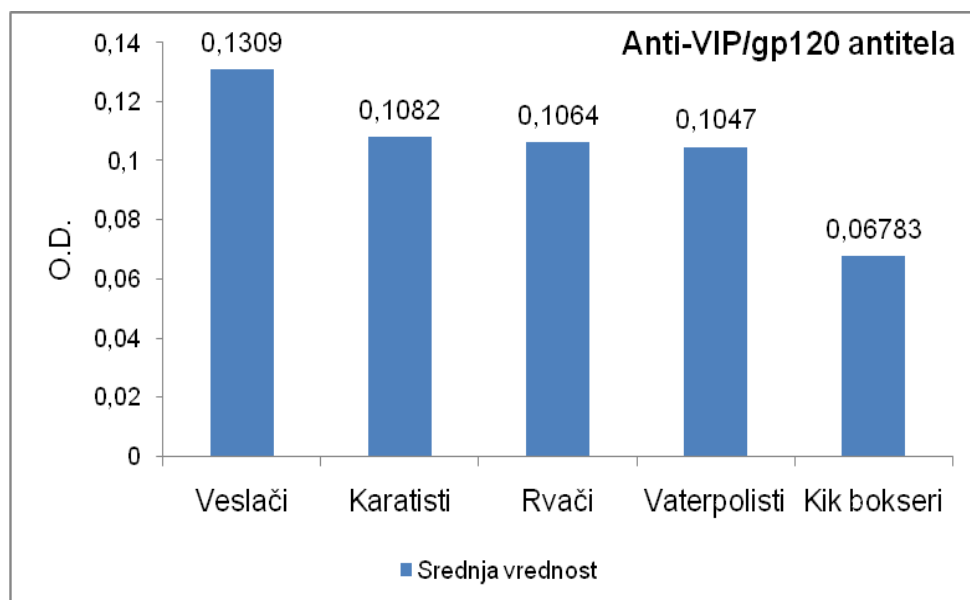
U grupi muškaraca nije uočena statistički značajna razlika u nivoa anti-VIP/gp120 antitela kod različitih grupa sportista (**Slika 38**), ali su sportisti bez obzira na vrstu sporta imali statistički značajno viši nivo anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na kontrolnu, fizički neaktivnu grupu zdravih muškaraca.



^a nivo anti-VIP/gp120 se razlikuje u odnosu na vaterpolistkinje i odbojkašice ($p < 0,05$)

^b nivo anti-VIP/gp120 se razlikuje u odnosu na odbojkašice ($p < 0,05$)

Slika 37. Prikaz srednjih vrednosti izmerene apsorbancije kod žena u odnosu na vrstu sporta

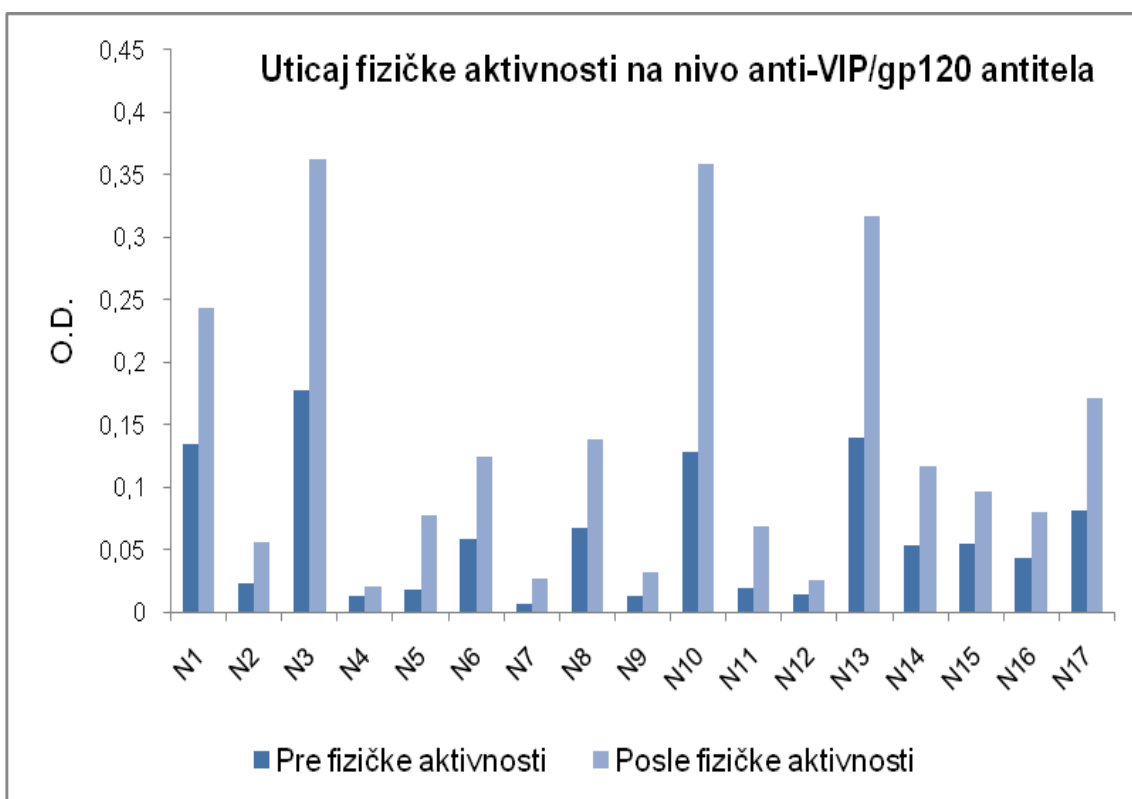


Slika 38. Prikaz srednjih vrednosti izmerene apsorbancije kod muškaraca u odnosu na vrstu sporta

4.2.5. Ispitivanje anti-VIP/gp120 antitela kod vaterpolista pre i nakon fizičke aktivnosti

Posebno je ispitivana produkcija anti-VIP/gp120 antitela, u mirovanju i 30 minuta nakon fizičke aktivnosti (opterećenja). Ispitivani su serumi 17 vaterpolista u periodu kada nisu intenzivno trenirali (na kraju četvoronedeljnog aktivnog odmora vaterpolista, pred početak trenažnog ciklusa, koji je uključivao treninge niskog intenziteta u trajanju od 1 – 2 sata dnevno).

Rezultati Student t-testa pokazuju da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela kod sportista pre i nakon kontrolisanog treninga ($P < 0,001$). Porast anti-VIP/gp120 antitela zabeležen je i kod vaterpolista N2, N4, N5, N7, N9, N11 i N12, koji su imali nizak početan nivo antitela u mirovanju. Navedeni podatak je dokaz da fizička aktivnost dovodi do porasta anti-VIP/gp120 antitela, bez obzira na različit individualni nivo prirodnih autoantitela (intraindividualnu varijaciju u koncentraciji autoantitela).



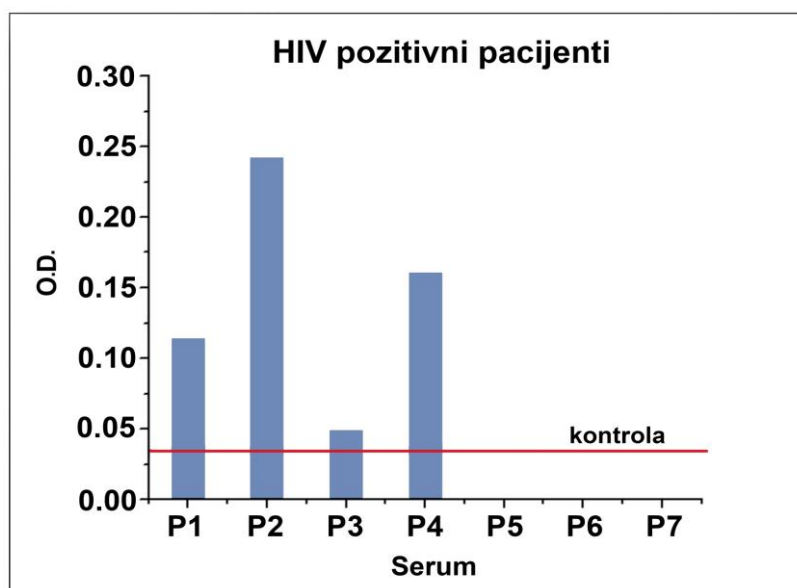
Slika 39. Prikaz nivoa anti-VIP/gp120 antitela kod vaterpolista pre i nakon opterećenja

4.3. Testiranje seruma HIV pozitivnih osoba na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela

Testirani su serumi HIV pozitivnih pacijenata na prisustvo antitela koja se vezuju za mali NTM1 molekul (FTDNAKTI). Od 7 testiranih seruma HIV pozitivnih pacijenata, četiri pacijenta su imali povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela. Treba napomenuti da su u ovom eksperimentu korišćena sekundarna antitela obeležena peroksidazom. Za pacijente P6, P7 i P8 nivo anti-VIP/gp120 antitela je bio ispod detekcionog limita.

Tabela 7. Podaci ispitivanih HIV pozitivnih pacijenata

Pacijent	Pol	Starost	VL/ml	CD4/ μ l	Godina infekcije	Terapija	Suptip virusa
P1	Ž	33	<500	419	<1988	HAART	B
P2	Ž	35	900	470	2000	HAART	B
P3	M	36	688000	91	1997	bez terapije	B
P4	M	38	59	863	2001	bez terapije	B
P5	M	46	769	1008	2001	bez terapije	B
P6	M	29	4460	855	2002	bez terapije	B
P7	M	39	2500	844	2003	bez terapije	B



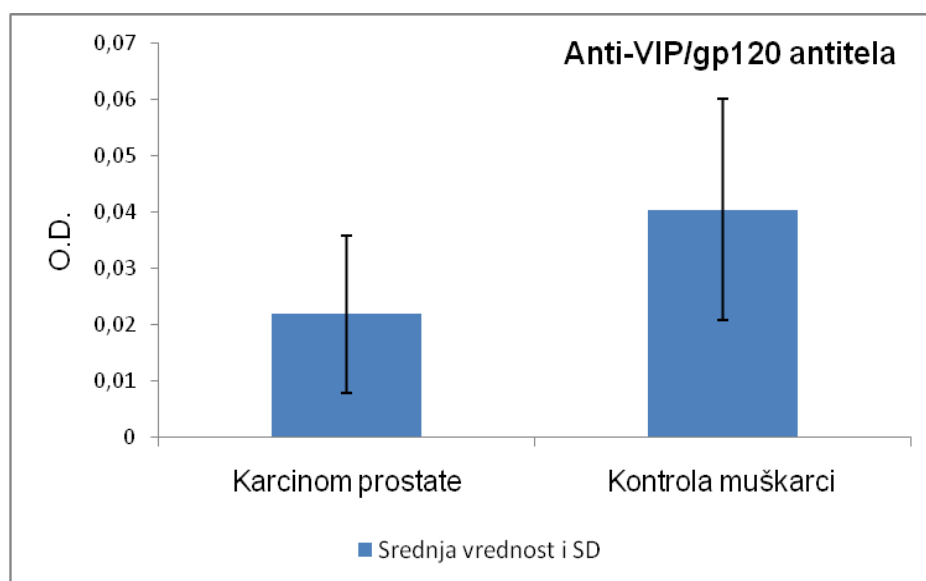
Slika 40. Apsorbancije dobijene testiranjem seruma HIV pozitivnih pacijenata na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela.

4.4. Testiranje seruma osoba obolelih od karcinoma dojke i prostate na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela

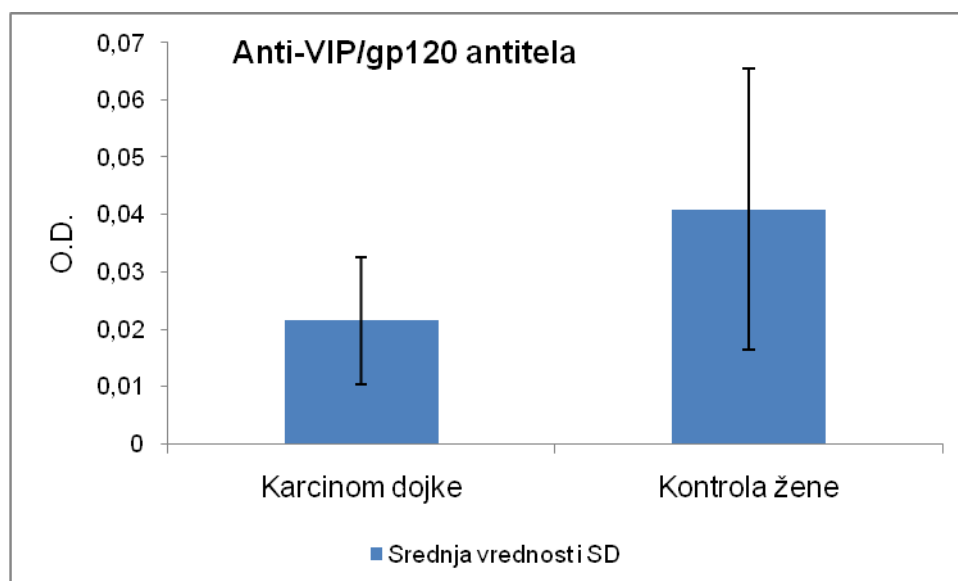
U cilju ispitivanja protektivne uloge anti-VIP/gp120 antitela na razvoj tumora dojke i prostate, ispitivan je nivo ovih prirodnih antitela kod pacijenata u različitim stadijumima bolesti. Testirano je 15 žena sa karcinomom dojke i 17 muškaraca sa karcinomom prostate. Rezultati Student t-testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela između kontrolne grupe i pacijenata obolelih od karcinoma dojke ($P=0,0071$) i prosate ($P=0,0026$). Treba naglasiti da je ukupan nivo IgG antitela u obe populacije pacijenata u granicama referentnog intervala sa prosečnim vrednostima 11 ± 2.7 g/l, što potvrđuje da snižen nivo anti-VIP/gp120 antitela nije posledica imunosupresivne terapije.

Tabela 8. Rezultati O.D. za pacijente obolele od karcinoma dojke i prostate

Ispitanici	Xsr	SD	Xmin	Xmax
Žene obolele od karcinoma dojke (n=15)	0,02143	0,01108	0,0065	0,0355
Muškarci oboleli od karcinoma prostate (n=17)	0,02197	0,01398	0,003	0,0505



Slika 41. Uporedni prikaz rezultata izmerenih apsorbancija, koji odgovaraju nivou anti-VIP/gp120 antitela, kod pacijenata sa karcinomom prostate i kontrolne grupe muškaraca



Slika 42. Uporedni prikaz rezultata izmerenih apsorbancija, koji odgovaraju nivou anti-VIP/gp120 antitela, kod pacijenata sa karcinomom dojke i kontrolne grupe žena

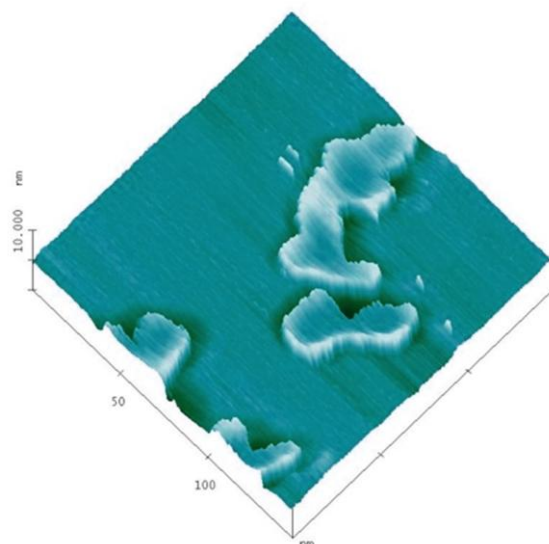
4.5. Analiza interakcije između (NTM1)₄-SOC₄ antigena i neutrališućeg anti-HIV monoklonskog antitela VRC01 primenom elektronske mikroskopije

AFM elektronskom mikroskopijom testirano je da li se monoklonska neutrališuća VRC01 antitela vezuju za površinu NTM1 peptida. Monoklonsko VRC01 antitelo se vezuje za aminokiseline unutar D petlje smeštene na C-terminalnom kraju druge konzervirane regije proteina gp120. D petlja je uključena u neposredno hemijsko vezivanje proteina gp120 za receptor CD4. NTM1 peptid selektovan u ovom radu za testiranje seruma na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela, najvećim delom se preklapa sa petljom D proteina gp120 (7 od 8 amino kiselina, **Slika 41**).

D petlja	N F T D N A K T
	* * * * * * *
Peptid NTM1	F T D N A K T I

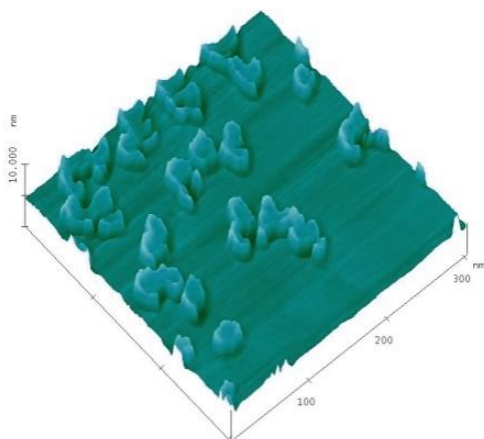
Slika 43. Poređenje redosleda aminokiselina, koje ulaze u sastav D peptida i NTM1 peptida

Peptid korišćen u eksperimentima je (NTM1)₄-SOC₄ sadrži 4 molekula NTM1 vezana za oligopeptidni nosač SOC (eng. Sequential Oligopeptide Carrier) i izgrađen je od ponavljajućeg segmenta lizin- α -aminoizobuterna kiselina-glicin (Lys-Aib-Gly). AFM elektronskom mikroskopijom testirano je da li se neutrališuća VRC01 antitela vezuju za površinu peptida (NTM1)₄-SOC₄, koji na svojoj površini ima strukturni motiv FTD, odgovoran za vezivanje VIP-a za receptore VPAC1 i VPAC2.

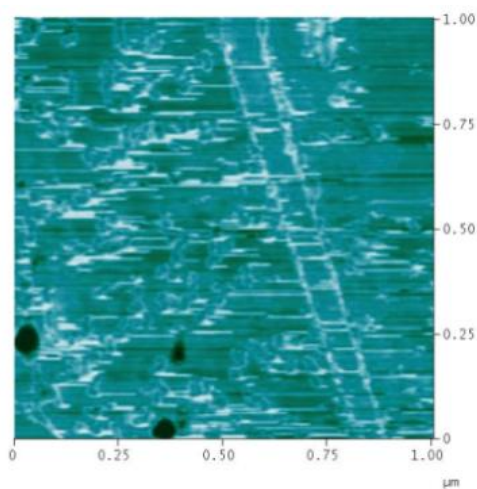


Slika 44. Oligopeptidni nosač SOC_4 snimljena AFM mikroskopom pri rezoluciji od 150 nm.

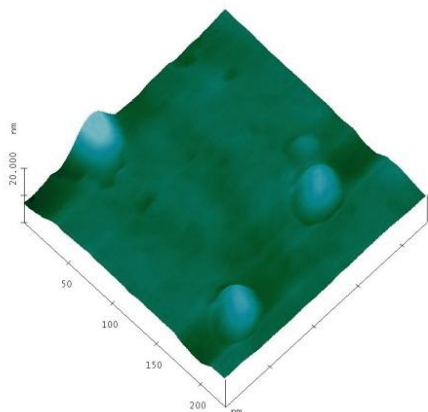
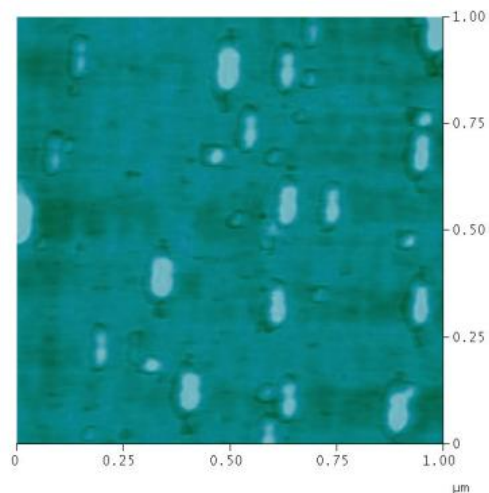
a)



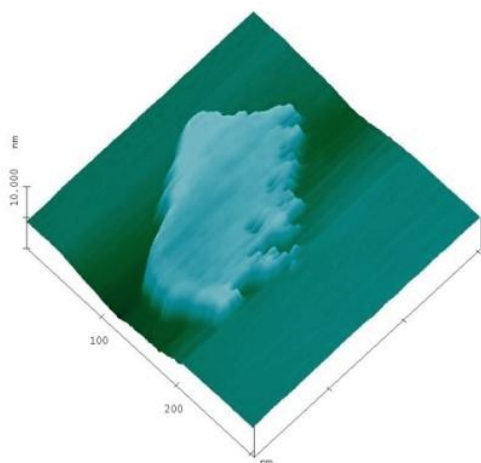
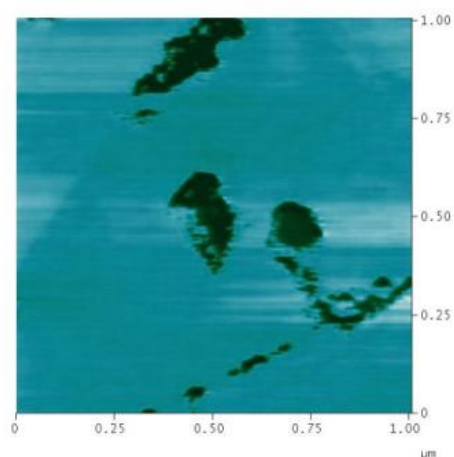
b)



Slika 45. Peptid $(\text{NTMs})_4\text{-SOC}_4$ snimljen AFM elektronskim mikroskopom pri rezoluciji od 150 nm (a) i 1 μm (b).

a)**b)**

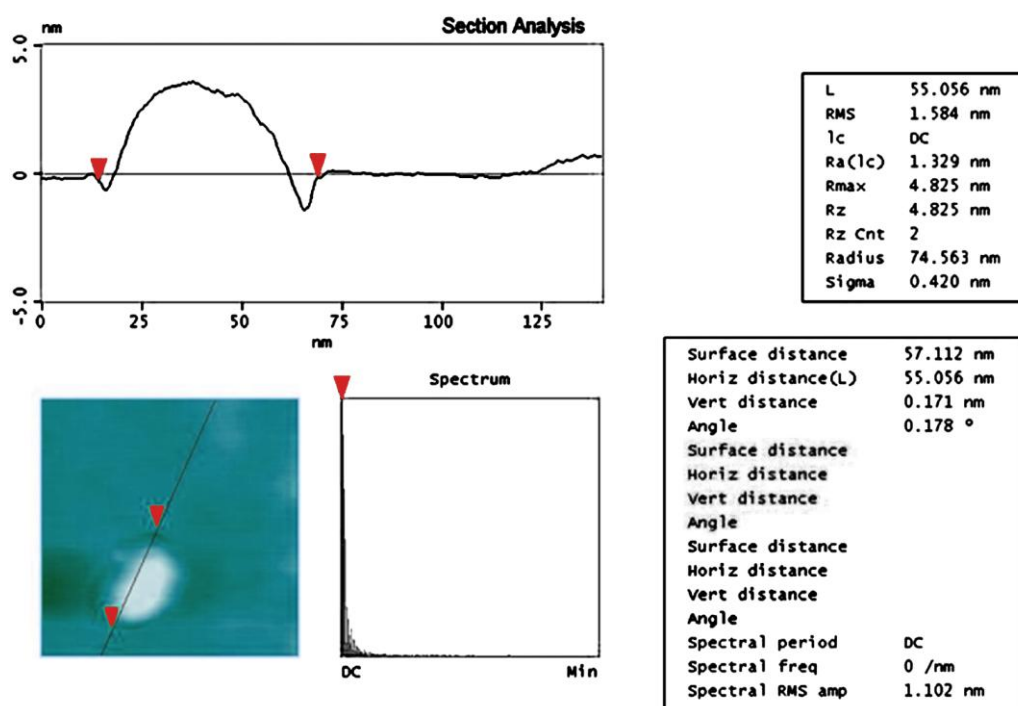
Slika 46. Monoklonsko antitelo VRC01 snimljeno AFM elektronskim mikroskopom pri rezoluciji od 200 nm (a) i 1 μm (b).

a)**b)**

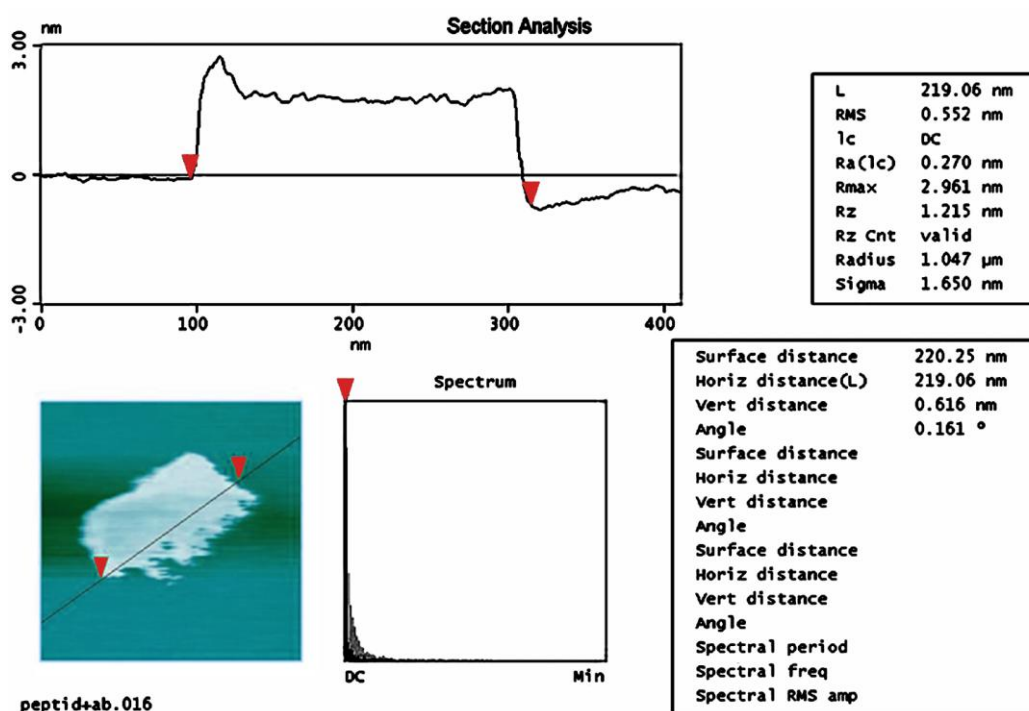
Slika 47. AFM slika monoklonskih antitela VRC01 vezanih za (NTMs)₄-SOC₄ pri rezoluciji 300 nm (a) i 1 μm (b).

Kako bi potvrdili da objekat prikazan na **Slici 46 (a)** predstavlja kompleks antitela vezanih za (NTM1)₄-SOC₄ peptid, uporedili smo njegove dimenzije sa dimenzijama monoklonskog antitela VRC01 sa **Slike 45 (a)**.

a) Karakteristike monoklonskog antitela VRC01;



b) Karakteristike kompleksa VRC01/ (NTM1)₄-SOC₄.



Slika 48. Poređenje dimenzija monoklonskog antitela VRC01 i kompleksa dobijenog vezivanjem navedenih antitela za konjugat (NTM1)₄-SOC₄.

Prema podacima prikazanim na **Slici 48(a)**, monoklonsko antitelo snimljeno AFM elektronskim mikroskopom je sferni objekat prečnika $\cong 55$ nm.

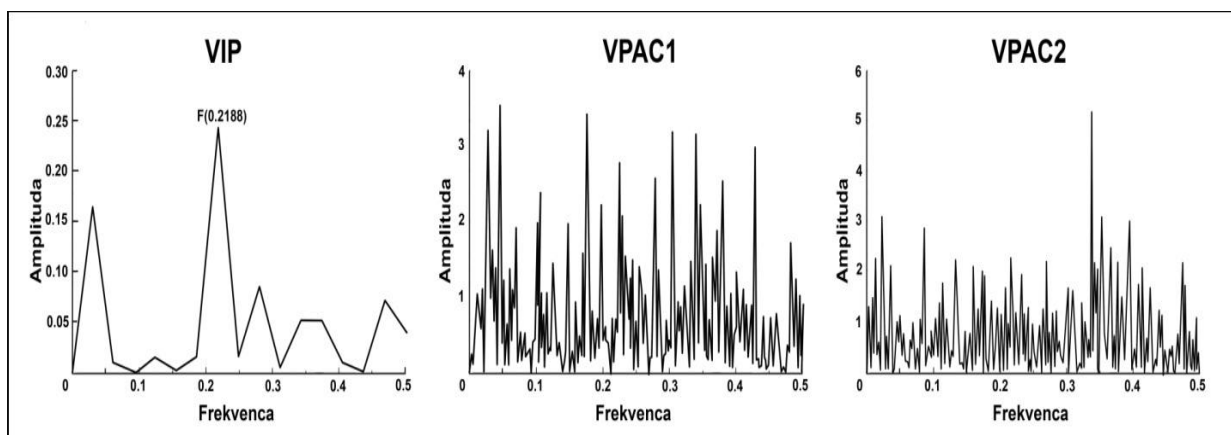
Dužina objekta prikazanog na **Slici 48 (b)** iznosi 220 nm, što je približno četiri puta veće od vrednosti prečnika monoklonskog antitela VRC01. Na osnovu navedenih podataka, kao i činjenice da su za SOC₄ vezana četiri NTM1 peptida, možemo zaključiti da objekat prikazan na **Slici 48(b)** predstavlja kompleks četiri antitela VRC01 vezana za konjugat (NTM1)₄-SOC₄.

AFM elektronskim mikroskopom potvrđeno je da konjugat (NTM1)₄-SOC₄ na svojoj površini prezentuje četiri epitopa, koja preko FTD segmenta vezuju četiri monoklonska antitela VRC01.

4.6. Analiza interakcije VIP/VPAC receptori

Primenom ISM metode vršena je analiza primarne strukture VIP-a i VPAC receptora u cilju određivanja domena VIP-a, koji je odgovoran za dugodosežnu međumolekulsku interakciju sa receptorima na rastojanju od 10 do 1000 Å.

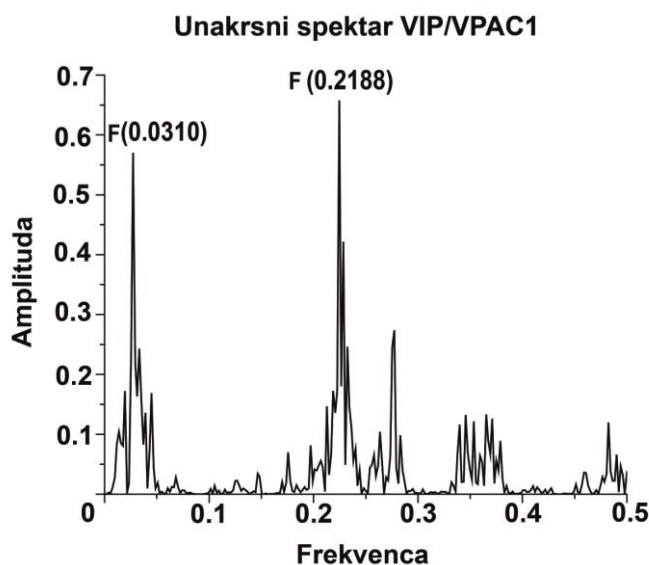
Korak 1: Određivanje informacionog spektra za proteine: VIP, VPAC1 i VPAC2



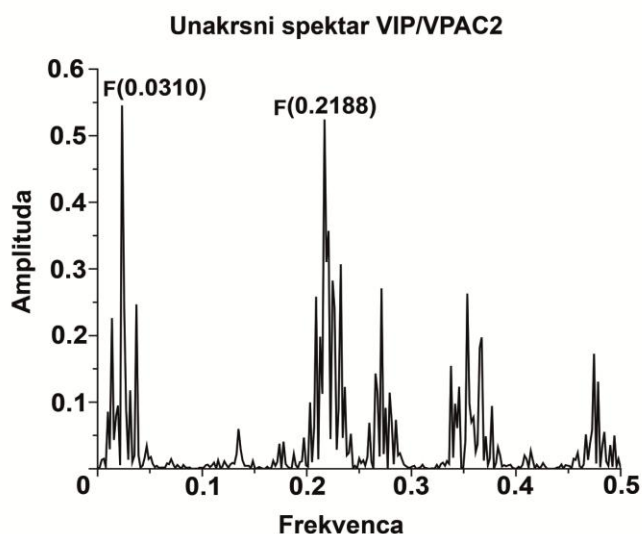
Slika 49. Pojedinačni informacioni spektri VIP-a i njegovih VPAC receptora. Na apscisi su predstavljene frekvencije u informacionom spektru, a na ordinati amplitude u arbitrarnim jedinicama.

Korak 2: Određivanje unakrsnog spektra VIP/VPAC1 i VIP/VPAC2

a)



b)



Slika 50. Unakrsni spektri dobijeni međusobnim množenjem pojedinačnih informacionih spektara VIP-a i njegovih receptora VPAC1 i VPAC2.

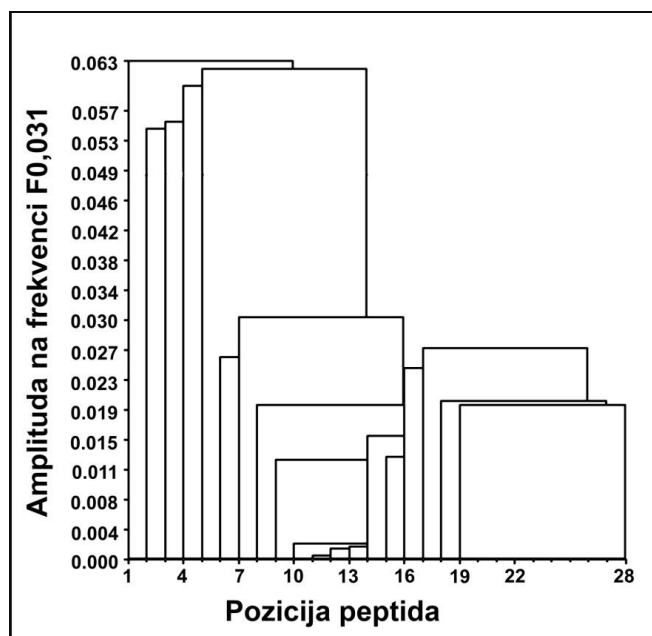
Rezultati ISM analize pokazuju da su u oba slučaja za interakciju VIP-a sa njegovim receptorima važne dve frekvence $F(0.2188)$ i $F(0.0310)$. U unakrsnom spektru VIP/VPAC1 dominantna je frekvencija $F(0.2188)$, dok je u unakrsnom spektru VIP/VPAC2 dominantna frekvencija $F(0.0310)$. Prema ISM konceptu

možemo da zaključimo da je za interakciju na velikim rastojanjima VIP-a sa VPAC1 receptorom značajna informacija, koja odgovara frekvenciji $F(0.2188)$, dok je za interakciju sa VPAC2 receptorom značajna informacija, koja odgovara frekvenci $F(0.0310)$.

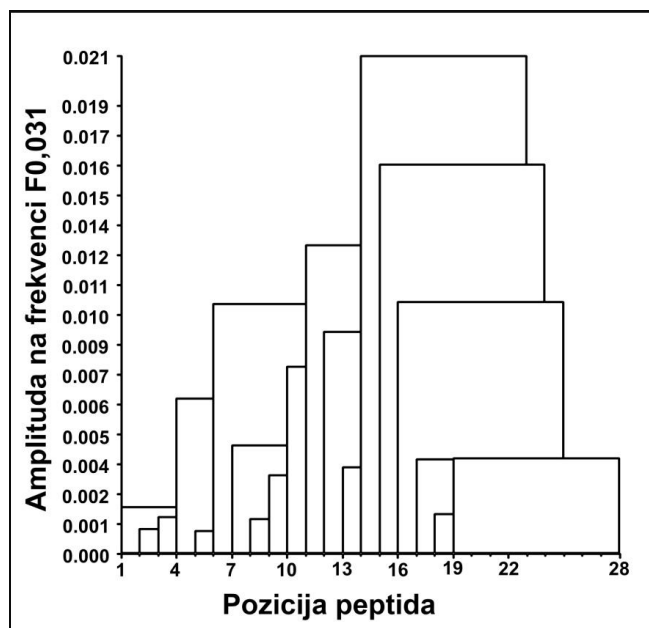
Korak 3: Određivanje domena primarne strukture VIP-a, koji daje najveći doprinos informaciji, koja odgovara frekvencama $F(0.2188)$ i $F(0.0310)$.

Analiza primarne strukture VIP-a obuhvata postepeno izračunavanje informaciog spektra za peptide sastavljene od 10 aminokiselina u nizu, pomerajući se za 1 aminokiselinu. Prvi peptid u nizu, koji se analizira obuhvata prvih 10 aminokiselina VIP-a, naredni peptid čine aminokiseline na poziciji 2-11, sledeći 3-12 i tako redom.

Prema rezultatima prikazanim na **Slici 51** peptid, koji je u najvećoj meri odgovoran za informaciju koja odgovara frekvenci $F(0.2188)$ uključuje prvih 10 aminokiselina VIP-a (**HSDAVFTDNY**). Drugim rečima, prvih deset aminokiselina u primarnoj strukturi VIP-a je odgovorno za prepoznavanju i interakciju između VIP-a i VPAC1 receptora na rastojanjima od 10 do 1000 Å.



Slika 51. Grafički prikaz rezultata udela (doprinos) pojedinačnih domena primarne strukture VIP-a u informaciji, koja odgovara frekvenci $F(0.2188)$ u unakrsnom spektru VIP/VPAC1



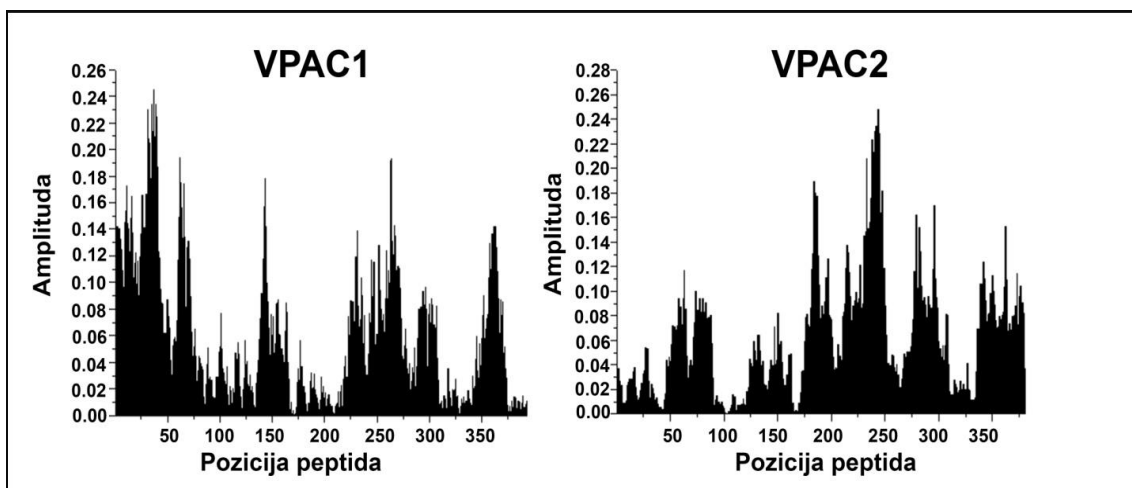
Slika 52. Grafički prikaz rezultata udela pojedinačnih domena primarne strukture VIP-a u informaciji, koja odgovara frekvenci F(0.031) u unakrsnom spektru VIP/VPAC2

Grafički prikaz rezultata na **Slici 51** pokazuje da je peptid, koji uključuje aminokiseline na poziciji 14-23 (**RKQMAVKKYL**) odgovoran za interakciju na velikim udaljenostima i prepoznavanje između VIP-a i VPAC2 receptora.

Na osnovu izloženih rezultata ISM analize može se zaključiti da su za interakciju sa receptorima VPAC1 i VPAC2 odgovorni različiti domeni VIP-a.

4.7. Određivanje domena na receptorima VPAC 1 i VPAC 2, koji su odgovorni za interakciju sa VIP-om

U cilju određivanja domena VPAC1 i VPAC2 receptora, koji su odgovorni za dugodosežnu interakciju sa VIP-om, izvršena je ISM analiza primarne strukture ovih receptora. U analizi su korišćeni maturirani VPAC1 i VPAC2 proteini, odnosno proteini bez signalnog peptida. Dužina signalnog peptida za VPAC1 je 30 aminokiselina, a za VPAC2 je 23 aminokiseline. Sekvence VIP-ovih receptora su skenirane peptidom dužine 35 aminokiselina. Pri skeniranju peptid je pomeran sa korakom od jedne aminokiseline duž primarne strukture receptora, pri čemu je za svaku poziciju određena amplituda u informacionom spektru datog peptida na frekvencama F(0.2188) i F(0.031), koje karakterišu interakciju VIP-a sa receptorima VPAC1 i VPAC2.



Slika 53. Rezultati skeniranja receptora VPAC1 i VPAC2 peptidima dužine 35 amino- kiselina. Na apscisi su predstavljene pozicije peptida, a na ordinati vrednosti amplituda na frekvenci 0.218 za VPAC1 receptor i na frekvenci 0.031 za VPAC2 receptor, računate za svaki pojedinačni peptid.

U **Tabeli 9** prikazane su pozicije prvih deset peptida (dužine 35 aminokiselina) u primarnoj strukturi VPAC1 receptora, koje daju najveći doprinos informaciji prezentovanoj frekvencom $F(0.2188)$.

Tabela 9. Pozicije peptida u primarnoj strukturi VPAC1 receptora, koji daju najveći doprinos informaciji prezentovanoj frekvencom F(0.218).

Pozicija peptida	Amplituda	S/N
37	0.24482	4.34054
35	0.23409	4.26488
39	0.23383	4.36145
31	0.23014	4.15497
40	0.22413	4.18875
36	0.21374	3.78930
38	0.20976	3.61566
32	0.20749	3.79679
33	0.20500	3.80790
62	0.19368	2.82513

Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da je za interakciju sa VIP-om na rastojanju od 10 do 1000Å odgovoran domen VPAC1 receptora, koji obuhvata aminokiseline na poziciji 31-96.

Tabela 10. Pozicije peptida u primarnoj strukturi VPAC2 receptora, koji daju najveći doprinos informaciji prezentovanoj frekvencom F(0.031).

Pozicija peptida	Amplituda	S/N
244	0.24768	3.51021
242	0.23400	3.39851
241	0.22990	3.41547
245	0.22810	3.19928
238	0.22289	3.42120
243	0.21657	3.07784
239	0.21264	3.13385
240	0.20955	3.03681
233	0.20831	3.30231
184	0.18889	3.50410

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 10** možemo zaključiti da je za dugodosežnu interakciju sa VIP-om odgovoran domen VPAC2 receptora, koji obuhvata aminokiseline na poziciji 244 – 278.

5. Diskusija

Redovna fizička aktivnost se u preporukama Svetske zdravstvene organizacije često navodi kao mera, koja deluje preventivno u razvoju mnogih hroničnih bolesti, ali i kao terapijsko sredstvo za poboljšanje kvaliteta života pacijenata obolelih od karcinoma, depresije, dijabetesa tip 2, pacijenata sa povišenim krvnim pritiskom i brojnim drugim oboljenjima [96].

Tri osnovna uslova za povoljan efekat fizičke aktivnosti predstavljaju umerenost, učestalost i kontinuitet vežbanja. Definisati granicu umerene fizičke aktivnosti nije jednostavno, s obzirom na činjenicu da ona u mnogome zavisi od individualnih karakteristika. Uprkos individualnim razlikama moguće je dati jednu opštu definiciju umerene fizičke aktivnosti, koja glasi: umerena je svaka fizička aktivnost, koja za posledicu ima fiziološke reakcije u organizmu, koje se kreću u granicama njegove tolerancije, što podrazumeva da je nakon njenog prestanka omogućen brz i potpun oporavak organizma. Od posebnog značaja za dobar efekat fizičkih vežbi je njihov kontinuitet. Praksa pokazuje da se u slučaju „rekreativnog vežbanja” fizička kondicija nakon pauze postiže približno istom brzinom, kojom se do nje stizalo u momentu prekida vežbanja. Na primer, ako se radeći određeni skup vežbi, dobra fizička pripremljenost postigla za 12 nedelja, a potom napravila pauza od 4 nedelje, pri nastavku treba poći od programa koji je predviđen za devetu nedelju. Pored intenzivnog istraživanja, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi pozitivnog delovanja fizičke aktivnosti na ljudsko zdravlje, nisu razotkriveni. Jedan od retkih izuzetaka predstavlja veza između fizičke aktivnosti i fiziološke uloge VIP-a. Pokazano je da fizička aktivnost povećava koncentraciju VIP-a u cirkulaciji, što dalje dovodi do porasta nivoa anti-VIP/gp120 antitela u plazmi, koja su odgovorna za održavanje koncentracije VIP-a u fiziološkim granicama. Anti-VIP/gp120 antitela, koja su po svojoj prirodi neutrališuća antitela, moguće je kod zdravih osoba stimulisati jedino fizičkom aktivnošću. Ispitivanje nivoa anti-VIP/gp120 antitela na populaciji kategorisanih sportista, zdravih dobrovoljnih davalaca krvi i HIV pozitivnih pacijenata, kao i osoba obolelih od karcinoma dojke i prostate potvrđuje da je nivo anti-VIP/gp120 antitela tesno povezan sa otpornošću organizma na pomenute bolesti. Fizička aktivnost je od posebnog značaja za populacije nerazvijenih i srednje razvijenih zemalja, kojima nisu dostupne

sofisticirane i skupe metode za ranu detekciju i lečenje SIDE , tumora dojke i prostate.

5.1.Optimizacija ELISA metode za detekciju anti-VIP/gp120 antitela

Optimizacija ELISA metode bila je izazov u istraživanju, jer komercijalan test za detekciju anti-VIP/gp120 antitela nije prisutan na tržištu. Kao polazna tačka za optimizaciju ELISA metode korišćeni su protokoli iz ranijih istraživanja u kojima su određivana anti-VIP/gp120 antitela. U ranijim istraživanjima za detekciju anti-VIP/gp120 antitela korišćen je ELISA test u kome je peptid za detekciju bio NTM peptid, sačinjen od 23 aminokiseline [97].

U ovom radu je za detekciju anti-VIP/gp120 antitela korišćen NTM1 peptid, koji iako se sastoji od samo 8 aminokiselina, takođe ima visok stepen strukturne i informacione sličnosti sa VIP-om, kao i ranije korišćeni NTM peptid. Kao što smo pokazali u rezultatima, interakcija između VIP-a i VPAC1 receptora karakteriše se frekventnom komponentom $F(0,2188)$ u informacionim spektrima ovih proteina. Domen VIP-a, koji daje najveći doprinos ovoj frekvenci uključuje aminokiseline na poziciji 6-13 (**Slika 22 b**). Sa druge strane deo NTM peptida, koji daje najveći doprinos informaciji reprezentovanoj ovom frekvencom je kratki NTM1 peptid, koji je u ovom radu korišćen za detekciju anti-VIP/gp120 antitela. Važno je uočiti da NTM1 peptid, takođe obuhvata domen najveće homologije između VIP-a i NTM peptida (**Slika 22 a**). Ova strukturna i informaciona sličnost sugeruje funkcionalnu i imunološku unakrsnu reaktivnost između peptida VIP (3-16) i NTM1.

Prema literaturnim podacima antigen koji se koristi za direktnu detekciju antitela (bez prisustva nosača) mora biti peptid sačinjen od najmanje 15-20 aminokiselina [98]. U cilju bolje izloženosti, kao i većeg broja epitopa po jedinici aktivne površine, peptid NTM1 je vezan za noseći molekul SOC_4 . Na jednom SOC_4 nosaču vezana su 4 molekula NTM1 peptida. Da bi se isključio uticaj nespecifičnog vezivanja antitela za SOC_4 nosač, svaki uzorak je imao svoju kontrolu, što znači da je za svaki uzorak oblagano po dva bazena sa $(NTMs)_4-SOC_4$ i dva sa SOC_4 nosačem. Oduzimanjem vrednosti apsorpcije, koja potiče od nosača SOC_4 od apsorpcije izmerene za polja $(NTMs)_4-SOC_4$, dobijena je vrednost O.D. koja isključivo potiče od specifičnog vezivanja anti-VIP/gp120 antitela za NTM1 peptid.

Prilikom postupka optimizacije najvažnije je odrediti optimalnu koncentraciju antigena za oblaganje polistirenske ploče, što se postiže nekom vrstom titracije, s obzirom da kapacitet proteina za apsorpciju zavisi od njegovih specifičnih karakteristika. Za ELISA metodu zasićenje vezivnih mesta na površini otvora se najčešće postiže u opsegu koncentracija 0.1-1 μ g/otvoru kada se radi o zapremini od 100 μ l/otvoru [99]. Pufer za oblaganje ne sme da sadrži nijedan protein koji bi mogao da dovede do nespecifičnog vezivanja za ploču.

Ispitivana je zavisnost očitane apsorpcije od koncentracije antigena kojom je obložena mikrotitarska ploča. Na **Slici 23** jasno se uočava korelacija između promene vrednosti O.D. i promene količine antigena. Uzorak u kome su očekivani viši nivoi anti-VIP/gp120 antitela (uzorak uzet neposredno posle treninga) pokazivao je povećanje reaktivnosti sa povećanjem količine NTM1 peptida/otvoru, dok je kod dva uzorka sa manjim titrom antitela (uzorak sportista uzet u mirovanju) reaktivnost za vrednosti veće od 0,5 μ g peptida/otvoru bila ujednačena. Ujednačeni porast apsorpcije, bez obzira na količinu peptida može se objasniti tako što se pri određenoj količini antigena postiže plato u reaktivnosti usled čega dalje povećanje količine peptida ne dovodi do promene intenziteta boje [99].

U testiranju je pokazano da se pri koncentracijama većim od 0,5 μ g po otvoru apsorpcija nije značajno menjala. Kako je planirano istraživanje podrazumevalo paralelno određivanje anti-VIP/gp120 antitela u uzorcima sportista nakon opterećenja, kada se očekuje povišen nivo antitela, kao i određivanje u uzorcima sa niskom koncentracijom anti-VIP/gp120 antitela (kontrolna grupa dobrovoljnih davalaca krvi i pacijenti oboleli od karcinoma) opredelili smo se za vrednosti 1 μ g (NTM1)₄-SOC₄ peptida/otvoru.

S obzirom na lošu termičku provodljivost mikrotitarskih ploča i opasnosti od nejednakog vezivanja u svim bazenima na povišenim temperaturama, oblaganje je trajalo od 16-18 sati na 4°C.

U narednim koracima ispitivano je optimalno razblaženja seruma i konjugata (sekundarnih antitela obeleženih enzimom). Primarna i sekundarna antitela rastvarana su u rastvoru za blokiranje, sa inertnim proteinom (BSA, eng. Bovin Serum Albumin) koji sprečava pasivno vezivanje antitela, ali istovremeno omogućava specifičnu imunološku reakciju [99]. Prilikom izbora optimalnog razblaženja za ispitivane serume korišćeni su uzorci u kojima se

očekuje pozitivan rezultat, dok su kao kontrole korišćeni uzorci kod kojih se nije očekivalo povećanje vrednosti merenog parametra. Različita razblaženja primarnih antitela omogućila su poređenje dobijenih vrednosti apsorbancija između pozitivnih i negativnih seruma, kao i ispitivanje eventualne pojave nespecifične reakcije, pri različitim razblaženjima negativnih kontrola [100].

Na **Slici 24** se jasno vidi da je dobijen jači signal pri manjem razblaženju seruma (1:100). Pri ovom razblaženju je vrednost apsorbancija za kontrolna polja, koja nisu bila oblagana peptidom, kao i vrednost za ona polja u koja nije stavljan serum već samo konjugat, bila niska. Brojevi iznad stubića u histogramu dobijeni su deljenjem vrednosti rezultata za jedan pozitivan i jedan kontrolni uzorak. Navedene vrednosti ukazuju da se bolja diskriminacija između pozitivnih i kontrolnih uzoraka postiže pri razblaženja seruma 1:100 nego pri razblaženju 1:250. Iz ovih razloga je u daljem radu korišćeno razblaženje seruma 1:100. U poređenju sa ELISA testovima koji se koriste za određivanje antitela koja se specifično sintetišu u različitim infekcijama, ovo je malo razblaženje seruma. Takva situacija je i očekivana, s obzirom da se radi o prirodnim antitelima, koja su prisutna u znatno manjim koncentracijama u odnosu na antitela čija je sinteza stimulisana prisustvom infektivnog agensa.

U okviru optimizacije ELISA testa, takođe je određivano optimalno razblaženje sekundarnih antitela, koje će dati maksimalnu analitičku osetljivost. Testiranje je pokazalo da razblaženje sekundarnih antitela u odnosu 1:250 daje visoku apsorbanciju u kontrolnim otvorima na ploči bez primarnih antitela, kao i u poljima sa kontrolnim uzorcima i uzorcima sportista. Ovo ukazuje na izraženu nespecifičnu reakciju. Bilo je potrebno napraviti kompromis između dva suprotna faktora, specifičnosti i osetljivosti. Manje razblaženje konjugata daje jači signal čime se povećava osetljivost testa. Ipak, veće koncentracije sekundarnih antitela su povezane sa povećanim nespecifičnim signalom (eng. background) [101].

Korišćenje razblaženja konjugovanih antitela od 1:250 davalo je visok signal na kontrolnim poljima, koja nisu oblagana antigenima. Ovo je ukazivalo da se pri visokim koncentracijama, sekundarna antitela nespecifično vezuju za samu polistirensku ploču. Razblaženje konjugata u odnosu 1:2500 nije bilo praćeno kontaminacijom kontrolnih bazenčića na mikrotitarskoj ploči i davalo

je jasnu razliku između ispitivanih i kontrolnih uzoraka, zbog čega je ovo razblaženje sekundarnih antitela korišćeno u daljem radu (**Slika 25**).

U poslednjem koraku ispitivan je uticaj koncentracije rastvora za blokiranje na analitičku osetljivost testa. Poređeno je blokiranje ploče i rastvaranje primarnih i sekundarnih antitela u 2,5% i 5% rastvoru BSA. Manja koncentracija BSA nije dala dobre rezultate, iako je postignuta zadovoljavajuća jačina signala. Korišćenje 2,5% rastvora BSA dovelo je do pojave nespecifičnog signala u kontrolnim bazenčićima na mikrotitarskoj ploči u koje nije dodat serum, a koja su služila za kontrolu kontaminacije procesa. Korišćenje 5% BSA doprinelo je da odnos apsorbancije dobijene za uzorak sportista i uzorak kontrole (prikazan vrednostima iznad stubića na histogramu), bude neznatno veći u odnosu na vrednosti dobijene korišćenjem 2,5% BSA (**Slika 26**). U narednim eksperimentima korišćen je 5% rastvor BSA, s obzirom da bi upotreba manjih razblaženja ovog proteina u postupku blokiranja, smanjila specifičnost ELISA testa.

Nepreciznost u seriji je određena deset puta ponovljenim merenjem jednog uzorka sportiste. Za procenu nepreciznosti iz dana u dan merenje je obavljeno na dva uzorka sportista oba pola i dva kontrolna uzorka, na pet različitih mikrotitarskih ploča tokom pet dana. Prema literaturnim podacima koeficijent varijacije manji ili jednak 15% za vrednost apsorbancije ukazuje na prihvatljivu reproducibilnost ELISA testa za ponavljane uzorke na istoj položi, kao i za ponavljanje merenja iz dana u dan [99]. Koeficijent varijacije (CV) za nepreciznost deset uzastopnih merenja na istoj ploči bio je 5,62%, dok je za reproducibilnost iz dana u dan CV varirao od 7,81 do 10,71%. Treba naglasiti da je na reproducibilnost ELISA testa za detekciju anti-VIP/gp120 antitela uticao veliki broj manuelnih postupaka počev od sinteze peptida za oblaganje, preko pravljenja puferskih rastvora do manualnog pipetiranja tokom izvođenja samog eksperimenta.

Iz svega navedenog može se zaključiti da ELISA metoda, čija je optimizacija prikazana u ovom radu, a detaljan postupak izvođenja izložen u poglavlju materijala i metoda, predstavlja semikvantitativnu metodu odgovarajuće osetljivosti i specifičnosti za detekciju prirodnih anti-VIP/gp120 antitela.

5.2. Uticaj pola na nivo anti-VIP/gp120 antitela

U ovom radu smo određivali nivo anti-VIP/gp120 antitela kod grupe dobrovoljnih davalaca krvi (20 muškaraca i 17 žena), koji ne upražnjavaju rekreativnu fizičku aktivnost. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela između muškaraca i žena. Ovaj rezultat potvrđuje i činjenica da ne postoji razlika u referentnom intervalu za koncentraciju VIP-a u populaciji zdravih muškaraca i žena [102]. Grupa autora izvršila je testiranje seruma 398 dobrovoljnih davalaca krvi ELISA testom, u kome je kao antigen korišćen NTM peptid [51]. Prema rezultatima ove studije približno 5% zdravih osoba ima prirodno značajno povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela. Ispitivanje izvršeno na 33 zdrava ispitanika pokazalo je da njih 8 ima prirodno povišen nivo ovih antitela i ustanovljeno je da je nivo ovih antitela individualna karakteristika [103].

Testiranje nivoa anti-VIP/gp120 antitela u grupi od 17 vaterpolista u mirovanju i 30 minuta posle fizičke aktivnosti je pokazalo da fizička aktivnost uzrokuje porast ovih prirodnih autoantitela kod svih ispitanika bez obzira na njihov početni, individualni nivo (**Slika 39**). Porast nivoa anti-VIP/gp120 antitela nakon fizičke aktivnosti posledica je povećanja koncentracije VIP-a tokom fizičke aktivnosti, s obzirom da je osnovna uloga ovih prirodnih autoantitela da regulišu nivo VIP-a u cirkulaciji [46,47]. Literaturni podaci ukazuju da različite vrste fizičke aktivnosti dovode do povećanja koncentracije VIP-a. Praćenje nivoa VIP-a tokom 30 minuta intenzivne vožnje bicikla (50% VO₂max) pokazalo je značajno povećanje količine VIP-a u cirkulaciji nakon 20 minuta intenzivne vožnje bicikla, ali je takođe ustanovljeno da nivo VIP-a u cirkulaciji nastavlja da se povećava još 5 do 10 minuta nakon prestanka fizičke aktivnosti [103]. Kod dvanaest skijaša, koji su u toku 4.45 do 6.5 časova u organizvanoj trci prešli 90 km, najviša koncentracija VIP-a je detektovana neposredno nakon završetka fizičke aktivnosti i nije se spuštala na početni nivo u toku sledećih 140 min [104].

Analizom porasta anti-VIP/gp120 antitela posle fizičke aktivnosti kod sportista i sportistkinja (**Slika 36**) utvrđeno je da fizička aktivnost dovodi do većeg porasta ovih antitela kod žena, nego kod muškaraca ($p=0,0043$). Srednja vrednost apsorbancije kod žena sportista iznosi 0,1644 što predstavlja

povećanje od 4 puta u odnosu na određenu srednju vrednost kontrole za žene, koja iznosi 0,041. Istovremeno, srednja vrednost apsorbancije kod muškaraca sportista iznosi 0,1055, što predstavlja povećanje od 2,6 puta u odnosu na vrednost 0,04 koja je određena za muškarce u kontrolnoj grupi. Testiranje dobrovoljnih davalaca pokazalo je da ne postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela između muškaraca i žena kod fizički neaktivne zdrave populacije ($p < 0,05$), zbog čega se navedena razlika može objasniti činjenicom da polni hormoni različito utiču na ekspresiju VIP-a tokom fizičke aktivnosti. Prema literaturnim podacima estradiol indukuje povećanu produkciju VIP-a stimulišući transkripciju VIP-og gena [105], za razliku od testosterona koji ne utiče na ekspresiju ovog gena [106]. Treba naglasiti da se značajno razlikuju literaturni podaci, kada je reč o uticaju fizičke aktivnosti na nivo estrogena. Prema jednoj grupi autora neposredno nakon intenzivnog fizičkog vežbanja dolazi do porasta koncentracije estradiola, testosterona i androstendiona u cirkulaciji, ali umerena fizička aktivnost ne dovodi do statistički značajne promene u koncentraciji estradiola [107]. Drugi autori ukazuju da fizička aktivnost dovodi do pada nivoa estradiola u cirkulaciji, zbog čega se fizička aktivnost preporučuje u prevenciji estrogen zavisnih tumora dojke [108]. Za značajniji porast nivoa VIP-a u serumu kod žena tokom fizičke aktivnosti, takođe je odgovaran DHEA (dehidroepiandrosteron), koji dovodi do aktivacije estrogenskih receptora ligand-nezavisnim putem. Fizička aktivnost utiče na porast koncentracije DHEA u cirkulaciji, u meri u kojoj može da aktivira estrogenske receptore i u slučaju niskog nivoa estrogena u cirkulaciji [107]. Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da fizička aktivnost utiče na ligand-nezavisni put aktivacije estrogenskog receptora, što dalje ima za posledicu povećanu transkripciju VIP-ovog gena kod žena. Kao odgovor na povećanu produkciju VIP-a raste i nivo prirodnih anti-VIP/gp120 antitela. Na ovaj način se može objasniti uočena razlika između muškaraca i žena u pogledu uticaja fizičke aktivnosti na produkciju anti-VIP/gp120 antitela.

Literaturni podaci takođe ukazuju na razlike između muškaraca i žena u imunom odgovoru na fizičku aktivnost. Tako je uočeno da žene imaju za 38% veći limfocitni odgovor od muškaraca pri dugotrajnoj vožnji bicikla [109]. Registrovana je pozitivna korelacija između nivoa estrogena u cirkulaciji i CD19 ćelija (B limfocita) kao odgovor na vožnju bicikla u trajanju od jednog sata u

toku kasne folikularne menstrualne faze [110]. Testiranje na životinjama je pokazalo da se imuni sistem ženki brže regeneriše posle fizičke aktivnosti nego mužjaka, kao i da je preživljavanje nakon virusne infekcije kod ženki veće [111]. Takođe je pokazano da ženke imaju povećanu imunu reaktivnost u odnosu na mužjake (mereno procentom limfocita u cirkulaciji) nakon dugotrajnog plivanja [112].

Kod žena je registrovan znatno slabiji inflamatorni odgovor na povrede mišića u toku fizičkog vežbanja nego kod muškaraca, iako se radilo o sličnom stepenu oštećenja [113]. Rezultati praćenja apoptoze limfocita izazvane intenzivnom fizičkom aktivnošću ukazuju da je ova razlika između muškaraca i žena karakteristična samo za žene koje se redovno bave intenzivnom fizičkom aktivnošću, dok razlika nije uočena kod žena koje se sporadično bave fizičkim vežbanjem [114]. Ovaj rezultat ukazuje da dugotrajna fizička aktivnost značajnije utiče na imuni sistem od povremenog neregularnog fizičkog vežbanja.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, kao i rezultata drugih autora, može se pretpostaviti da će protektivni efekat fizičke aktivnosti zasnovan na delovanju anti-VIP/gp120 antitela biti izraženiji kod žena nego kod muškaraca. Ovaj zaključak može biti posebno značajan kada se razmatra primena fizičke aktivnosti kako u prevenciji i terapiji raka dojke i prostate, tako i u terapiji ovih malignih bolesti.

5.3. Uticaj vrste sporta na produkciju anti-VIP/gp120 antitela

U ovom radu je testiran bazalni nivo anti-VIP/gp120 antitela kod grupe sportista (vaterpolisti, karatisti, veslači, rvači, kikbokseri) i sportistkinja (plivačice, vaterpolistkinje, odbojkašice) u odnosu na nivo anti-VIP/gp120 antitela, koji odgovara kontrolnoj grupi zdravih fizički neaktivnih dobrovoljnih davalaca. Ustanovljeno je da sve grupe sportista bez obzira na vrstu sporta koji treniraju imaju statistički značajano viši nivo anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na zdravu kontrolnu grupu, koja vodi pasivan način života. Nažalost testiranje ovih prirodnih autoantitela nije vršeno u drugim studijama na populaciji sportista, zbog čega nije moguće uporediti dobijene rezultate sa drugim istraživanjima. Takođe, nije poznat uticaj vrste sporta na porast koncentracije VIP-a u cirkulaciji, ali je utvrđeno je da različiti vidovi fizičke aktivnosti povećavaju nivo VIP-a u cirkulaciji. Bazalna koncentracija VIP u cirkulaciji se

kreće u intervalu 3,3 – 3,6 pmol/l, dok se posle fizičke aktivnosti povećava na 5.3 do 10.2 pmol/L, u zavisnosti od vrste fizičke aktivnosti i njenog trajanja [115].

U grupi ispitivanih sportista ne postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na vrstu sporta (**Slika 38**), iako je ustanovljena statistički značajna razlika u nivou ovih prirodnih autoantitela u odnosu na kontrolnu grupu zdravih muškaraca kod svih ispitivanih vrsta sporta pojedinačno. Za razliku od muškaraca kod žena je primenom jednofaktorske analize varijanse pokazano da postoji statistički značajna razlika u nivou ovih prirodnih autoantitela u odnosu na vrstu sporta, koji žene treniraju. U ovom istraživanju zabeležen je najviši nivo anti-VIP/gp120 antitela kod plivačica, a najniži kod odbojkašica (**Slika 37**).

5.4. Analiza interakcije između VIP-a i VPAC receptora

U ovom radu izvršena je analiza primarnih struktura VIP-a i VPAC receptora primenom ISM metode. Na osnovu dobijenih rezultata izveden je zaključak da je za interakciju VIP-a sa VPAC₁ i VPAC₂ receptorima na velikim rastojanjima (rastojanja veća od 5 Å) značajna informacija, koja je u njihovim informacionim spektrima reprezentovana frekventnim komponentama F(0.2188) i F(0.0310), respektivno (**Slika 50**). Određivanjem domena primarne strukture VIP-a, koji daje najveći doprinos informaciji, koja odgovara frekvencama F(0.2188) i F(0.0310) ustanovljeno je da je prvih deset aminokiselina u primarnoj strukturi VIP-a (HSDAVFTDNY) odgovorno za interakciju sa VPAC₁ receptorom (**Slika 51**), kao i da je domen koji uključuje aminokiseline 14 - 23 (RKQMAVKKYL) odgovoran za interakciju VIP-a sa VPAC₂ receptorom na udaljenostima većim od 5 Å (**Slika 52**). Prema literaturnim podacima ključnu ulogu u interakciji VIP/VPAC₁ na udaljenosti manjoj od 5 Å, kada dolazi do hemijskog vezivanja molekula, imaju tri aminokiseline na N-terminalnom kraju VIP-a: Phe⁶, Thr⁷, Asp⁸ (strukturni motiv FTD) [8]. Funkcionalno mapiranje VIP-a, izvršeno metodom informacionih spektara pokazalo je da domen, koji je odgovoran za interakciju na velikim udaljenostima između ovog peptida sa VPAC₁ receptorom uključuje i pomenuti strukturni FTD motiv.

Ranije je pokazano da serumi osoba inficiranih HIV virusom i pacijenata obolelih od astme sadrže povećanu koncentraciju anti-VIP/gp120 antitela, koja se vezuju za NTM peptid. NTM peptid se nalazi u konzerviranom C2 domenu glikoproteina gp120 HIV virusa i sadrži aminokiselinski FTD motiv [20]. Da bi utvrdili da li se kao odgovor na fizičku aktivnost sintetišu anti-VIP/gp120 antitela, čiji epitop uključuje FTD motiv, razvijen je ELISA test u kome je kao antigen korišćen NTM1 peptid (FTDNAKTI) koji je znatno kraći u poređenju sa ranije korišćenim peptidom NTM. Testiranje seruma aktivnih sportista na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela je pokazalo da su ova antitela reaktivna sa NTM1 peptidom, kao i da fizička aktivnost dovodi do povećane koncentracije ovih prirodnih autoantitela nezavisno od vrste fizičke aktivnosti ili pola sportista.

Kako je se strukturni motiv FTD, koji je uključen u interakciju između VIP-a i receptora VPAC1 unutar NTM1 peptida, može se zaključiti da anti-VIP/gp120 antitela koja se vežu za ovaj peptid interferiraju sa VIP/VPAC1 interakcijom, a da ne utiču na VIP/VPAC2 interakciju.

5.5. Značaj anti-VIP/gp120 antitela u HIV infekciji

Ranije je u longitudinalnoj studiji ispitivana reaktivnost seruma uzetih od 310 HIV inficiranih pacijenata sa NTM peptidom [116]. Broj CD4 ćelija kod ispitanika se kretao u intervalu od 10 do 800/ μ l. Rezultati ove studije su pokazali da je na početku HIV infekcije, kada se broj CD4 limfocita kod inficiranih osoba nalazi u intervalu od 600 do 800/ μ l, količina anti-VIP/gp120 antitela mala. Sa razvojem bolesti količina anti-VIP/gp120 antitela raste, da bi dostigla najveću vrednost pri broju CD4 ćelija između 200 i 400/ μ l. Kada broj CD4 ćelija padne ispod 200/ μ l količina NTM-reaktivnih antitela u serumu HIV pacijenata počinje da opada i taj trend se zadržava do kraja bolesti. Na osnovu ovih rezultata autori su sugerisali da NTM-reaktivna antitela predstavljaju jedan od poslednjih nivoa odbrane organizma od razvoja SIDE.

Rezultati izloženi u ovom radu su u saglasnosti sa ovom studijom (**Slika 40**). Kod pacijena 5, 6 i 7, kod kojih je broj CD4 ćelija bio u granicama normale (**Tabela 7**), nivo anti-VIP/gp120 antitela je bio ispod granice osetljivosti testa. Kod pacijenata P1 i P2, kod kojih je broj CD4/ μ l bio blizak 400/ μ l apsorbancije su imale najveće vrednosti. Pacijent P3, koji je bio u

stadijumu izražene SIDE kod koga je broj CD4/ μ l iznosio samo 91, nivo anti-VIP/gp120 antitela je bio blizak vrednostima za kontrolnu grupu HIV negativnih ispitanika. Jedino značajno odstupanje naših rezultata od onih koji su dobijeni u opisanoj longitudinalnoj studiji se odnosi na rezultat dobijen kod pacijenta P4 koji je i pored velikog broja CD4/ μ l imao visok nivo anti-VIP/gp120 antitela. Ako se uzme u obzir veoma mali broj virusnih kopija/ml (engl. viral load) kod ovog pacijenta, kao i činjenica da pacijent nije podvrgnut terapiji, iako je od trenutka infekcije do uzorkovanja seruma za analizu prošlo više od 5 godina, ne može se isključiti mogućnost da ovaj pacijent spada u grupu osoba koje imaju prirodno povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela, što doprinosi prirodnom usporavanju toka bolesti i svrstava ga u potencijalne LTNP HIV pacijente (eng. Long-term nonprogressors). Prilikom poređenja rezultata izloženih u ovom radu sa rezultatima koji su dobijeni u prethodno opisanoj longitudinalnoj studiji treba imati u vidu da je u studiji za ELISA test korišćen NTM peptid, koji je znatno duži od NTM1 peptida, što može biti razlog da se rezultati dobijeni u ELISA testovima u izvesnoj meri razlikuju.

Grupa autora je u kliničkoj studiji pokazala da pasivna imunizacija plazmom HIV-negativnih osoba, koja je obogaćena anti-VIP/gp120 antitelima i selektovana pomoću NTM peptida, usporava razvoj bolesti. Nakon šestomesečne terapije, koja se sastojala od infuzije 1L plazme obogaćene anti-VIP/gp120 antitelima mesečno, broj CD4 ćelija se kod tretiranog pacijenta znatno povećao i ostao stabilan tokom naredne 4 godine. Treba naglasiti da je maksimalan broj CD4 ćelija dostignut dve godine nakon okončanja terapije [51]. Činjenica da je usporavanje bolesti produženo znatno nakon nestanka anti-VIP/gp120 antitela koja su data pacijentu infuzijom ukazuje da se pozitivan efekat koji je ostvaren ovom terapijom ne može pripisati isključivo neutrališućem delovanju prirodnih autoantitela ili njihovom uticaju na životni ciklus virusa. Autori ukazuju da je delovanje anti-VIP/gp120 antitela takođe povezano sa nekim molekularnim mehanizmom, koji na duži vremenski period usporava razvoj bolesti. Polazeći od strukturne i informacione sličnosti između imunoglobulina i proteiona gp120 predložen je mehanizam prema kome ovaj virusni protein moduliše aktivnost imunog sistema tako što se uključuje u imunsku mrežu kao njena aktivna komponenta [117]. Prema ovom modelu protein gp120 se mutacijama adaptira tako da kodira sopstvene idiotope domaćina.

Izmenjeni protein gp120, koji kodira imunoglobulinski idiotip se u velikoj količini eksprimira na površini inficiranih T ćelija. Antitela koja prepoznaju idiotip (anti-idiotipska antitela), koji se nalazi na izmenjenom molekulu gp120 imaju mogućnost da se vezuju za receptore na B limfocitima i inhibiraju sintezu antitela na gp120. Imunomodulatornog delovanja proteina gp120 na imuni sistem dovelo je do smanjene sinteze antitela, koja blokiraju vezivanje VIP-a za CD4 receptore. To podrazumeva da se u repertoaru antitela, koja se proizvode kao odgovor na HIV infekciju smanjuje količina anti-VIP/gp120 antitela koja se vezuju za NTM1 peptid, koji je direktno uključen u vezivanje HIV-a za CD4 receptor.

Prirodna autoantitela koja čine oko 30% svih antitela u cirkulaciji, igraju važnu ulogu u imunom sistemu, jer neposredno utiču na održavanje njegove homeostaze. U ovu kategoriju prirodnih autoantitela spadaju i anti-VIP/gp120 antitela. Smanjenje broja ili potpuni izostanak nekih od prirodnih autoantitela može poremetiti funkciju celokupne imune mreže. Autori sugerišu da ukoliko se ova antitela veštačkim putem nadomeste, kao što je to učinjeno pasivnom imunizacijom anti-VIP/gp120 antitela u opisanom kliničkom eksperimentu, narušena imuna mreža se može ponovo uspostaviti, što će imunom sistemu omogućiti u dužem periodu uspešnu odbranu protiv HIV virusa.

Povišen nivo anti-VIP/gp120 antitela nađen je kod posebne grupe HIV pozitivnih pacijenata, kod kojih se bolest ne razvija 15 i više godina nakon infekcije virusom HIV-1 uprkos odsustvu terapije (LTNP pacijenti) [97].

Interesantno je uočiti da se procenat LTNP pacijenata, koji u opštoj populaciji HIV pacijenata kreće oko 3%, što je približno procentu zdravih osoba (dobrovoljnih davalaca krvi) kod kojih je nivo anti-VIP/gp120 antitela prirodno povećan [51].

Prikazani rezultati sugerišu da bi fizička aktivnosti imala protektivni efekat u usporavanju razvoja SIDE kod HIV pacijenata, jer utiče na povećanu produkciju anti-VIP/gp120 antitela. Značaj fizičke aktivnosti je utoliko veći, što fizička aktivnost predstavlja jedini izvor ovih prirodnih antitela, koja nije moguće indukovati vakcinom zbog sličnosti sa humanim imunoglobulinima i drugim humanim proteinima u organizmu (**Slika 15**). Sličnost proteina gp120 sa humanim imunoglobulinima ima poseban značaj kada je u pitanju razvoj efikasne vakcine protiv HIV virusa [118].

Grupa istraživača ukazala je na značaj prirodne mimikrije između VIP-a i gp120 u životnom ciklusu HIV-a. Prema predloženom mehanizmu HIV preko VPAC1 receptora pospešuje integraciju virusne cDNK u genom domaćina, jer omogućava formiranje preintegrativnog kompleksa (**Slika 7**) [22,23]. Sa druge strane aktivacija VPAC2 receptora pomoću agonista VIP-a dovodi do aktivacije tirozin-fosfataze, koja defosforilacijom tirozina u matriksnom proteinu virusa sprečava stvaranje preintegrativnog kompleksa (**Slika 8**) [24].

Ako se ima u vidu informaciona sličnost NTM1 peptida sa VIP-om i njegova strukturna sličnost sa domenom koji je uključen u direktnu interakciju VIP-a sa receptorom VPAC1 (**Slika 22**), može se očekivati da anti-VIP/gp120 antitela sprečavaju generisanje signala, koji dovodi do formiranja preintegrativnog kompleksa putem blokiranja interakcije između glikoproteina gp120 sa receptorom VPAC1. Važno je uočiti da se epitop ovih prirodnih autoantitela nalazi izvan dela VIP-a koji je uključen u njegovu interakciju sa receptorom VPAC2 (**Slika 52**). To ukazuje da anti-VIP/gp120 antitela ne utiču na vezivanje VIP-a za VPAC2 receptore i defosforilaciju tirozina u matriksnom proteinu HIV-a, čime se sprečava formiranje preintegrativnog kompleksa.

U ovom radu je AFM elektronskim mikroskopom testirano da li se monoklonska neutrališuća VRC01 antitela vezuju za površinu NTM1 peptida na kome se nalazi epitop za prirodna anti-VIP/gp120 antitela. VRC01 je neutrališuće antitelo koje svojim vezivanjem za gp120 prekriva oko 98% površine proteina gp120, koja je odgovorna za interakciju sa CD4 receptorom. Epitop na glikoproteinu gp120 za neutrališuća VRC01 antitela uključuje aminokiseline N276 i D279, koje se nalaze u NTM1 peptidu. Mesto vezivanja receptora CD4 za glikoprotein gp120 uključuje tri aminokiseline N276, D279 i N280 iz NTM1 peptida (**Slika 17**). Imajući u vidu mesta vezivanja neutrališućih VRC01 antitela, kao i činjenicu da antitela iz VRC klase nije moguće indukovati vakcinom, postoji mogućnost da su antitela detektovana u četiri od sedam ispitivanih seruma HIV pacijenta pomoću NTM1 peptida, upravo neutrališuća antitela, koja sprečavaju vezivanje HIV-a za CD4 receptor. Rezultati elektronske mikroskopije prikazani u ovom radu, koji potvrđuju vezivanje antitela VRC01 za peptid NTM1, idu u prilog ovoj pretpostavci. Poređenjem dimenzija monoklonskog antitela VRC01 i kompleksa dobijenog vezivanjem navedenih antitela za konjugat (NTM1)₄-SOC₄ primenom AFM elektronske mikroskopije

(**Slika 48**) potvrđeno je da konjugat (NTM1)₄-SOC₄ na svojoj površini ima četiri epitopa za vezivanje četiri VRCO1 antitela. Dobijeni rezultat ukazuje na činjenicu da bi ELISA test u kome bi ploča bila obložena (NTM1)₄-SOC₄ peptidom omogućila detekciju anti-VIP/gp120 antitela, što je eksperimentalno i potvrđeno.

Kao što smo ranije opisali, za sada jedina poznata antitela koja su u mogućnosti da efikasno neutrališu više od 90% svih tipova HIV-a su ona koja sprečavaju njegovo vezivanje za CD4 receptor. Ova antitela, u koja spada i VRCO1 antitelo, iako izolovana iz HIV pacijenata, nije moguće indukovati vakcinom [119]. Nedavno su McGuire i saradnici predložili modifikaciju strukture gp120, koja bi omogućila da se ovaj protein koristi kao antigen za produkciju VRCO1 antitela [120]. Prema ovim autorima, da bi se omogućilo da vakcina zasnovana na proteinu gp120 stimuliše produkciju VRCO1 antitela, neophodno je izvršiti mutacije unutar njegovog epitopa koji uključuje NTM1 peptid.

Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da anti-VIP/gp120 antitela deluju protiv HIV-a na sledeća tri načina:

- blokiraju vezivanje glikoproteina gp120 za CD4 receptor
- sprečavaju interakciju glikoproteina gp120 i VIP-a sa receptorom VPAC₁, što onemogućava formiranje preintegrativnog kompleksa neophodnog za translokaciju virusne cDNA u jedro i njenu ugradnju u genom domaćina
- utiču na održavanje homeostaze imune mreže.

Rezultati prikazani u ovom radu, koji potvrđuju stimulatивно delovanje fizičke aktivnosti na produkciju protektivnih anti-VIP/gp120 antitela, sugerišu da fizičko vežbanje treba da bude sastavni deo terapije HIV pozitivnih pacijenata u cilju poboljšanja kvaliteta života i usporavanja progresije bolesti. Posebno bi bilo značajno povećati nivo fizičke aktivnosti HIV pacijenata u periodu kada se zbog toksičnih efekata privremeno prekida HAART terapija (visoko aktivna antiretrovirusna terapija), što nosi rizik za povećanu replikaciju virusa u ćelijama rezervoarima. Za kratak period tzv. odmora od leka (eng.drug holiday) količina virusnih kopija/ml u krvi se može veoma brzo povećati (od nemerljivog broja virusnih kopija/ml (ispod 50 kopija/ml), pa do nekoliko hiljada virusnih kopija/ml za samo nekoliko nedelja). Svaki prekid, terapije

takođe nosi rizik za razvoj rezistencije virusa na lekove i pogoršanja opšteg stanja pacijenta, zbog čega bi trebalo fizičku aktivnost uključiti kao deo terapije i prirodan izvor anti-VIP/gp120 antitela, koja mogu umanjiti navedene negativne efekte strategijskog prekida terapije.

5.6. Značaj anti-VIP/gp120 antitela u malignim bolestima

Neutrališuća anti-VIP/gp120 antitela vezivanjem za epitop, koji uključuje FTD strukturni motiv inhibiraju brojne uloge VIP-a u kancerogenezi, koje ovaj molekul ostvaruje vezivanjem za VPAC1 receptore. U malignim bolestima VPAC1 receptori su molekularni targeti za dijagnozu i prevenciju karcinoma dojke i prostate. Brojni literaturni podaci ukazuju da fizička aktivnost ima preventivni značaj u nastanku karcinoma dojke i prostate, kao i da umerena fizička aktivnost može poboljšati kvalitet života i smanjiti mortalitet pacijenata obolelih od karcinoma dojke i prostate. U ovom radu ispitivan je nivo anti-VIP/gp120 antitela kod grupe pacijenata sa karcinomom dojke i prostate. Na osnovu rezultata ove studije kao i raspoloživih literaturnih podataka predložena je moguća uloga koju fizička aktivnost može imati u prevenciji nastanka i terapiji ovih vrsta karcinoma, s obzirom da fizička aktivnost doprinosi porastu anti-VIP/gp120 antitela u cirkulaciji.

5.6.1. Anti-VIP/gp120 antitela i karcinom dojke

Prema literaturnim podacima fizička aktivnost utiče na smanjeni rizik za nastanak karcinoma dojke. U studiji, koja je obuhvatila 1233 pacijentkinje sa karcinomom dojke i 1237 žena koje su činile zdravu, kontrolnu grupu, nije nađena zavisnost između fizičke aktivnosti i rizika za nastanak karcinoma dojke kod žena u reproduktivnom periodu, ali je ustanovljeno da fizička aktivnost umanjuje rizik za nastanak karcinoma dojke kod žena u menopauzi. Najznačajniji pad rizika za nastanak karcinoma dojke u menopauzi imale su žene kod kojih je povećana fizička aktivnost vezana za profesiju, ali i kod žena koje su obavljale naporne kućne poslove u održavanju domaćinstva. Zaključak izveden u ovoj studiji je da dugotrajna fizička aktivnost u većoj meri smanjuje rizik za nastanak karcinoma dojke u odnosu na periodično, rekreativno bavljenje sportom [121]. Rezultati meta analize koja je obuhvatila 50 studija pokazala je da postoji smanjene rizika za nastanak karcinoma dojke, u proseku

za 15 - 20%, kod žena koje se bave fizičkom aktivnošću u odnosu na žene, koje vode pasivan način života [122].

Pored brojnih istraživanja koja ukazuju da postoji pozitivan uticaj fizičke aktivnosti na nastanak karcinoma dojke, mnoga pitanja ostaju otvorena: koliko često, koliko dugo i koliko intenzivno fizičko vežbanje ima pozitivan uticaj na samo smanjenje rizika. Takođe, postavlja se pitanje da li kod svih vrsta karcinoma dojke fizička aktivnost ima povoljan učinak. Studija, u kojoj je grupa istraživača pokušala da odgovori na ova pitanja uključila je 1504 žene (233 sa neinvazivnom formom tumora, a 1271 sa invazivnim karcinomima dojke). Kontrolu je činilo 1555 zdravih žena između 20-98 godina, koje su poticale sa istog podneblja, čime je isključen uticaj sredine na nastanak karcinoma dojke. Zaključci izvedeni na osnovu podataka prikupljenih u ovoj studiji ukazuju da žene, koje su vežbale 10-19 sati/nedeljno imaju smanjeni rizik za nastanak karcinoma dojke za čak 30%, u odnosu na žene, koje su vodile pasivan način života. Fizička aktivnost posebno usporava nastanak karcinoma dojke, koji eksprimira hormonske receptore. Nisu uočene razlike u smanjenju rizika za karcinom dojke u odnosu na intenzitet vežbanja. Izveden je i zaključak da fizička aktivnost, nezavisno od njenog intenziteta, povoljno utiče na prevenciju karcinoma dojke žena u reproduktivnom periodu i u menopauzi [123].

Drugi literaturni podaci ukazuju da intenzivna fizička aktivnost može poboljšati kvalitet života i smanjiti mortalitet žena u menopauzi koje su obolele od karcinoma dojke, uključujući i pacijentkinje koje su vodile pasivan način života pre postavljanja dijagnoze. Značajan terapijski efekat je registrovan kod žena koje su 3 - 5 sati nedeljno vežbale. U zaključku autori ove studije sugerišu da bi trebalo ohrabriti žene sa dijagnostikovanim karcinomom dojke da se bave fizičkom aktivnošću [124].

U ovom radu određivan je nivo anti-VIP/gp120 antitela kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke. Ispitivano je prisustvo anti-VIP/gp120 antitela, kod 15 pacijentkinja, pri čemu je njihova ukupna koncentracija IgG antitela u serumu bila u granicama referentnog intervala, čime je potvrđeno da nisu bile podvrgnute imunosupresivnoj terapiji. Na osnovu dobijenih rezultata izveden je zaključak da pacijentkinje obolele od karcinoma dojke imaju statistički značajno snižen nivo protektivnih anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na kontrolnu grupu žena. Male koncentracije anti-VIP/gp120 antitela predstavljaju faktor rizika za

nastanak karcinoma dojke, s obzirom da ova prirodna autoantitela igraju značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti VIP-a kao faktora rasta i proangiogenog faktora u procesu kancerogeneze tumora dojke. Prema rezultatima ovog rada, anti-VIP/gp120 antitela vezivanjem za molekule VIP-a u segmentu koji uključuje strukturni FTD motiv, blokiraju delovanje VIP-a preko VPAC1 receptora na ćelije karcinoma dojke. U prilog značaju preventivnog delovanja anti-VIP/gp120 antitela govori činjenica da je ekspresija VPAC1 receptora povećana u najranijem stadijumu maligne transformacije kada morfološke promene na malignim ćelijama nije moguće detektovati histološkim pregledom. VPAC1 receptori su za 100% povećano eksprimirani na površini ćelija svih vrsta karcinoma dojke (na površini maligno transformisane ćelije karcinoma dojke nalazi se 10^4 VPAC1 receptora). Povećanje gustine VPAC1 receptora u najranijem stadijumu maligne transformacije upotrebljeno je za razvoj nove generacije dijagnostičkih biomarkera za rano otkivanje karcinoma dojke pomoću PET kamera. Dijagnostički biomarker TP3805, obeležen radioizotopom ^{64}Cu je specifičan i vezuje se velikom afinitetom za VPAC1 receptore (K_d $3,3 \cdot 10^9\text{M}$) tumora dojke, bez obzira na njihov hormonski status i stadijum kancerogeneze. TP3805 omogućava ranu i preciznu dijagnozu karcinoma dojke upravo zahvaljujući svojoj specifičnosti za VPAC1 receptore [125]. Isti autori su dizajnirali i molekularni marker za PET kameru TP3939 koji za osnovu ima N-terminalni peptid VIP-a HSDAVFTDNZTKLRKQ koji služi za dijagnostiku tumora dojke, prostate, jajnika, pankreasa, pluća, debelog creva i jetre.

Činjenica da tumorske ćelije raka dojke eksprimiraju na svojoj površini veliki broj VPAC1 receptora otvara mogućnost korišćenja VPAC1 proteina kao značajnog terapijskog targeta. Citostatici koji se koriste u terapiji ove maligne bolesti su po pravilu veoma toksični za zdravo tkivo, zbog čega izazivaju brojne prateće neželjene efekte. Da bi se ovaj efekat umanjio potrebno je koristiti što niže doze leka uz približno isti terapijski efekat. Danas se to postiže upotrebom nanočestica (lipidi, srebro, hidroksiapatit, itd) koje nose samo nekoliko molekula leka. Problem nove generacije lekova je u tome što noseće nanočestice nisu tkivno-specifične. Da bi se usmerile na željeni terapijski target (u ovom slučaju receptor VPAC1), na njih se vežu „usmeravajući“ molekuli koji predstavljaju njegov prirodni ligand ili anti-target antitela. Predložena je primena citostatika inkapsuliranih u biorazgradivu i biokompatibilnu

nanočesticu fosfolipida koja kao "usmeravajući" molekul prema receptoru VPAC₁ koristi VIP [126].

Navedeni rezultati sugerišu značaj anti-VIP/gp120 antitela, koja sprečavaju vezivanje VIP-a za VPAC₁ receptore i direktno inhibiraju funkciju VIP-a kao faktora rasta tumorskih ćelija. Ako se uzme u obzir podatak da su upravo faktori rasta molekuli, koji omogućavaju rast tumorskih ćelija u kulturi, kao i činjenica da veliki broj tumora ima autokrino regulisanu sekreciju ovih molekula, onda se može smatrati da je protektivno delovanje anti-VIP/gp120 antitela veoma značajno. Selektivni inhibitorski efekat, koji anti-VIP/gp120 antitela imaju u prenosu signala preko VPAC₁ receptora može biti jednim delom odgovoran za rezultate epidemioloških studija prema kojima žene koje se aktivno bave fizičkom aktivnošću imaju smanjeni rizik za nastanak karcinoma dojke u odnosu na žene koje vode pasivan način života.

Brojna istraživanja ukazuju na značaj primene antagonista VPAC₁ receptora u terapiji karcinoma dojke. Mali interferirajući molekuli RNK (engl. small interference RNA, siRNA), korišćeni su za ispitivanje uticaja VIP-a na ćelije karcinoma dojke, koje na svojoj površini imaju veliki broj VPAC₁ receptora. Mali siRNK molekul u potpunosti ometa stimulatorski efekat VIP-a, koji se ostvaruje preko VPAC₁ receptora, na lučenje glavnog angiogenog faktora VEGF, kao i transaktivaciju receptora epidermalnog faktora rasta EGFR i HER2. Navedeni receptori pripadaju proteinskoj familiji HER receptora tirozin kinaze. Istraživci su ukazali na značaj transaktivacije EGFR i HER2 receptora u VIP stimulisanom sekreciji VEGF molekula. Dobijeni rezultat je potvrđen blokiranjem aktivnosti tirozin kinaze primenom selektivnih HER inhibitora. U zaključku ovog istraživanja istaknut je značaj specifičnog signala, koji se ostvaruje preko VPAC₁ receptora u malignim ćelijama karcinoma dojke i sugerise se primena antagonista VPAC₁ receptora u kombinovanim, ciljnim terapijama raka dojke [28]. Fizička aktivnost, kao prirodan izvor anti-VIP/gp120 antitela, koja selektivno ometaju interakciju VIP-a sa VPAC₁ receptorima mogu da poboljšaju efikasnost terapije karcinoma dojke. Ovo indirektno potkrepljuju i rezultati epidemiološke studije prema kojima fizička aktivnost smanjuje mortalitet žena u menopauzi, koje su obolele od karcinoma dojke [124].

VPAC₁ receptori su povećano eksprimirani na površini estrogen zavisnih i estrogen nezavisnih karcinoma dojke. Nedavno je otkriveno da VIP u maligno

transformisanim ćelijama raka dojke uzrokuje prebacivanje jednog dela VPAC1 receptora sa ćelijske membrane u jedro gde učestvuje u procesima genske transkripcije, što dodatno potvrđuje značaj ovog proteina kao terapijskog targeta za karcinom dojke [29]. O značaju smanjenja rizika za nastanak karcinoma dojke kod profesionalnih sportista govori studija provedena na grupi 6124 ispitanika. Ispitanike su činili aktivni sportisti seniori (starosti >17 godina) koji su učestvovali u međunarodnim takmičenjima, isključivo u pojedinačnim disciplinama u periodu od 1936-2006. godine. Potvrđeno je da postoji smanjeni rizik za nastanak karcinoma dojke u grupi ispitanika, posebno žena koje su nastavile sa umerenom fizičkom aktivnošću i nakon prestanka profesionalnog sportskog angažovanja [127]. U navedenoj studiji nije ponuđen molekularni mehanizam koji bi dao objašnjenje za dobijene rezultate. Određivanje anti-VIP/gp120 antitela kod profesionalnih sportista pokazalo je statistički značajan porast prirodnih autoantitela u odnosu na kontrolnu grupu žena. Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu predložen je mehanizam preventivnog delovanja fizičke aktivnosti, prema kome anti-VIP/gp120 antitela vezivanjem za strukturni FTD motiv u molekulu VIP-a onemogućavaju njegovo vezivanje za VPAC1 receptore čime se blokira aktivnost VIP-a kao faktora rasta i proangiogenog faktora u tumorskim ćelijama karcinoma dojke. Nedostatak anti-VIP/gp120 antitela omogućava pojačano delovanje VIP-a u kancerogenezi, što potvrđuju rezultati testiranja pacijentkinja sa karcinomom dojke.

U uvodnom delu ovog rada prikazan je značaj VIP-a u regulaciji BMI i smanjenju ukupnog sadržaja masti u organizmu, koji se ostvaruje posredstvom VPAC2 receptora. Rezultati PBGW analize (eng. Pathway-Based Genom-Wide) identifikovali su VIP kao najznačajniji faktor u redukciji BMI [35]. Gojaznost je uzrok razvoja 7-15% karcinoma dojke u razvijenim zemljama. Preko 100 studija ukazuje da je prekomerna telesna težina uzrok povećanog rizika za nastanak karcinoma dojke kod žena u menopauzi [127,128].

Meta analiza koja je uključila 31 studiju žena u menopauzi ukazuje na porast rizika za nastanak karcinoma dojke za čak 12% za svako povećanje BMI za 5 kg/m² (npr. porast BMI sa 25 na 30 kg/m²) [128]. Umerena fizička aktivnost, kao što je brza šetnja 120 min/nedeljno povezana je sa promenom sadržaja masti kod žena u menopauzi, što se odražava na smanjenje stope smrtnosti kod žena sa karcinomom dojke [129]. Žene mlađe od 45 godina kod kojih je

dijagnostikovana invazivna forma karcinoma dojke i čiji je BMI > 25 kg/m² imaju 2,5 puta veći rizik od smrtnog ishoda u narednih 5 godina od postavljanja dijagnoze, u odnosu na žene čiji je BMI < 21 kg/m² [130].

Određivanje segmenta VIP-a koji je odgovaran za interakciju VIP-a sa VPAC2 receptorima pokazalo je da su aminokiseline od 14-23 u primarnoj strukturi VIP-a odgovorne za njegovu interakciju sa VPAC2 receptorima. Kako se anti-VIP/gp120 antitela ne vezuju za ovaj segment VIP-a ona ne interferiraju sa aktivacijom signalnog puta koji uključuje VIP/VPAC2 interakciju. Navedeni podaci sugerišu da fizička aktivnost kroz stimulaciju povećane sinteze VIP-a, posredstvom VPAC2 receptora utiče na smanjenje BMI, čime se smanjuje smrtnost kod žena sa dijagnostikovanim karcinomom dojke. Može se pretpostaviti da i u ovom slučaju, kao što je to konstatovano i kod HIV infekcije, anti-VIP/gp120 antitela blokirajući interakciju VIP-a sa VPAC1 receptorom potencirajući njegovo delovanje na VPAC2 receptore.

Iz svega navedenog može se zaključiti da fizička aktivnost deluje protektivno na razvoj karcinoma dojke, jer sa jedne strane direktno utiče na smanjenje telesne težine, kroz povećanu produkciju VIP-a i indirektno dovodi do porasta protektivnih anti-VIP/gp120 antitela, koja sprečavaju delovanje VIP-a kao faktora rasta i proangiogenog faktora za tumorske ćelije karcinoma dojke.

5.6.2. Anti-VIP/gp120 antitela i karcinom prostate

Karcinom prostate je jedan od najčešćih uzroka morbiditeta i mortaliteta u muškoj populaciji u svetu. Prema analizama objavljenim u preglednom radu koji je analizirao studije koje su se bavile efektima fizičke aktivnosti na smanjenje rizika za nastanak karcinoma prostate ustanovljeno je da fizička aktivnost dovodi do smanjenog rizika za nastanak karcinoma prostate u proseku 10-30% [131]. Istraživanje uticaja fizičke aktivnosti na karcinom prostate, koje je uključilo 307 muškaraca (164 belca i 143 crnca) ukazalo je da kod pripadnika crne rase nije nađena zavisnost između nivoa fizičke aktivnosti i rizika za nastanak karcinoma prostate. Takođe, utvrđeno je da kod pripadnika bele rase, muškarci izloženi umerenoj ili intenzivnoj fizičkoj aktivnosti imaju smanjeni rizik za nastanka karcinoma prostate za čak 53%. Ista grupa istraživača pokazala je da fizička aktivnost kod pacijenata sa karcinomom prostate za 13% smanjuje rizik za progresiju karcinoma do viših stadijuma [132]. Prema literaturnim

podacima nije nađena zavisnost između intenziteta fizičke aktivnosti i smanjenja rizika za nastanak karcinoma prostate. Kod grupe muškaraca koji su 40 i više sati tokom nedelje fizički aktivni ustanovljeno je smanjenje rizika za nastanak karcinoma prostate za čak 27%. Međutim smanjeni rizik za nastanak karcinoma prostate nađen je takođe i kod grupe muškaraca koji su se rekreativno bavili fizičkom aktivnošću 3 - 4,7 sati/nedeljno [133]. Studija koja je uključila 2705 pacijenata sa karcinomom prostate u periodu 1990-2008. godine ukazala je na smanjen mortalitet kod 61% pacijenata, koji su se bavili fizičkom aktivnošću više od 3 sata/nedeljno. U zaključku ove studije naglašeno je da je pozitivan efekat ostvaren kroz različite vidove fizičke aktivnosti: vožnju bicikla, tenis, trčanje i plivanje [134].

U ovom radu smo ispitivali nivo anti-VIP/gp120 antitela kod 17 pacijenata sa karcinomom prostate i ustanovili da postoji snižen nivo ovih prirodnih protektivnih autoantitela u odnosu na zdravu kontrolnu grupu. Ukupan nivo IgG antitela bio je u granicama referentnog intervala što ukazuje da je smanjenje anti-VIP/gp120 antitela kod ove grupe pacijenata bilo specifično. Kao i u slučaju karcinoma dojke VIP preko VPAC1 receptora igra važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji tumorskih ćelija karcinoma prostate. VIP igra važnu ulogu u tkivu prostate s obzirom da stimuliše sekreciju ove žlezde, inhibira kontrakciju njene muskulature, stimuliše proliferaciju epitelnih ćelija i povećava sekreciju prostata specifičnog antigena (PSA). U studiji sprovedenoj na životinjama pokazano je da je odnos VPAC1/VPAC2 receptora na prostati pacova 80/20 i da su registrovani funkcionalni samo VPAC1 receptori, čime je potvrđen značaj ovih receptora i VIP-a u tkivu prostate [135]. Brojni literaturni podaci govore o značaju VIP-a i VPAC1 receptora u kancerogenezi, jer VIP deluje na proliferaciju i diferencijaciju tumorskih ćelija prostate uključivanjem u različite procese:

- neuroendokrinu stimulaciju diferencijacije tumorskih ćelija prostate posredstvom kinaza ERK (eng.extracellular signal-regulated kinase), MEK (eng.mitogen-activated protein kinase) i PI3K (eng.phosphoinositide 3-kinase) [136];
- stimulisanje sinteze Ras onkogeno što doprinosi malignoj transformaciji ćelija karcinoma prostate [137];

- aktivira antiapoptički signalni put i time produžava životni vek maligno transformisanim ćelijama karcinoma prostate [45];
- VIP predstavlja proinflamatorni citokin koji deluje preko NFkappaB/COX-2 sistema u karcinomu prostate [138];
- VIP stimuliše rast malignih ćelija i deluje kao proangiogeni faktor kod karcinoma prostate [139].

Posebno je značajno pomenuti istraživanje u kome je ispitivan uticaj oksidativnog stresa i fizičke aktivnosti na razvoj karcinoma prostate [140]. Fizička aktivnost uzrokuje povećanje nivoa slobodnih kiseoničnih radikala (eng. reactive oxygen species, ROS), koji posredstvom različitih mehanizama stimulišu razvoj karcinoma prostate [141]. Sa druge strane, aktiviranje VIP-ovog signalnog puta značajno doprinosi oksidativnom stresu, a samim tim i povećanju ROS-a. Primena antagonista VIP-a JV-1-53 blokira oslobađanje kiseoničnih radikala [142]. Na osnovu ovih rezultata mogao bi se izvesti zaključak da fizička aktivnost negativno utiče na razvoj karcinoma prostate, što je u suprotnosti sa rezultatima opisanih epidemioloških studija, koji govore o protektivnom efektu fizičke aktivnosti. Moguće objašnjenje za ovu neusaglašenost, koju u svome radu posebno diskutuju autori navedenog istraživanja, leži u anti-VIP/gp120 antitelima. Naime fizička aktivnost u kratkom vremenskom periodu značajno povećava nivo VIP-a u cirkulaciji, ali istovremeno stimuliše i produkciju anti-VIP/gp120 antitela, koja sa jedne strane sprečavaju delovanje VIP-a kao tumorskog faktora rasta, a sa druge strane sprečavaju aktiviranje signalnog puta VIP-a, koji uzrokuje porast kiseoničnih radikala. Ovo čini da je ukupni efekat fizičke aktivnosti pozitivan kada je u pitanju kancer prostate.

Činjenica da tumorske ćelije raka prostate eksprimiraju znatno veći broj VPAC₁ receptora od ćelija zdravog tkiva prostate, omogućio je razvoj dijagnostičkih testova za rano otkrivanje karcinoma prostate. Jedan od dijagnostičkih testova koristi analog VIP-a TP3939, koji se koristi i za ranu detekciju karcinoma dojke. Tkivna distribucija TP3939 (%ID/g) je daleko veća u tumorskom tkivu prostate u poređenju sa zdravim tkivom prostate (distribucija 7.48 ± 3.63 %ID/g za 4 h u tumorskom tkivu i 1.9 ± 0.5 %ID/g za 4 h u zdravom tkivu prostate) [143].

Rezultati istraživanja u ovom radu kao i navedeni literaturni podaci drugih autora nedvosmisleno ukazuju da VIP kao faktor rasta i proangiogeni faktor ima veoma važnu ulogu u patogenezi karcinoma dojke i prostate. Ako se ima u vidu da anti-VIP/gp120 antitela predstavljaju jedan od osnovnih regulatora nivoa VIP-a u organizmu [46,47,61], može se očekivati da ova prirodna autoantitela imaju značajnu protektivnu ulogu kod raka dojke i prostate. Obzirom da je nivo ovih antitela kod HIV pacijenata značajno viši u poređenju sa anti-VIP/gp120 antitelima zdravih fizički neaktivnih osoba, moglo bi se očekivati da infekcija ovim virusom predstavlja protektivni faktor za razvoj karcinoma dojke i prostate u HIV-pozitivnoj populaciji. Drugim rečima, učestanost ovih malignih bolesti kod HIV inficiranih osoba trebalo bi da bude manja od one koja odgovara opštoj populaciji. Rezultati brojnih epidemioloških i kliničkih studija potvrđuju ovu pretpostavku. Uprkos činjenici da je učestalost malignih bolesti (karcinom pluća, jetre, grla, debelog creva, melanomi i leukemije) značajno povećana kod osoba inficiranih HIV-om [144-146] u odnosu na opštu populaciju, učestanost karcinoma dojke i prostate je značajno manja [147,148]. Grupa autora ukazuje da je karcinom dojke jedino maligno oboljenje u populaciji HIV inficiranih žena, koji će se sa značajno malom verovatnoćom razviti kod ove grupe pacijentkinja [149]. Sa druge strane autori jedne retrospektivne studije ukazuju na malu incidencu za nastanak karcinoma dojke u populaciji HIV pozitivnih žena navodeći podatak da je do 2004. godine objavljeno samo 46 slučajeva ovog oboljenja kod HIV-pozitivnih [150]. Rizik za nastanak karcinoma prostate je za 50% manji kod HIV pozitivnih pacijenata u odnosu na opštu populaciju [151]. Na osnovu rezultata ovih studija može se pretpostaviti da anti-VIP antitela blokirajući aktivnost glikoproteina gp120 kao VIP mimetika značajno doprinosi kontroli SIDE, ali istovremeno protektivno deluje na rak dojke i prostate sprečavajući uticaj VIP-a na maligno transformisane ćelije. Rezultati testiranja seruma osoba obolelih od karcinoma dojke i raka prostate na prisustvo anti-VIP/gp120 antitela, koji su prikazani u ovom radu, potvrđuju da je nivo anti-VIP/gp120 antitela značajno niži kod obolelih u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom. Važno je uočiti da su ukupni imunoglobulini kod testiranih pacijenata bili u granicama referentnog intervala iz čega se može zaključiti da funkcija imunog sistema nije bila značajno narušena bolešću. Ovo ukazuje da snižen nivo anti-VIP/gp120 antitela

predstavlja faktor rizika za nastanak i progresiju karcinoma dojke i prostate, što sugeriše da nivo ovih antitela u serumu može poslužiti kao prognostički marker za ove bolesti. Sa druge strane, fizička aktivnost koja utiče na povećanu sintezu anti-VIP/gp120 antitela predstavlja važan faktor u prevenciji i terapiji karcinoma dojke i prostate. Međutim, činjenica da VIP i njegov signalni put predstavljaju samo deo u kompleksnom mehanizmu patogeneze tumora dojke i prostate ne može se očekivati da fizička aktivnost u potpunosti obezbedi prevenciju i kontrolu ovih malignih bolesti.

Rezultati izloženi u ovom radu koji pokazuju da fizička aktivnost stimuliše sintezu anti-VIP/gp120 antitela, koja suprimiraju aktivnost VIP-a, kao i brojni literaturni podaci koji potvrđuju pozitivan uticaj fizičke aktivnosti na karcinom dojke i prostate, može se zaključiti da fizičko vežbanje predstavlja prirodan, neškodljiv i svima dostupan način prevencije i pomoćne terapije.

U prilog ovom zaključku idu i nedavno objavljeni rezultati najveće evropske studije o uticaju fizičke aktivnosti na rak dojke [152]. Prema ovoj do sada najobimnijoj studiji koja je obuhvatila 257.805 žena sa srednjim vremenskim intervalom praćenja od 11,6 godina, umerena i intenzivna fizička aktivnost smanjuje procenat oboljevanja od agresivnih oblika karcinoma dojke za 13% kod fizički aktivnih žena u odnosu na žene koje vode pasivan način života. Veći uticaj fizičke aktivnosti može se očekivati u prevenciji i terapiji karcinoma dojke u odnosu na karcinom prostate s obzirom da je zabeležen značajniji porast anti-VIP/gp120 antitela kod sportistkinja u odnosu na porast ovih antitela koji je zabeležen kod sportista u odnosu na kontrolnu grupu.

5.7. Značaj N-terminalnog domena primarne strukture VPAC1 receptora za selekciju antagonista VIP-a

ISM analizom primarne strukture VPAC1 receptora identifikovan je domen 31-96 na N-terminalnom delu receptora VPAC, koji je odgovoran za interakciju sa VIP-om. Pregledom baze proteinskih struktura (eng. Protein Data Bank - PDB) upoređeni su dobijeni rezultati sa dostupnim podacima o 3D strukturi proteina, prema kojima se na N-terminalnom delu VPAC1 receptora nalazi segment, koji obuhvata aminokiseline 8-117 (pozicije odgovaraju nematuriranom proteinu u koji je uključen signalni peptid) i koji je ključan za interakciju sa VIP-om. Na **Slici 3** istaknute su aminokiseline koje učestvuju u direktnom vezivanju VIP-a za VPAC1 receptor: W67, D68, W73 i G109 u nematuriranom proteinu (W37, D38, W43 i G79 u proteinu bez signalnog peptida) [11]. Kao što se može videti na **Slici 3** domen od 31-96, koji je identifikovan ISM analizom formira džep važan za interakciju sa VIP-om. Ovakva struktura je povoljna za ugradnju malih molekula ili peptida, koji bi mogli da inhibiraju aktivnost VPAC1 receptora i tako poslužiti za konstrukciju farmakofora, koje bi koristili u razvoju lekova za modulisanje VIP-ovog signalnog puta.

Strukturne karakterike domena VPAC2 receptora, koji je uključen u dalekodosežnu interakciju sa VIP-om, a koji obuhvata amino kiseline 81 – 120 u maturiranoj formi proteina, nije bilo moguće analizirati s obzirom da u bazi proteinskih struktura ne postoje podaci za ovaj protein [153].

6. Značaj istraživanja i naučni doprinos

U skladu sa ciljevima studije, razvijen je ELISA imunoesej koji se pokazao kao pouzdan za određivanje prisustva anti-VIP/gp120 prirodnih autoantitela u serumu. Primenom ovog testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika u nivou anti-VIP/gp120 antitela u serumima HIV-pozitivnih osoba, pacijenata obolelih od karcinoma dojke i prostate, sportista i kontrolne grupe zdravih, fizički neaktivnih ispitanika. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. Peptid NTM1, koji se nalazi unutar konzerviranog C2 regiona glikoproteina gp120 virusa HIV-1 i koji ima strukturnu i informacionu sličnost sa VIP-om, predstavlja antigen pogodan za detekciju anti-VIP/gp120 antitela ELISA metodom.
2. U serumima osoba koje se bave intenzivno fizičkom aktivnošću nivo anti-VIP/gp120 antitela značajno je viši u poređenju sa kontrolnom zdravom populacijom, koja vodi pasivan način života. Ovaj rezultat potvrđuje da fizička aktivnost deluje stimulatивно na produkciju ovih prirodnih autoantitela.
3. Fizička aktivnost u većoj meri stimuliše produkciju anti-VIP/gp120 antitela kod žena nego kod muškaraca, što se može objasniti uticajem polnih hormona i njihovom ulogom u ekspresiji VIP-a.
4. Serumi HIV pozitivnih osoba sadrže povećan nivo anti-VIP/gp120 antitela u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Rezultati elektronske mikroskopije i ELISA metode ukazuju da su anti-VIP/gp120 antitela krosreaktivna sa neutrališućim, monoklonskim antitelom širokog spektra VRC01. Ovo sugerše:
 - da anti-VIP/gp120 antitela imaju protektivnu ulogu kod osoba inficiranih HIV-1 virusom tako što doprinose sporijem razvoju SIDE;
 - da fizička aktivnost kod ovih pacijenata može predstavljati efikasnu pomoćnu terapiju, naročito u periodu strategijskog prekida HAART terapije (eng.drug-holiday).
5. Osobe obolele od karcinoma dojke i prostate imaju značajno snižen nivo anti-VIP/gp120 antitela u serumu u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika. Obzirom da VIP predstavlja faktor rasta i proangiogeni faktor za navedene vrste tumora, može se pretpostaviti da

nedostatatak anti-VIP/gp120 antitela smanjuje otpornost organizma na razvoj ovih malignih bolesti. Rezultati ove studije, takođe sugerišu da fizička aktivnost koja stimuliše produkciju ovih antitela, igra značajnu ulogu u prevenciji i terapiji raka dojke i prostate.

6. Mehanizam protektivnog delovanja anti-VIP/gp120 antitela u HIV-1 infekciji, karcinomu dojke i prostate u najvećoj meri je zasnovan na blokiranju VIP/VPAC1 interakcije, a u slučaju HIV-a i na blokiranju gp120/CD4 interakcije.
7. Funkcionalno mapiranje VIP-ovih receptora bioinformatičkim metodama je pokazalo da domen 31 – 96 kod VPAC1, kao i domen 81 – 120 kod VPAC2 predstavljaju target za razvoj terapijskih antagonista i agonista VIP-a.

LITERATURA:

1. Dimaline R. Vasoactive intestinal peptide. *The Comparative Physiology of Regulatory Peptides* 1989; 150-173.
2. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 249-290.
3. Langer I. Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Front Endocrinol* 2012; 3: 129.
4. Edward Stevens, Ian D. Hume *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge University Press 2004.
5. Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; 18: 1325-1334.
6. Gutierrez-Canas I, Juarranz M. G, Collado B, Rodriguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto J. C, et al. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate* 2005; 63: 44-55.
7. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 52-63.
8. Igarashi H, Ito T, Hou W, Mantey SA, Pradhan TK, Ulrich CD 2nd, Hocart SJ, Coy DH, Jensen RT. Elucidation of vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(1) receptors in human, rat, and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 37-50.
9. Igarashi H, Ito T, Pradhan TK, Mantey SA, Hou W, Coy DH, Jensen RT. Elucidation of the vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(2) receptors in human and rat and comparison to the pharmacophore for VPAC(1) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 445-460.
10. Laburthe M, Couvineau A, Tam V. Class II G-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; 28: 1631-1639.
11. Lins L, Couvineau A, Rouyer-Fessard A, Nicole P, Maoret J, Benhamed M, Brasseur R, Annick Thomas A, Laburthe M. The human VPAC1 receptor: 3D model and mutagenesis of the Nterminal domain. *J Biol Chem* 2001; 276: 10153-10160.

12. Delafuente M, Delgado M, Gomeriz RP. VIP modulation of immune cell functions. *Advances in Neuroimmunology* 1996; 6: 75.
13. Pozo D, Delgado M, Martinez C, Guerrero JM, Leceta J, Gomariz RP, Calvo JR. Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunol Today* 2000; 21: 7.
14. Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001; 49: 101-10.
15. Sun L, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production through different molecular mechanisms in T cells activated via the T cell receptor/CD3 complex. *J Neuroimmunol* 1993; 48: 59.
16. Xin Z, Tang H, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production in murine thymocytes activated via the TCR/CD3 complex. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 59.
17. Brenu E W, Tajouri L, Staines D R, Marshall-Gradisnik SM. Vasocative neuropeptides in autoimmune diseases. *Autoimmune disorders - Current concepts and advances from bedside to mechanistic insights* 2011; 455-476.
18. Branch DR, Valenta LJ, Yousefi S, Sakac D, Singla R, Bali M, Sahai BM, Ma XZ. VPAC₁ is a cellular neuroendocrine receptor expressed on T cells that actively facilitates productive HIV-1 infection. *AIDS* 2002;16: 309-319.
19. Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai XP, Xuong NH, Axel R, Sweet RW. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 1990; 348: 419-426.
20. Veljkovic V, Metlas R, Raspopovic J, Pongor S. Spectral and sequence similarity between vasoactive intestinal peptide and the second conserved region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120): possible consequences on prevention and therapy of AIDS. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 705-710.
21. Koh SW. Signal transduction through the vasoactive intestinal peptide receptor stimulates phosphorylation of the tyrosine kinase pp60c-src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 174: 452-458.

22. Gally P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 1995; 83: 569-576.
23. Camaur D, Gally P, Swingler S, TronoD. Human immunodeficiency virus matrix tyrosine phosphorylation: characterization of the kinase and its substrate requirements. *J Virol* 1997; 71: 6834-6841.
24. Bokaei PB, Ma XZ, Sakac D, Branch DR. HIV-1 integration is inhibited by stimulation of the VPAC2 neuroendocrine receptor. *Virology* 2007; 362: 38-49.
25. Gespach C, Bawab W, de Cremoux P, Calvo F. Pharmacology, molecular identification and functional characteristics of vasoactive intestinal peptide receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5079-5083.
26. Zia H, Hida T, Jakowlew S, Birrer M, Gozes Y, Reubi JC, Fridkin M, Gozes I, Moody TW. Breast cancer growth is inhibited by vasoactive intestinal peptide (VIP) hybrid, a synthetic VIP receptor antagonist. *Cancer Res* 1996; 56: 3486-3489.
27. Valdehita A, Bajo AM, Schally AV, Varga JL, Carmena MJ, Prieto JC. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces transactivation of EGFR and HER2 in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 302: 41-48.
28. Valdehita A, Carmena MJ, Bajo AM, Prieto JC. RNA interference-directed silencing of VPAC1 receptor inhibits VIP effects on both EGFR and HER2 transactivation and VEGF secretion in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348: 241-246.
29. Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC, Carmena MJ. Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides* 2010; 31: 2035-2045.
30. Dagar S, Sekosan M, Rubinstein I, Onyüksel H. Detection of VIP receptors in MNU-induced breast cancer in rats: implications for breast cancer targeting. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65: 49-54.
31. Dagar S, Sekosan M, Lee BS, Rubinstein I, Onyüksel H. VIP receptors as molecular targets of breast cancer: implications for targeted imaging and drug delivery. *J Control Release* 2001; 74: 129-134.

32. Moody TW, Leyton J, Chan D, Brennehan DC, Fridkin M, Gelber E, Levy A, Gozes I. VIP receptor antagonists and chemotherapeutic drugs inhibit the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 68: 55-64.
33. Thakur ML, Aruva MR, Garipey J, Acton P, Rattan S, Prasad S, Wickstrom E, Alavi A. PET imaging of oncogene overexpression using ⁶⁴Cu-vasoactive intestinal peptide (VIP) analog: comparison with ^{99m}Tc-VIP analog. *J Nucl Med* 2004; 45: 1381-1389.
34. Valdehita A, Carmena MJ, Collado B, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells. *Regul Pept* 2007; 144: 101-108.
35. Yong-Jun Liu, Yan-Fang Guo, Li-Shu Zhang, Yu-Fang Pei, Na Yu, Ping Yu, Christopher J Papasian, Hong-Wen Deng. Biological Pathway-Based Genome-Wide Association Analysis Identified the Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Pathway Important for Obesity, *Obesity* 2010; 18: 2339–2346.
36. Baranowska B. A marked decrease of vasoactive intestinal peptide release in obese patients. *Metabolism*. 1991; 40: 344-346.
37. Lijnen HR, Freson K, Hoylaerts MF. Effect of VPAC₁ Blockade on Adipose Tissue Formation and Composition in Mouse Models of Nutritionally Induced Obesity. *J Obes*. 2010; 2010: 5.
38. Pavković M, Nićiforović S. Analiza broja CAG ponovaka u genu za androgeni receptor kod muškaraca sa karcinomom prostate, *Medicinski podmladak* 2011; 62: 19-23.
39. Collado B, Carmena MJ, Sánchez-Chapado M, Ruíz-Villaespesa A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Varga JL, Schally AV, Prieto JC. Expression of vasoactive intestinal peptide and functional VIP receptors in human prostate cancer: antagonistic action of a growth-hormone-releasing hormone analog. *Int J Oncol* 2005; 26: 1629-1635.
40. Khor LY, Bae K, Pollack A, Hammond ME, Grignon DJ, Venkatesan VM, Rosenthal SA, Ritter MA, Sandler HM, Hanks GE, Shipley WU, Dicker AP. COX-2 expression predicts prostate-cancer outcome: analysis of data from the RTOG 92-02 trial. *Lancet Oncol* 2007; 8: 912-20.

41. Fernández-Martínez AB, Collado B, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide induces cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappaB in human prostate cell lines Differential time-dependent responses in cancer progression. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 270: 8-16.
42. Xie Y, Wolff DW, Lin MF, Tu Y. Vasoactive intestinal peptide transactivates the androgen receptor through a protein kinase A-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway in prostate cancer LNCaP cells. *Mol Pharmacol* 2007 ; 72: 73-85.
43. Collado B, Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regul Pept* 2004; 119: 69-75.
44. Collado B, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ, Hypoxia regulation of expression and angiogenic effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) and VIP receptors in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 249: 116-122.
45. Sastry KS, Smith AJ, Karpova Y, Datta SR, Kulik G. Diverse antiapoptotic signaling pathways activated by vasoactive intestinal polypeptide, epidermal growth factor, and phosphatidylinositol 3-kinase in prostate cancer cells converge on BAD. *J Biol Chem* 2006; 281: 20891-2901.
46. Paul S, Heinz-Erian P, Said SI. Autoantibody to vasoactive intestinal peptide in human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 30: 479.
47. Paul S, Said SI. Human autoantibody to vasoactive intestinal peptide: increased incidence in muscular exercise. *Life Sci* 1988; 43: 1079.
48. Mei S, Mody B, Eklund SH, Paul S. Vasoactive intestinal peptide hydrolysis by antibody light chains. *J Biol Chem* 1991; 266: 15571.
49. Neurath AR, Strick N, Tajlor P, Rubinstain P, Stevans CE. Search for epitope- specific antibody responses to the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development *AIDS Res. Hum Retrov* 1990; 6: 1183-1192.
50. Veljkovic V, Metlas R. Sequence similarity between HIV-1 env protein gp120 and human proteins: a new hypothesis on protective antibody production. *Immunol Let* 1990; 26: 193-196.

51. Veljkovic V, Metlas R, Jevtovic V, Stringer WW. The Role of Passive Immunization in HIV+ Patients: A Case Report. *Chest* 2001; 120:662.
52. Bradac J. A, Mathieson B. J. An epitope map of immunity to HIV-1: a roadmap for vaccine development. *Int Conf AIDS* 1991; 7: 174.
53. Geretti AM, Van Baalen CA, Borleffs JC, Van Els CA, Osterhaus AD. Kinetics and specificities of the T helper-cell response to gp120 in the asymptomatic stage of HIV-1 infection. *Scand J Immunol* 1994; 39: 355-362.
54. Mutch D, Underwood J, Geysen M, Rodda S. Comprehensive T-cell epitope mapping of HIV-1env antigens reveals many areas recognized by HIV-1 seropositive and by low-risk HIV-1-seronegative individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 879-890.
55. Sitz KV, Ratto-Kim S, Hodgkins AS, Robb ML, Birx DL. Proliferative responses to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 peptides in HIV-1-infected individuals immunized with HIV-1 rgp120 or rgp160 compared with nonimmunized and uninfected controls. *J Infect Dis* 1999; 179: 817-824.
56. Sastry K. J, Arlinghaus R. B. Identification of T-cell epitopes without B-cell activity in the first and second conserved regions of the HIV env protein. *AIDS* 1991; 5: 699-707.
57. Veljkovic N. Molecular mimicry of HIV gp120: Possible implications on prevention and therapy of AIDS. *Archive of Oncology* 13; 34: 126-130.
58. Woie L, Kaada B, Opstad PK. Increase in plasma vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in muscular exercise in humans. *Gen Pharmacol* 1986; 17: 321.
59. Hilsted J, Galbo H, Sonne B, Schwartz T, Fahtenkrug J, de Muckadell OB, Lauritsen KB, Tronier B. Gastroenteropancreatic hormonal changes during exercise. *Am J Physiol* 1980; 239.
60. Wiik P, Opstad PK, Knardahl S, Boyum A. Receptor for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leucocytes are upregulated during prolonged strain and energy deficiency. *Peptides* 1988; 9: 181.
61. Paul S, Volle DJ, Beach CM, Johnson DR, Powell MJ, Massey RJ. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* 1989; 244.

62. Veliković V, Metlas R, Vojvodic D, Cavor L, Pejinović N, Dujuć A, Zakhariev S, Guarnaccia C, Pongor S. Natural autoantibodies cross-react with a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1019-1024.
63. Schief WR, Ban YE, Stamatatos L. Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4: 431.
64. Diskin R, Scheid JF, Marcovecchio PM, West AP Jr, Klein F, Gao H, Gnanapragasam PN, Abadir A, Seaman MS, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science* 2011; 334: 1289-1293.
65. Falkowska E, Ramos A, Feng Y, Zhou T, Moquin S, Walker LM, Wu X, Seaman MS, Wrin T, Kwong PD, Wyatt RT, Mascola JR, Pognard P, Burton DR. PGV04, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4. *J Virol* 2012; 86: 4394-4403.
66. Wu X, Wang C, O'Dell S, Li Y, Keele BF, Yang Z, Imamichi H, Doria-Rose N, Hoxie JA, Connors M, Shaw GM, Wyatt RT, Mascola JR. Selection pressure on HIV-1 envelope by broadly neutralizing antibodies to the conserved CD4-binding site. *J Virol* 2012; 86: 5844-5856.
67. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* August 2007; 2: 693-699.
68. Wisloff U, Ellingsen O, Kemi O, J. High-Intensity Interval Training to Maximize Cardiac Benefits of Exercise Training? *Exercise & Sport Sciences Reviews* 2009; 37: 139-146.
69. Leuenberger A. Endorphins, Exercise, and Addictions: A Review of Exercise Dependence. *The Premier Journal for Undergraduate Publications in the Neurosciences* 2006; 1: 9.
70. Bouchard C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Perusse L, Leon AS, Rao DC. Familial aggregation of VO₂(max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *Journal of Applied Physiology* 1999; 87: 1003–1008.
71. Roxon N.H. Get up & grow: healthy eating and physical activity for early Childhood, Australian Government Department of Health and Aging 2009.

72. Stringer WW, Berezovskaya M, O'Brien WA, Beck K, Casaburi R. The effect of exercise training on aerobic fitness, immune indices, and quality of life in HIV+ patients. *Med Sci Sports Exerc*; 1998; 11–16.
73. Terry L, Sprinz E, Ribeiro JP. Moderate and High Intensity Exercise Training in HIV- 1 Seropositive Individuals: a Randomized Trial. *Int J Sports Med* 1999; 20: 142–146.
74. Yahiaoui A, McGough EL, Voss JG. Development of evidence-based exercise recommendations for older HIV-infected patients. *J Assoc Nurses AIDS Care* 2012; 23: 204-219.
75. Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ et al. Physical activity and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 2007; 16: 36-42.
76. Hirose K, Hamajima N, Takezaki T, Miura S, Tajima K. Physical exercise reduces risk of breast cancer in Japanese women. *Cancer Sci* 2003; 94: 193-199.
77. Frisch RE, Wyshak G, Witschi J, Albright NL, Albright TE, Schiff I. Lower lifetime Occurrence of breast cancer and cancers of the reproductive system among former College athletes. *Int J Fertil* 1987; 32: 217-225.
78. Frisch RE, Wyshak G, Albright NL, Albright TE, Schiff I, Witschi J. Former athletes have a lower lifetime occurrence of breast cancer and cancers of the reproductive system. *Adv Exp Med Biol* 1992; 322: 29-39.
79. Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2011; 186: 13-42.
80. Irwin ML, George SM, Matthews CE. Physical Activity and Breast Cancer: Prevention, Survival, and Mechanisms. *Research Digest* 2010; 3: 1-9.
81. Liu Y, Hu F, Li D, Wang F, Zhu L, Chen W, Ge J, An R, Zhao Y. Does physical activity reduce the risk of prostate cancer? A systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2011; 60: 1029-1044.
82. Richman EL, Kenfield SA, Stampfer MJ, Paciorek A, Carroll PR, Chan JM. Physical activity after diagnosis and risk of prostate cancer progression: data from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor. *Cancer Res* 2011; 71: 3889-3895.
83. Leitzmann MF. Physical Activity and Genitourinary Cancer Prevention. *Recent Results in Cancer Res* 2011; 186: 43-71.

84. Pokrajac M. Farmakokinetika: priručnik za praktičnu nastavu. Grafolik 2001.
85. Steinitz M, Baraz L. A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells. *Journal of Immunological Methods* 2000; 238: 143–150.
86. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Elsevier Saunders 2006.
87. Veljković V, Čosić I, Dimitrijević B, Lalović D. Is it possible to analyze DNA and protein sequence by the method of digital signal processing? *IEEE Trans* 1985; 32: 337-342.
88. Veljković V, Čosić I. A novel method of protein analysis for prediction of biological function. *Cancer Biochem Biophys* 1987; 9: 139-145.
89. Veljković V, Lalović D. The global average DNA base composition of coding regions may be determined by the electron-ion interaction potential. *Biosystems* 1990; 23: 311-319.
90. Cosic I. The resonant recognition model of macromolecular bioreactivity: theory & application. Birkhauser Verlag 1997.
91. Veljković V, Slavić I. Simple general-model pseudopotential. *Phys Rev Let* 1972; 29: 105-107
92. Veljković V. The dependence of the Fermi energy on the atomic number. *Phys Lett* 1973; 45: 41-42.
93. Veljković V. Theoretical approach to preselection of cancerogens and chemical carcinogenesis. Gordon & Breach 1980.
94. Lal R, John SA. Biological applications of atomic force microscopy. *Am J Physiol* 1994; 266: 21.
95. Santos S, Billingsley D, Thomson N. Atomic force microscopy imaging of macromolecular complexes. *Methods Mol Biol.* 2013; 950: 315.
96. Menoutis J. Physical Activity and Health. Nasm Pro 2008.
97. Djordjevic A, Veljkovic M, Antoni S, Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Zevgiti S, Dietrich U, Veljkovic N, Branch DR. The presence of antibodies recognizing a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 gp120 correlates with non-progressive HIV infection. *Curr HIV Res* 2007; 5: 443-448
98. Technical Guide for ELISA . Kirkegaard & Perry Laboratories Book Gaithersburg 2010.

99. Crowther RJ. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. 2001
100. Rajasekarijah RGH, Ryan JR, Hillier SR, et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *Journal of Immunological Methods* 2001; 252: 105-119.
101. Beckman KB, Harrison JG, Ingram DS, et al. Optimization of a polyclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of fungal biomass for use in studies of plant defence responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1994; 44: 19-32.
102. Kratz A, Ferraro M, Sluss P, Lewandrowski K. Normal Reference Laboratory Values. *N Engl J Med* 2004; 351: 1548-1563
103. Opstad PK. The plasma vasoactive intestinal peptide (VIP) response to exercise is increased after prolonged strain, sleep and energy deficiency and extinguished by glucose infusion. *Peptides* 1987; 8: 175-8.
104. Oktedalen O, Opstad PK, Schaffalitzky de Muckadell OB. The plasma concentrations of secretin and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) after long-term, strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1983; 52: 5-8.
105. Montagne MN, Dussailant M, Chew LJ, Berod A, Lamberts SJ, Carter DA, Rostene W. Estradiol induces vasoactive intestinal peptide and prolactin gene expression in the rat anterior pituitary independently of plasma prolactin levels. *J Neuroendocrinol* 1995; 7: 225-231.
106. Shen ZJ, Lu YL, Chen ZD, Chen F, Chen Z. Effects of androgen and ageing on gene expression of vasoactive intestinal polypeptide in rat corpus cavernosum. *BJU Int* 2000; 86: 1330-1337.
107. Anna Wiik, Estrogen receptors in skeletal muscle. Expression and activation. Thesis for doctoral degree. Karolinska Institutet Sweden 2008.
108. Kossman DA, Williams NI, Domchek SM, Kurzer MS, Stopfer JE, Schmitz KH. Exercise lowers estrogen and progesterone levels in premenopausal women at high risk of breast cancer. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1687-1693.
109. Timmons BW, Hamadeh MJ, Devries MC, et al. Influence of gender, menstrual phase, and oral contraceptive use on immunological changes in response to prolonged cycling. *J Appl Physiol* 2005; 99: 979-985.

110. Bouillon LE, Flynn MG, Lambert CP, et al. Exercise during late-follicular menstrual phase: influence on immune parameters. *J Sports Med Phys Fitness* 2006; 46: 143-151.
111. Brown AS, Davis JM, Murphy EA, et al. Gender differences in viral infection after repeated exercise stress. *Med Sei Sports Exerc* 2004; 36: 1290-1295.
112. De la Fuente M, Martin MI, Ortega E. Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 189-198.
113. Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, et al. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2325-2332.
114. Navalta JW, Sedlock DA, Park KS, et al. Neither gender nor menstrual cycle phase influences exercise-induced lymphocyte apoptosis in untrained subjects. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 481-486.
115. Galbo H, Hilsted J, Fahrenkrug J, Schaffalitzky De Muckadell OB. Fasting and prolonged exercise increase vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma. *Acta Physiol Scand* 1979; 105: 374-377.
116. Veljkovic N., Metlas R., Prljic J., Manfredi R., Branch D., Stringer W. Veljkovic V. Antibodies reactive with C-terminus of the second conserved region of HIV-1gp120 as possible prognostic marker and therapeutic agent for HIV disease. *J Clin Virol* 2004; 11: 39.
117. Metlaš R. Veljković V., Does HIV-1 gp120 manipulate human immune network. *Vaccin* 1995; 13: 355.
118. Veljković V, Metlaš R., Kohler H, Urnovitz HB, Prljic J, Veljković N, Johnson E, Muller S. AIDS epidemic at the beginning of the third millennium: time for a new AIDS vaccine strategy. *Vaccine* 2001; 19: 1855.
119. Scharf L, West AP Jr, Gao H, Lee T, Scheid JF, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ, Diskin R. Structural basis for HIV-1 gp120 recognition by a germ-line version of a broadly neutralizing antibody *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 6049.
120. McGuire AT, Hoot S, Dreyer AM, Lippy A, Stuart A, Cohen KW, Jardine J, Menis S, Scheid JF, West AP, Schief WR, Stamatatos L. Engineering HIV envelope protein to activate germline B cell receptors of broadly neutralizing anti-CD4 binding site antibodies. *J Exp Med* 2013 ; 210: 655.

121. Friedenreich CM, Bryant HE, Courneya KS. Case-control study of lifetime physical activity and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 336-347.
122. Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, et al. Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* 2007; 18: 137-157.
123. McCullough LE, Eng SM, Bradshaw PT, Cleveland RJ, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. Fat or fit: the joint effects of physical activity, weight gain, and body size on breast cancer risk. *Cancer* 2012; 118: 4860-4868.
124. Holmes MD, Chen WY, Feskanich D, Kroenke CH, Colditz GA. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. *JAMA* 2005; 293: 2479-2486.
125. Thakur ML, Devadhas D, Zhang K, Pestell R, Wang C, McCue P, Wickstrom E. Imaging Spontaneous MMTVneu Transgenic Murine Mammary Tumors: Targeting Metabolic Activity Versus Genetic Products. *J Nucl Med* 2010; 51: 106–111.
126. Dagar A, Kuzmis A, Rubinstein I, Sekosan M, Onyuksel H. VIP-targeted Cytotoxic Nanomedicine for Breast Cancer. *Drug Deliv Transl Res* 2012; 2: 454.
127. Robsahm TE, Hestvik UE, Veierød MB, Fagerlie A, Nystad W, Engebretsen L, Tretli S. Cancer risk in Norwegian world class athletes. *Cancer Causes and Control* 2010; 21: 1711-1719.
128. Renehan AG, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569-578.
129. Irwin ML, Alvarez-Reeves M, Cadmus L, et al. Randomized controlled trial of exercise on body fat, lean mass, and bone mineral density in breast cancer survivors. *Obesity* 2009; 17: 1534-1541.
130. Daling JR, Malone KE, Doody DR, et al. Relation of body mass index to tumor markers and survival among young women with invasive ductal breast carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 720-729.
131. Torti DC, Matheson GO. Exercise and prostate cancer. *Sports Med.* 2004; 34: 363-369.

132. Singh AA, Jones LW, Antonelli JA, Gerber L, Calloway EE, Shuler KH, Freedland SJ, Grant DJ, Hoyo C, Bañez LL. Association between exercise and primary incidence of prostate cancer: Does race matter? *Cancer* 2013; 119: 1338-1343.
133. Friedenreich CM, McGregor SE, Courneya KS, Angyalfi SJ, Elliott FG. Case-control study of lifetime total physical activity and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 740-749.
134. Kenfield SA, Stampfer MJ, Giovannucci E, Chan JM. Physical activity and survival after prostate cancer diagnosis in the health professionals follow-up study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 726-732.
135. Juarranz MG, De Neef P, Robberecht P. Vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(1) subtype is predominant in rat prostate membranes. *Prostate* 1999; 41: 1-6.
136. Gutiérrez-Cañas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate* 2005; 63: 44-55.
137. Collado B, Sánchez MG, Díaz-Laviada I, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces c-fos expression in LNCaP prostate cancer cells through a mechanism that involves Ca²⁺ signalling. Implications in angiogenesis and neuroendocrine differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1744: 224-233.
138. Fernández-Martínez AB, Carmena MJ, Arenas MI, Bajo AM, Prieto JC, Sánchez-Chapado M. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptors and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer. Analysis of potential prognostic relevance. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1093-10101.
139. Collado B, Carmena MJ, Clemente C, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. *Peptides* 2007; 28: 1896-1901.
140. Rebillard A, Lefeuvre-Orfila L, Gueritat J, Cillard J. Prostate cancer and physical activity: Adaptive response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2013; 60: 115.

141. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maron P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett* 2009; 282: 125,
142. Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Groot K, Czompoly T. Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers. *Endocrinology* 2000; 141: 2120-2128.
143. Zhang K, Aruva MR, Shanthly N, Cardi CA, Rattan S, Patel C, Kim C, McCue PA, Wickstrom E, Thakur ML. PET imaging of VPAC1 expression in experimental and spontaneous prostate cancer. *J Nucl Med* 2008; 49: 112-121.
144. Cadogan M, Dalglish AG. HIV induced AIDS and related cancers: chronic immune activation and future therapeutic strategies. *Adv Cancer Res* 2008; 101: 349-395.
145. Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, Grigg R, Hylton T, Pawlish KS, McNeel TS, Goedert JJ. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer* 2008; 123: 187-194.
146. Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, Novak RM, Moorman AC, Tong TC, Holmberg SD, Brooks JT; Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project and HIV Outpatient Study Investigators. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with general population in the United States 1992-2003. *Ann Intern Med* 2008; 148: 728-736.
147. Herida M, Mary-Krause M, Kaphan R, Cadranel J, Poizot-Martin I, Rabaud C, Plaisance N, Tissot-Dupont H, Boue F, Lang JM, Costagliola D. Incidence of non- AIDS-defining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3447-3453.
148. Gallagher B, Wang Z, Schymura MJ, Kahn A, Fordyce EJ. Cancer incidence in New York State acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 544-556.
149. Pantanowitz L, Dezube B. Breast Cancer in Women With HIV/AIDS *JAMA* 2001; 285: 3090-3099.

150. Pantanowitz L, Dezube B. Reasons for a deficit of breast cancer among HIV-infected patients. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22: 1347.
151. Shiels MS, Goedert JJ, Moore RD, Platz EA, Engels EA. Reduced risk of prostate cancer in U.S. Men with AIDS. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2910-2915.
152. Ibrahim E, Al-Homaidh A. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis: meta-analysis of published studies. *Med Oncol* 2011; 28: 753-765.
153. Couvineau A, Laburthe M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 42.

Biografija

Milena Veljković je rođena 1979. godine u Beogradu. Diplomirala je 2005. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer medicinska biohemija sa prosečnom ocenom 8.53. Obavezan staž za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare obavila je u Bolnici za prevenciju i lečenje cerebrovaskularnih bolesti "Sveti Sava" u Beogradu. Stručni ispit je položila novembra 2006. godine.

Školske 2005/06. upisala je doktorske akademske studije iz medicinske biohemije. Po završenim osnovnim studijama, pa do zaposlenja bila je istraživač-stipendista Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije, na projektu „Razvoj i primena novih radiofarmaceutika za dijagnostičku primenu u nuklearnoj medicini: ^{99m}Tc -Ciprofloksacin (za vizualizaciju disfunkcije mozga)“ u Laboratoriji za radijacionu hemiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Tokom kraćeg studijskog boravka u virusološkoj laboratoriji u Institutu za biomedicinska istraživanja, Georg-Spayer-Haus u Frankfurtu, Nemačka radila je na dizajniranju novog ELISA testa za detekciju prirodnih anti-VIP autoantitela.

U julu 2007. godine stupa u stalni radni odnos u biohemijskoj laboratoriji u Bolnici za prevenciju i lečenje cerebrovaskularnih bolesti „Sveti Sava“. U novembru 2009. godine upisala je specijalističke studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Do sada je publikovala četiri naučna rada i ima dva saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Milena Veljković _____

број уписа _____ 70/06 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Nivo anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista, pacijenata sa malignim bolestima i pacijenata sa HIV infekcijom

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

Потпис докторанда

У Београду, 3. 09. 2013.

Milena Veljković

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Milena Veljković

Број уписа 70/06

Студијски програм doktorske akademske studije iz medicinske biohemije

Наслов рада Nivo anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista, pacijenata sa malignim bolestima i pacijenata sa HIV infekcijom

Ментор dr Violeta Dopsaj, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Потписани Milena Veljković

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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.

Потпис докторанда

У Београду, 3.09.2013

Milena Veljković

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Nivo anti-VIP/gp120 antitela kod aktivnih sportista, pacijenata sa malignim bolestima i pacijenata sa HIV infekcijom.

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 3.09.2013.

Milena Vezovic

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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 умножавања, 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 прераде. Дозвољавање умножавања, 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 умножавања, 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 прераде. Дозвољавање умножавања, 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 умножавања, 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.