

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Софија М. Јовановић Стојанов

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИЈЕ
NMGB1 ПРОТЕИНА У ЈЕТРИ ПАЦОВА ТОКОМ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗАЗВАНОГ ДИЈАБЕТЕСА
ТИПА 1**

Докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sofija M. Jovanović Stojanov

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION OF HMGB1 PROTEIN IN
RAT LIVER DURING EXPERIMENTALLY-INDUCED
DIABETES TYPE 1**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

МЕНТОРИ

др Весна Мартиновић, виши научни сарадник
Одељење за молекуларну биологију
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Универзитет у Београду

др Гордана Матић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

КОМИСИЈА

др Весна Мартиновић, виши научни сарадник
Одељење за молекуларну биологију
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Универзитет у Београду

др Гордана Матић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Илијана Григоров, научни саветник
Одељење за молекуларну биологију
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Универзитет у Београду

Датум одбране: _____

Ова докторска дисертација је урађена у Одељењу за молекуларну биологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Сигнални молекули у дијабетесу: идентификација потенцијалних биолошких маркера укључених у модификацију и интеграцију сигналних путева у циљу предикције и интервенције у дијабетесу“; потпројекат „Експресија и сигналне улоге протеина HMGB1 у дијабетичној јетри”. (ОН173020, Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије).

This doctoral dissertation was performed in the Department of Molecular Biology of the Institute for Biological Research "Siniša Stankovic", University of Belgrade, within the project entitled: "Signaling molecules in diabetes: search for potential targets in intrinsic pathways for prediction and intervention in diabetes"; subproject: "HMGB1 expression and signaling in diabetic liver". (No. 173020, Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia).

Захваљујем др Весни Мартиновић, мојој менторки, која ми је несебично помагала током експерименталног рада и при интерпретацији добијених резултата. Хвала на поверењу, подршци и уложеној енергији.

Хвала проф. др Гордани Матић на посвећеном времену, великодушности, драгоценим саветима и подршци.

Велику захвалност дугујем др Илијани Григоров, која ми је била ослонац од самог почетка израде ове докторске тезе и омогућила да напредујем у својим научним подухватима, пружајући конструктивне критике и савете. Хвала на искреној подршци и дарованом знању.

Захваљујем др Светлани Ивановић-Матић и др Десанки Богојевић на лепој сарадњи и добронамерним саветима.

Татјани Живић дугујем захвалност на техничкој подршци и помоћи током експерименталног рада и ведром духу.

Ањи хвала на дивном пријатељству, неизмерној подршци и свим драгим успоменама још од факултетских дана.

Љупки, Сањи, Јели, Соњи, Бокију, Марку и Микију захваљујем на дивном пријатељству које се учвршћивало и сазревало заједно са нама. Хвала вам на поверењу, подршци, искреном радовању и смеху. Права је срећа радити са новим пријатељима који ће постати стари.

Др Горану Познановићу, др Мирјани Михаиловић, др Невени Грдовић, др Мелити Видаковић, др Јелени Арамбашић Јовановић, др Светлани Динић, др Александри Ускоковић захваљујем на корисним саветима и подршци, почев од првих дана мог рада у лабораторији.

Захваљујем Ањи, Јовани, Мари и Милошу на ведрини која влада у нашој лабораторији и осећају да смо ту једни за друге.

Мојим најдражим на љубави, вери и безрезервној подршци.

Карактеризација структуре и функције HMGB1 протеина у јетри пацова током експериментално изазваног дијабетеса типа 1

Сажетак

Оксидативни стрес и хронична инфламација сматрају се главним узроцима појаве дијабетичних компликација, међу којима су и оштећења јетре. Важну улогу медијатора ових процеса може имати ендогени протеин HMGB1, који у ванћелијску средину доспева из некротичних, оштећених и активираних ћелија. Како је у дијабетесу понашање HMGB1 протеина слабо изучавано, у овој докторској дисертацији испитиван је допринос HMGB1 оштећењима јетре пацова са стрептозотоцином-изазваним ДТ1. Показано је да ниво оштећења јетре током дијабетеса корелише са присуством ванћелијског HMGB1. Овај протеин, у дијабетичној јетри, бива структурно модификован ацетилацијом, фосфорилацијом и O-GlcNAc гликозилацијом што корелише са његовим изласком из једра ћелија у цитоплазму и повећањем његовог присуства у јетри и серуму. Резултати у вези са снижавањем нивоа ванћелијског HMGB1 третманом дијабетичних пацова мелатонином или етил пируватом, указују да HMGB1 доприноси оштећењу јетре у дијабетесу одржавањем стања хроничне инфламације, стишавањем антиоксидативне одбране и стишавањем регенерације. Ванћелијски HMGB1 кроз интеракције са TLR4 рецептором активира MAPK/NF-κB p65 и JAK1/STAT3 сигналне путеве, доприносећи повећању продукције проинфламацијских цитокина TNF-α и IL-6 и акутно-фазног протеина хаптоглобина. Подстицањем NF-κB p65 инфламацијског пута, HMGB1 делује негативно на цитопротективни одговор у дијабетичној јетри тако што онемогућава активност Nrf2 протеина, одговорног за стишавање инфламације и продукцију антиоксидативних ензима. На стишавање регенеративног потенцијала јетре, активирана HMGB1/TLR4 оса утиче преко увећања присуства негативних регулатора ћелијског циклуса - протеина p53 и p21, и смањењем нивоа

циклина D1. Добијени резултати указују на сложеност деловања HMGB1 протеина у дијабетесу и на значај спречавања ослобађања HMGB1 или блокаде HMGB1/TLR4 осе у циљу одлагања настанка оштећења јетре.

Кључне речи: HMGB1 протеин, дијабетес, јетра, оксидативни стрес, структурне модификације, инфламација, регенерација.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Молекуларна биологија

Structural and functional characterization of HMGB1 protein in rat liver during experimentally-induced diabetes type 1

Abstract

Oxidative stress and chronic inflammation are considered to be the main causes of diabetic complications, one of which is liver damage. An important mediator of these processes may be the endogenous HMGB1 protein, when released into the extracellular environment from the necrotic, damaged or activated cells. As the HMGB1 role in diabetes was insufficiently studied, in this doctoral dissertation the contribution of HMGB1 to liver damage of streptozotocin-induced diabetic rats was investigated. It has been shown that the level of liver damage in diabetes correlates with the presence of extracellular HMGB1. In diabetic liver, this protein is structurally modified by acetylation, phosphorylation, and O-GlcNAc glycosylation, which correlates with its translocation from the nucleus to the cytoplasm and an increase in its presence in the liver and serum. Reduction of the level of extracellular HMGB1 by melatonin or ethyl pyruvate treatment of diabetic rats, shows that HMGB1 contributes to diabetic liver damage by maintaining a chronic inflammation, by lowering antioxidant defense and by reducing regeneration. Extracellular HMGB1 activates MAPK/NF- κ B p65 and JAK1/STAT3 signaling pathways through interactions with the TLR4 receptor, thus contributing increased production of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 and the acute-phase protein, haptoglobin. By stimulating the NF- κ B p65 inflammatory pathway, HMGB1 acts negatively on the cytoprotective response of the diabetic liver, by disabling Nrf2 protein activity, which is responsible for reduction of inflammation and antioxidant enzymes production. Activated HMGB1/TLR4 axis reduces regenerative potential of the liver by increasing the presence of negative cell cycle regulators - proteins p53 and p21, and also by decreasing the level of cyclin D1. The obtained results indicate the complexity of HMGB1 protein action in diabetes and

underlines the importance of preventing the release of HMGB1 or blockage of HMGB1/TLR4 axis in order to delay the occurrence of liver damage.

Key words: HMGB1 protein, diabetes, liver, oxidative stress, structural modifications, inflammation, regeneration.

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular biology

Скраћенице

ADP	аденозин дифосфат (енг. adenosine diphosphate)
ALP	алкална фосфатаза (енг. alkaline phosphatase)
ALT	аланин аминотрансфераза
AST	аспартат аминотрансфераза
АТР	аденозин трифосфат (енг. adenosine triphosphate)
Bax	(енг. Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	(енг. B-cell leukemia/lymphoma 2)
Ca ²⁺	јони калцијума
CAT	каталаза (енг. catalase)
Cdk5	циклин зависна киназа 5 (енг. cyclin-dependent kinase 5)
CRM1	(енг. chromosome region maintenance 1)
CRM1	chromosomal maintenance 1
DAMP	молекулски обрасци оштећења (енг. damage-associated molecular patterns)
EP	етил пируват (енг. ethyl pyruvate)
ERK	(енг. extracellular signal-regulated kinase)
GGT	γ-глутамил транспептидазе (енг. γ-glutamyltranspeptidase)
GlcNAC	N-ацетил глюкозамин (енг. N-acetyl glucosamine)
GR	глутатион редуктаза (енг. glutathione reductase)
GSH	глутатион у редукованом облику 1β хидроксистероид дехидогеназа типа 1
GSH-Px	глутатион пероксидаза (енг. glutathione peroxidase)
GSSG	глутатион у дисулфид-оксидованом облику
GST	глутатион S-трансфераза (енг. glutathione S-transferase)
HAT	хистон ацетилтрансфераза (енг. histone acetyltransferase)

H ₂ O ₂	водоник пероксид
HDAC	хистон деацетилаза (енг. histone deacetylase)
HE	хематоксилин-еозин
HMGB1	(енг. high-mobility groupbox 1)
HO-1	хем оксигеназа 1 (енг. heme oxygenase)
Hр	хаптоглобин (енг. haptoglobin)
HSP	протеин топлотног шока (енг. heat shock protein)
IFN	интерферон (енг. interferon)
IL	интерлеукин (енг. interleukin)
IRAK	(енг. IL-1R-associated kinases)
IRF	(енг. interferon-regulatory factorfamily)
JNK	(енг. c-Jun N-terminal kinase)
JNK	(енг. c-Jun N-terminal kinases)
LPC	лизофосфатидилхолина (енг. lysophosphatidylcholine)
LPS	липополисахарид (енг. lipopolysaccharide)
LRR	(енг. leucine-rich repeat domains)
MAPK	(енг. mitogen activated protein kinases)
MD2	(енг. myeloid differentiation protein)
MDA	малондиалдехид (енг. malondialdehyde)
MyD88	(енг. adaptor molecule myeloid differentiation primary-response protein 88)
NAD ⁺ /H	оксидовани/редуковани никотинамид аденин динуклеотид (енг. nicotinamide adenine dinucleotide)
NADP ⁺ /H	оксидовано/редуковани никотинамид динуклеотид фосфат (енг. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NAFLD	неалкохолна масна јетра (енг. nonalcoholic fatty liver disease)
NBT	нитро плаво тетразолијума
NES	(енг. nuclear export signals)

NLS	(енг. nuclear localization signals)
Nrf2	(енг. nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2)
$^1\text{O}_2$	синглет кисеоника
O_2^-	супероксид анион радикал
OH^\cdot	хидроксил радикал
p-	фосфо група
PAMP	(енг. pathogen associated molecular patterns)
PARP1	(енг. poly-ADP-ribose polymerase)
PI3K	(енг. phosphatidylinositol-3-kinases)
PKC	протеин киназа C (енг. Protein kinase C)
PVDF	(енг. polyvinylidene difluoride)
RAGE	(енг. receptor for advanced glycation end products)
ROS	реактивне врсте кисеоника (енг. reactive oxygen species)
SOD	супероксид дисмутаза (енг. superoxide dismutase)
STAT	(енг. signal transducer and activator of transcription)
STZ	стрептозотоцин (енг. streptozotocin)
TAK1	(енг. transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase)
TBA	тиобарбитурна киселина (енг. thiobarbituric acid)
TBARS	реактивне супстанце тиобарбитурне киселине (енг. thiobarbituric acid reactive substances)
TIR	(енг. Toll/IL-1 receptor)
TLR	(енг. toll like receptors)
TMB	тетраметилбензидин
TNF- α	фактор некрозе тумора α (енг. tumor necrosis factor α)
TRAF6	(енг. tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6)
TRAIL	(енг. TNF related apoptosis inducing ligand)

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Протеин HMGB1	1
1.1.1. Структура протеина HMGB1.....	4
1.2. Посттранслационе модификације протеина HMGB1	5
1.2.1. Ацетилација протеина HMGB1.....	5
1.2.2. ADP-рибозилација протеина HMGB1.....	5
1.2.3. Метилација протеина HMGB1.....	6
1.2.4. Фосфорилација протеина HMGB1.....	6
1.2.5. Гликозилација протеина HMGB1.....	7
1.2.6. Оксидација протеина HMGB1.....	7
1.3. Ванћелијско ослобађање протеина HMGB1	9
1.3.1. Активно ослобађање протеина HMGB1.....	9
1.3.1.1. Контролисана секреција протеина HMGB1.....	10
1.3.1.2. Излазак HMGB1 из једра подстакнут реактивним врстама кисеоника.....	11
1.3.1.3. Излазак HMGB1 из једра посредован јонима калцијума.....	12
1.3.1.4. Улога сигналног пута азот монооксида.....	12
1.3.1.5. Инфламазом зависни механизам.....	13
1.3.2. Пасивно ослобађање протеина HMGB1.....	13
1.4. HMGB1 рецептори	14
1.4.1. TLR рецептори.....	14
1.4.2. RAGE рецептор.....	17
1.4.3. Улоге ванћелијског HMGB1.....	18
1.4.3.1. HMGB1 и инфламацијски одговор.....	18
1.4.3.2. HMGB1 и ћелијска миграција.....	19
1.4.3.3. HMGB1 у регенерацији ткива.....	20
1.5. Протеин HMGB1 и ћелијска смрт	20

1.5.1. Протеин HMGB1 у некрози.....	21
1.5.2. Протеин HMGB1 у апоптози.....	21
1.5.3. Протеин HMGB1 у аутофагији.....	22
1.6. HMGB1 у инфламацијским и аутоимунским болестима.....	23
1.6.1. Улога протеина HMGB1 током сепсе.....	23
1.6.2. Улога протеина HMGB1 у оштећењима изазваним исхемијом.....	24
1.6.3. Улога протеина HMGB1 у болестима јетре.....	25
1.6.3.1. Неалкохолна масна јетра.....	25
1.6.3.2. Фиброза јетре.....	25
1.6.4. Улога протеина HMGB1 у настанку дијабетеса.....	26
1.7. Дијабетес.....	26
1.7.1. Оксидативни стрес као последица хипергликемије.....	27
1.7.1.1. Антиоксидативни ензими.....	30
1.7.1.2. Хаптоглобин као антиоксиданс.....	32
1.8. Значај јетре у одржавању глукозне хомеостазе.....	32
1.9. Узроци оштећења јетре у дијабетесу.....	34
1.9.1. Оксидативни стрес као узрок оштећења јетре.....	34
1.9.1.1. Оксидација протеина.....	35
1.9.1.2. Оксидација масти.....	35
1.9.2. Инфламација као узрок оштећења јетре.....	37
2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	39
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	41
3.1. Коришћене хемијске супстанце.....	41
3.1.1. Стептозотоцин.....	41
3.1.2. Мелатонин.....	42
3.1.3. Етил пируват.....	42
3.2. Експерименталне животиње, експерименталне групе и протокол.....	43
3.2.1. Експерименталне животиње.....	43
3.2.2. Експерименталне групе.....	43
3.2.3. Протокол.....	44

3.3. Методе	45
3.3.1. Одређивање концентрације инсулина у серуму	45
3.3.2. Одређивање концентрације ALT и AST	46
3.3.3. Одређивање концентрације IL-6 и TNF- α у серуму	46
3.3.4. Одређивање концентрације супероксид анјона, водоник пероксида и малондиалдехида	47
3.3.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјона	47
3.3.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида	48
3.3.4.3. Одређивање концентрације малондиалдехида (MDA).....	48
3.3.5. Одређивање ДНК оштећења у јетри пацова методом комет есеја (енг. SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis).....	49
3.3.6. Мерење активности ензима антиоксидативне заштите у јетри	50
3.3.6.1. Одређивање активности каталазе (CAT)	51
3.3.6.2. Одређивање активности супероксид дисмутазе	51
3.3.6.3. Одређивање активности глутатион-S-трансферазе	52
3.3.7. Припрема укупног хомогената јетре.....	53
3.3.8. Изолација субћелијских протеинских фракција	53
3.3.9. Изолација солубилне једарне протеинске фракције	54
3.3.10. Одређивање концентрације протеина	55
3.3.11. Електрофоретске технике за раздвајање протеина	56
3.3.11.1. Електрофоретско раздвајање протеина под денатуришућим условима – Глицинска SDS-PAGE.....	56
3.3.11.2. Дводимензионална електрофореза протеина на полиакриламидном гелу	57
3.3.11.3. Бојење протеина на полиакриламидном гелу сребром	58
3.3.12. Пренос протеина на мембрану.....	58
3.3.13. Имуноблот анализа протеина	59
3.3.14. Реакција ко-имунопреципитације.....	61
3.3.15. Изолација гликопротеина.....	62
3.3.16. Изолација фосфопротеина.....	63

3.3.17. Припрема ткива за хистолошку анализу.....	64
3.3.17.1. Хематоксилин-еозин бојење хистолошких препарата	65
3.3.17.2. Имунохистохемијско обележавање ткивних препарата.....	65
3.3.18. Статистичка обрада података	66
4. РЕЗУЛТАТИ	67
4.1. Дијабетични, оксидативни и инфламацијски статус пацова	
у периоду са ДТ1.....	67
4.1.1. Телесна маса	67
4.1.2. Биохемијски статус	68
4.1.3. Оксидативни статус	69
4.1.4. Инфламацијски статус	71
4.2. Структурне и функционалне промене у јетри пацова са ДТ1	72
4.2.1. Концентрације аминотрансфераза.....	72
4.2.2. Хистопатолошка анализа ткива јетре дијабетичних пацова.....	73
4.2.3. Оксидативни статус јетре.....	75
4.2.4. ДНК оштећења у ћелијама јетре	77
4.2.5. Инфламацијски статус јетре.....	79
4.2.6. Присуство НМGB1 протеина у серуму и јетри пацова са ДТ1	80
4.3. Унутарћелијска локализација и структурне модификације НМGB1	
протеина у јетри пацова са ДТ1	82
4.3.1. Унутарћелијска локализација НМGB1 протеина	
у јетри пацова са ДТ1	82
4.3.2. Структурне модификације протеина НМGB1 у јетри пацова са ДТ1	85
4.3.2.1. Анализа присуства НМGB1 изоформи у цитоплазми и једру ћелија	
јетри пацова са ДТ1	85
4.3.2.2. Ацетилисаност протеина НМGB1 у јетри пацова са ДТ1	87
4.3.2.3. Фосфорилисаност протеина НМGB1 у јетри пацова са ДТ1	88
4.3.2.4. Гликозилованост протеина НМGB1 у јетри пацова са ДТ1	89

4.4. Функције HMGB1 протеина у ДТ1	91
4.4.1. Унутарћелијска локализација HMGB1 у јетри пацова третираних мелатонином или етил пируватом	91
4.4.2. Протективни ефекти мелатонина и етил пирувата на јетру дијабетичних пацова	94
4.4.2.1. Хистолошка анализа ткива јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом	94
4.4.2.2. Оксидативни статус јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом	98
4.4.2.3. Инфламацијски статус јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом	103
4.4.3. Улога HMGB1 у инфламацији јетре пацова са ДТ1	104
4.4.3.1. Интеракције HMGB1 протеина са TLR4 рецептором	104
4.4.3.2. HMGB1-TLR4 посредована активација MAP киназа у јетри дијабетичних пацова	105
4.4.3.3. HMGB1-TLR4 посредована активација једарног NF- κ B p65 у јетри дијабетичних пацова	108
4.4.3.4. HMGB1-TLR4 посредована активација JAK1/STAT3 сигналног пута у јетри пацова са дијабетесом	109
4.4.3.5. HMGB1-TLR4 интеракције, Nrf2 сигнализација и експримираност HO-1 у јетри дијабетичних пацова	111
4.4.4. Утицај HMGB1 на регенеративни капацитет јетре пацова са ДТ1	113
4.4.4.1. Ефекат третмана мелатонином или етил пируватом на ниво p53, p21 и циклина D1 у јетри пацова са дијабетесом	114
5. ДИСКУСИЈА	118
6. ЗАКЉУЧЦИ	136
7. ЛИТЕРАТУРА	140

1. УВОД

За предикцију и превенцију појаве компликација у хроничним обољењима од интереса је идентификовати ендogene молекуле који својим деловањем, у већој или мањој мери, доприносе органским оштећењима и прогресији болести. Велики број студија указао је на важност улоге молекулских образаца оштећења (енг. damage-associated molecular pattern - DAMP) који иницирају и појачавају путеве урођеног имунског система и укључени су у патогенезу многих обољења. DAMP или алармини представљају ендogene молекуле, конститутивно експримиране и ослобађане у случају оштећења ткива. У одсуству повреде или инфекције, ови молекули обављају важне унутарћелијске улоге. Међутим, ослобођени DAMP молекули, услед оштећења и ћелијског стреса, подстичу активацију имунског система и обнављање ткива (Srikrishna и Freeze, 2009). Листа DAMP молекула се свакодневно продужава, ипак, један од најиспитиванијих је протеин HMGB1 (енг. high-mobility groupbox 1) (Yang и сар., 2015). У условима слабијих оштећења, овај протеин води активацији имунског одговора у циљу регенерације ткива. Међутим, у случају већих оштећења и хроничне инфламације може довести до прекомерног и штетног имунског одговора (Dong и сар., 2013).

1.1. Протеин HMGB1

Ернест Џоунс и сарадници су 1973. године изоловали нову групу протеина из хроматина тимуса говечета. Откривена група нехистонских једарних протеина, због своје велике електрофоретске покретљивости, названа је “протеинима високе мобилности” тј. HMG (Kang и сар., 2014a). Даља истраживања открила су да ову групу чини велики број протеина, данас разврстаних у три суперфамилије: HMGB, HMGN и HMGA. Свака протеинска суперфамилија одликује се специфичним, функционално различитим секвенцама и мотивима. HMG домен (енг. HMG-box)

представља функционални мотив HMGB фамилије, за HMGN фамилију специфичан је нуклеозом везујући, док је ДНК везујући мотив у виду АТ-петље одлика HMGA фамилије (Kang и сар., 2014а). HMG протеини, захваљујући својим функционалним мотивима, имају јединствену способност препознавања одређених ДНК структура и то на секвенцијоно-неспецифичан начин. Управо ова карактеристика омогућава им обављање улоге архитектуралних елемената хромозома, укључених у одржавање виталних процеса који се одигравају на молекулу ДНК (Goodwin и сар., 1973).

Првооткривени и најбоље проучени HMG протеин је HMGB1, познат још под називима HMG-1, амфотерин или р30. Са око 10^6 молекула по ћелији, ово је најприсутнији члан HMG фамилије нехистонских једарних протеина (Romani и сар., 1979). Еволутивно је изузетно конзервисан молекул, чији је сисарски хомолог пронађен и код, по пореклу, веома удаљених организама (Bustin, 2001; Giavara и сар., 2005; Wu и сар., 2003). Протеинске секвенце HMGB1 протеина миша и пацова показују 100%, а човека и глодара чак 99% међусобне хомологије (Ferrari и сар., 1994; Gariboldi и сар., 1995).

HMGB1 је првобитно окарактерисан као једарни, ДНК-везујући протеин (Baker и сар., 1976; Vaccari и сар., 1998). У ћелији остварује улогу ДНК шаперона, одржава структуру хромозома, али се понаша и као сензорни протеин, од кључног значаја за усклађивање ћелијског одговора на стрес. Иако се превасходно налази у једру, везан за хроматин, протеин HMGB1 може прелазити из једра у цитоплазму (Isackson и сар., 1980). Захваљујући овом својству пронађен је и унутар цитоплазме, у митохондријама (Stumbo и сар., 2008), лизозомима (Gardella и сар., 2002), ћелијској мембрани и ванћелијској средини (Kuehl и сар., 1985). Промене његове унутарћелијске локализације зависе од типа ћелије, ткива и стрес сигнала. Протеин HMGB1 је високо присутан у различитим ткивима, али је нарочито високо заступљен у слезини и тимусу (Prasad и Thakur, 1990). Ниво експресије овог протеина повећан је у канцеру, а смањује се са старењем (Müller и сар., 2004). Функције једарног HMGB1 су од пресудног значаја за преживљавање, будући да је експериментално показано да мишеви којима недостаје ген за HMGB1 умиру у прва 24 сата након рођења, услед смањене транскрипције гена за глукокортикоидни рецептор и немогућности

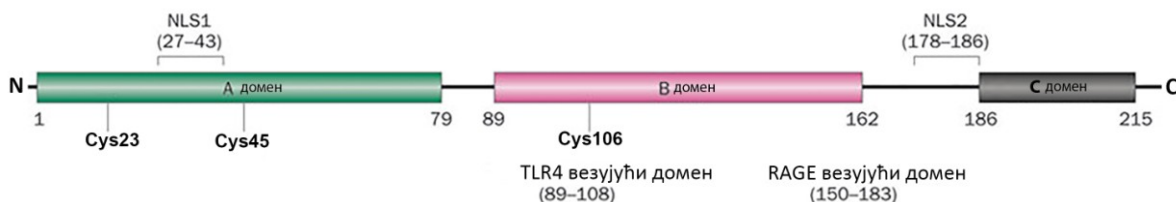
коришћења гликогена из јетре (Bianchi и сар., 1999). Недостатак овог протеина у панкреасу, јетри и макрофагима, доводи до повећане осетљивости експерименталних животиња на панкреатитис (Kang и сар., 2014b), исхемију јетре (Huang и сар., 2014b) и сепсу (Yanai и сар., 2013).

Једарни HMGB1 учествује у процесима репликације, репарације ДНК оштећења, рекомбинације и транскрипције ДНК, као и у одржавању геномске стабилности (Kang и сар., 2014a). Међутим, осим улоге коју остварује у једру, протеин HMGB1 испољава значајно дејство и у ванћелијској средини, где учествује у инфламацији, имунском одговору, ћелијском расту и пролиферацији, као и регулацији ћелијске смрти. HMGB1 у великој количини ослобађају мртве или умируће ћелије. Тако ослобођени HMGB1 делује као DAMP молекул који покреће урођени имунски одговор регрутујући имунске и глатке мишићне ћелије, мезангиобласте и стем ћелије. Ванћелијски HMGB1, као имуностимулатор, додатно покреће снажан имунски одговор на већ постојећу активацију или супресију Т лимфоцита, дендритских и ендотелијалних ћелија (Kang и сар., 2014a). Активиране имунске ћелије (нпр. макрофаги, моноцити, дендритске ћелије) и ендотелијалне ћелије такође излучују HMGB1, који, уз учешће одговарајућих рецептора, позитивном повратном спрегом изазива додатно ослобађање различитих цитокина и хемокина. Стога, HMGB1 може да одржава стање хроничне инфламације током трајања стреса (Kang и сар., 2014).

Осим једарне и ванћелијске активности, цитоплазматски HMGB1 може везивати многе протеине, међу њима оне укључене у процес аутофагије (Tang и сар., 2010), прогресије канцера, а могуће и неконвенционалне секреторне путеве (Lee и сар., 2010). Протеин HMGB1 ступа у интеракцију са многим, наизглед несродним, протеинима тако што препознаје кратке секвенце аминокиселина помоћу својих А и В домена (Dintilhac и Vernues, 2002). Захваљујући својим структурним и функционалним карактеристикама, протеин HMGB1, кроз остваривање широког спектра протеин-протеин интеракција, учествује у бројним ћелијским процесима, како унутар, тако и ван ћелије.

1.1.1. Структура протеина HMGB1

Протеин HMGB1 садржи два базна ДНК везујућа домена (аминотерминални HMGB A домен, централни HMGB B домен) и кисели, карбокситерминални C домен (слика 1.1) (Bianchi и сар., 1992). ДНК везујући домен делом се налази у аминотерминалном домену А, делом у централном В домену, док је за остваривање интеракција са другим протеинима кључан негативно наелектрисани C домен. Након везивања за ДНК, протеин HMGB1 ступа у однос са хистонима и двовалентним катјонима, али такође регрутује различите транскрипционе регулаторе, протеине са хомеодоменима и рецепторе стероидних хормона, утичући тиме на процес транскрипције (Bianchi, 2004). Поседовање оваквих двојаких особина, омогућава протеину HMGB1 везивање, како за ендogene, тако и за екзогене компоненте.



Слика 1.1. Структура протеина HMGB1 – преузето и прилагођено из (Harris и сар., 2012)

ДНК везујући домени су неопходни за секвенцијоно-неспецифично савијање ДНК. Ови домени садрже NES секвенце (енг. nuclear export signals - NES), кључне за излазак протеина из једра, посредованог једарним експортином CRM1 (енг. chromosome region maintenance 1 - CRM1). Насупрот томе, у стабилном стању протеин HMGB1 се налази превасходно унутар једра захваљујући двема секвенцама једарне локализације, NLS1 и NLS2 (енг. nuclear localization signals: NLS1 и NLS2) (Bonaldi и сар., 2003). Модификације у NES и NLS омогућавају премештање протеина HMGB1 унутар ћелије.

1.2. Посттранслационе модификације протеина HMGB1

Велики број студија показао је да протеин HMGB1 подлеже различитим посттранслационим модификацијама, укључујући ацетилацију, ADP-рибозилацију, метилацију, фосфорилацију, гликозилацију и оксидацију (Kang и сар., 2014a)

1.2.1. Ацетилација протеина HMGB1

Ране студије показале су да лизини на позицијама 2 и 11 (Lys2 and Lys11) унутар молекула HMGB1 подлежу ацетилацији (Sterner и сар., 1979). Касније студије, показале су да је ацетилација кључних лизина унутар NLS домена протеина HMGB1 одлучујућа за прелазак протеина HMGB1 из једра у цитоплазму и његову секрецију од стране активираних моноцита и макрофага (Bonaldi и сар., 2003).

Скорашње студије показале су да хиперацетилисан HMGB1 представља нови биомаркер пироптозе (Lu и сар., 2012), типа ћелијске смрти који се одликује стварањем осмотског притиска услед каспаза 1-зависног формирања пора у ћелијској мембрани (Fink и Cookson, 2005). За разлику од неацетилисаног HMGB1, који ослобађају макрофаги у култури током некрозе изазване циклусима отапања и замрзавања, мишји моноцити, стимулирани DAMP молекулима, ослобађају HMGB1 који је ацетилисан у NLS регионима (Yang и сар., 2013b). Осим улоге финог модулятора “архитектуралних“ особина протеина, ацетилација HMGB1 ограничава унос овог протеина у једро и посредује у његовом отпуштању као одговор на стимулусе, попут LPS (енг. lipopolysaccharide – LPS) (El Gazzar, 2007), интерферона (Lu и сар., 2014), повреда након исхемије (Dhupar и сар., 2011).

1.2.2. ADP-рибозилација протеина HMGB1

ADP-рибозилација представља процес додавања једне или више ADP (енг. adenosine diphosphate – ADP) резидуа протеину помоћу ADP-рибозил трансферазе.

Протеину HMGB1, у интактним ћелијама у култури које немају ДНК оштећења, може бити додата једна ADP резидуа. ADP-рибозилација HMGB1 се не мења током старења, али је повећана у ћелијама канцера (Prasad и Thakur, 1990). Имајући у виду да је ADP-рибозилација супротно корелисана са транскрипцијом, проистиче да прекомерна ADP-рибозилација протеина HMGB1 смањује генску транскрипцију (Kang и сар., 2014a). Моно-ADP-рибозилација и PARP1 (енг. poly(ADP)-ribosylation polymerase1 – PARP1) -посредована поли-ADP-рибозилација неопходне су за излазак из једра и ослобађање протеина HMGB1 током ћелијске смрти, нарочито током некрозе (Ditsworth и сар., 2007).

1.2.3. Метилација протеина HMGB1

HMGB1 у неутрофилима је монометилован на лизину на позицији 42 током диференцијације из мијелоцита. Способност метилованог протеина HMGB1 да веже молекулу ДНК је значајно смањена услед промене конформације А домена. Због овакве промене, у неутрофилима долази до преласка протеина HMGB1 из једра у цитоплазму (Ito и сар., 2007a). Слично је у ћелијама бубрежног карцинома, где је протеин HMGB1 такође монометилован, што доприноси његовом преласку из једра у цитоплазму (Wu и сар., 2013). Стога, HMGB1 представља мету метилујућих агенаса у хроматину (Boffa и Bolognesi, 1985).

1.2.4. Фосфорилација протеина HMGB1

Фосфорилацију протеина HMGB1 регулишу протеин киназа С (PKC), казеин киназа I и циклин зависна киназа 5 (Cdk5) (Kang и сар., 2014a; Oh и сар., 2009; Ugrinova и сар., 2012). Фосфорилација протеина HMGB1 утиче како на везујући/савијајући афинитет протеина HMGB1 за ДНК, тако и на његову прераспodelу између једра и цитоплазме и излажење из ћелије (Kang и сар., 2009; Oh и сар., 2009). Протеин HMGB1 фосфорилисан од стране PKC има повећану способност излажења из имунских и ћелија канцера (Lee и сар., 2012). Cdk5

посредована фосфорилација протеина HMGB1 утиче на повезивање ДНК крајева (Ugrinova и сар., 2011). Након третмана макрофага са TNF- α показано је да су многе серинске резидуе (на позицијама Ser35, Ser39, Ser42, Ser46, Ser53 и Ser181) унутар NLS домена протеина HMGB1 фосфорилисане (Youn и Shin, 2006). Фосфорилисани HMGB1 има смањену способност везивања за једарни импротин CAP-1, што има за последицу повећано присуство овог протеина у цитоплазми и његово излажење из ћелије (Youn и Shin, 2006).

1.2.5. Гликозилација протеина HMGB1

Познато је да протеин HMGB1 може подлећи процесу гликозилације, али је функција ове посттранслационе модификације и даље слабо испитана (Chao и сар., 1994). N-гликозилација је предуслов за прелазак протеина HMGB1 из једра у цитоплазму и за секрецију у ванћелијску средину. Протеини HMGB1, измењени на позицијама аспарагинских резидуа (Asn34, Asn134 и Asn135), нису подложни гликозилацији и показују јаче везивање за молекулу ДНК и слабији афинитет према експортину CRM1. Стога је данас прихваћено да је N-гликозилација протеина HMGB1, фактор који утиче на транспорт између једра и цитоплазме, излучивање из ћелије, али и стабилност молекула HMGB1 (Kim и сар., 2016).

1.2.6. Оксидација протеина HMGB1

Новији подаци показују да промена локализације и функције протеина HMGB1 зависи од његовог редокс стања (Tang и сар., 2011a). HMGB1 садржи три цистеина, на позицијама Cys23, Cys45 и Cys106. Cys23/Cys45 смештени су унутар А домена и имају способност брзог формирања унутармолекулске дисулфидне везе услед тога што ћелијски глутатионски систем није у стању да одржава молекуле протеина HMGB1 у константно редукованом стању (Sahu и сар., 2008). Cys106, унутар В домена, неопходан је за једарну локализацију HMGB1, с обзиром на то да је показано да мутација Cys106, али не и Cys23 и Cys45, подстиче прелазак протеина

HMGB1 из једра у цитоплазму. У поређењу са оксидованим HMGB1, редукована форма протеина показује већу склоност за везивање деформисаних и оштећених структура ДНК молекула (Park и Lippard, 2011). Како реактивне врсте кисеоника (енг. reactive oxygen species - ROS) у значајној мери подстичу прелазак и ослобађање протеина HMGB1 из активираних имунских ћелија или оштећених ћелија (Tang и сар., 2011a), проистиче да је ROS управо један од главних чинилаца који доприносе смањењу способности једарног HMGB1 да везује молекул ДНК, што за узврат делује на излазак протеина HMGB1 у цитоплазму и његово ослобађање ван ћелије. Осим утицаја на локализацију и отпуштање, редокс стање протеина HMGB1 директно утиче на његову ванћелијску активност, укључујући имунски одговор и аутофагију (Venereau и сар., 2012). Прво откриће у вези са редокс стањем протеина HMGB1 и његовом улогом у имунском одговору, односило се на то да оксидовани протеин HMGB1, ослобођен из апоптотске ћелије, води имунској толеранцији (Kazama и сар., 2008). Касније је показано да редуковани HMGB1, али не и оксидовани, подстиче аутофагију и ћелијску пролиферацију у ћелијама канцера, везујући се за RAGE (енг. receptor for advanced glycation end products – RAGE) рецептор (Tang и сар., 2010a). Редокс статус цистеинских резидуа одређује да ли ће ванћелијски HMGB1 испољавати хемокинска или цитокинска својства. Тачније, HMGB1 код кога су редуковане све цистеинске резидуе, понаша се као хемокин, везује се за CXCL12 и даље подстиче инфилтрацију имунских ћелија преко CXCR4 рецептора. Делимично оксидовани HMGB1, код кога је формирана дисулфидна веза на позицији Cys23-Cys45, а редукована позиција Cys106 (дисулфидни HMGB1), делује као проинфламацијски цитокин, подстичући имунске ћелије на стварање цитокина/хемокина преко TLR4 рецептора. Терминално оксидовани, сулфонил HMGB1, лишен је хемотактичких и цитокинских дејстава (Balosso и сар., 2014; Liu и сар., 2012; Venereau и сар., 2012; Yang и сар., 2015).

Раније је показано да HMGB1 индукује имунски одговор преко TLR4-MD2 сигналног пута и да је за остваривање ове реакције неопходно да молекул HMGB1 буде у одређеном редокс стању и са специфичном атомском структуром тиол-цистеина 106 (Yang и сар., 2012). Са друге стране, пул HMGB1 протеина, након

активног ослобађања од стране активираних имунских ћелија или након пасивног ослобађања из умирућих ћелија, представља смешу изоформи овог протеина са различитим посттранслационим модификацијама (Yang и сар., 2013). Како протеин мијелоидне диференцијације, MD2 (енг. myeloid differentiation protein – MD2), специфично везује само дисулфидну изоформу протеина HMGB1, управо се на тај начин врши дискриминација различитих изоформи HMGB1 које имају за циљ покретање TLR4-зависног преноса сигнала, односно да је ова интеракција од критичне важности за HMGB1 посредовано стварање цитокина/хемокина и последични настанак ткивних оштећења (Yang и сар., 2015).

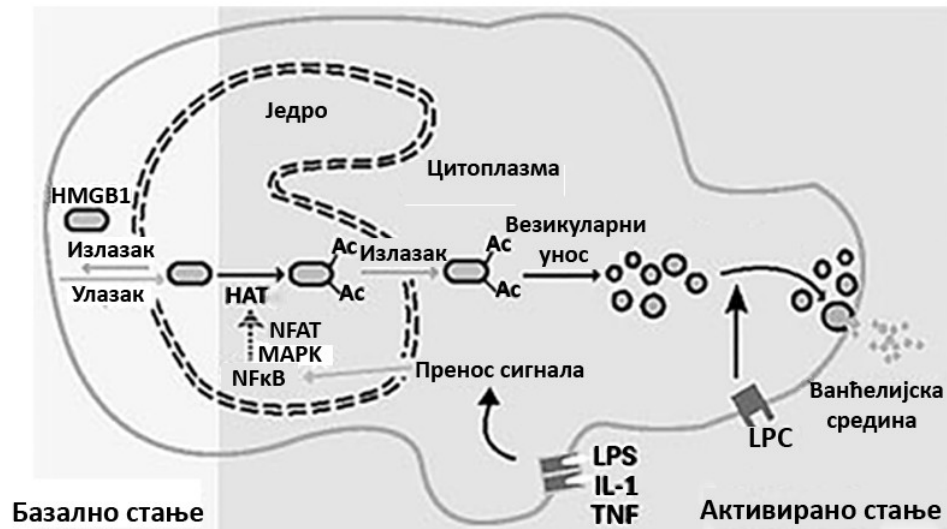
1.3. Ванћелијско ослобађање протеина HMGB1

1.3.1. Активно ослобађање протеина HMGB1

Као одговор на продукте које ослобађају микроорганизми (ендотоксин), CpG-DNK, гљивичну инфекцију или ендогени стимулус самог домаћина (TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , водоник пероксид, азот моноксид, пероксинитрит, хиперлипидемију, хипергликемију, неуропептид Y, АТР) или друге стимулусе (етанол, природну ДНК или синтетисане олигонуклеотиде, UV зрачење), имунске ћелије (макрофаге, моноците, неутрофиле, дендритске и природне убице ћелије), фибробласте или епителијалне ћелије активно ослобађају протеин HMGB1 у ванћелијску средину. Услед недостатка водеће сигнал секвенце овај протеин не може бити ослобођен класичним ендоплазматични ретикулум-Голџи секреторним путем (слика 1.3). Уместо тога, описано је неколико другачијих механизма којима HMGB1 најпре прелази из једра у цитоплазму, а затим бива ослобођен из ћелије (Kang и сар., 2014a).

1.3.1.1. Контролисана секреција протеина HMGB1 од стране имунских ћелија – посттранслационе модификације

У свим ћелијама, укључујући инфламацијске ћелије у стању мировања, присутно је пребацивање протеина HMGB1 из једра у цитоплазму и обрнуто. Улазак у једро представља активан процес, док се прелазак овог протеина из једра у цитоплазму може одвијати спонтано, пасивном дифузијом или активно, посредством експортина CRM1. У случају када HMGB1 није ацетилисан, ниво једарног уноса превазилази излазак у цитоплазму, услед чега се протеин HMGB1 претежно налази у једру (Bonaldi и сар., 2003a). Са друге стране, активацијом имунских ћелија везивањем LPS или HMGB1 за одговарајуће рецепторе, активирају се различити сигнални путеви. Фосфорилисане киназе улазе у једро где директно или посредством адапторских протеина активирају хистон ацетилазе и инхибирају деацетилазе, што има за последицу ацетилацију протеина HMGB1. Када је равнотежа између HAT (енг. histone acetyltransferase – HAT) и HDAC (енг. histone deacetylase – HDAC) померена у корист повећане ацетилације, услед губитка великог дела позитивних шаржи, значајан удео протеина HMGB1 бива извезен у цитоплазму, захваљујући присуству NES и експортина CRM1 (Hutten и Kehlenbach, 2007). Извезени ацетилисани HMGB1 не може бити враћен у једро. У цитоплазми, накупљање ацетилисаног HMGB1 у везикуле захтева присуство специфичних органела, секреторних лизозома. Након одговарајућег стимулуса и везивања инфламацијског липида LPC (лизофосфатидилхолина) за сопствени рецептор, секреторни лизозоми спајају се са плазма мембраном и излучују накупљени протеин HMGB1 у спољашњу средину (Bonaldi и сар., 2003b; Gardella и сар., 2002) (слика 1.2).



Слика 1.2. Секреција протеина HMGB1 из имунских ћелија - преузето и прилагођено из Bonaldi и сар., 2003а

1.3.1.2. Изразак HMGB1 из једра подстакнут реактивним врстама кисеоника

Прихваћено је да су супероксид анјон (O_2^-), хидроксил радикал (OH^\cdot), водоник пероксид (H_2O_2) и синглет кисеоника (1O_2), неки од главних сигнала одговорних како за активно, тако и за пасивно ослобађање протеина HMGB1 из имунских и неимунских ћелија (Kang и сар., 2014а). Познато је да H_2O_2 активира MAPK и NF- κ B сигналне путеве, чиме подстиче ослобађање HMGB1 из макрофага и моноцита (Tang и сар., 2006). Са друге стране, различити антиоксиданти значајно инхибирају отпуштање протеина HMGB1 (Kang и сар., 2014а). Показано је да губитак ензима хемоксигеназе (HO-1), који има кључну улогу у одбрани организма од оштећења изазваног оксидативним стресом, доводи до повећања секреције протеина HMGB1, док повећан ниво овог ензима инхибира отпуштање HMGB1 у одговору на инфламацију (Chen и сар., 2013).

1.3.1.3. Излазак HMGB1 из једра посредован јонима калцијума

Јони калцијума представљају важне унутарћелијске преноснике сигнала. Они регулишу различите ћелијске процесе, испољавајући алостерично дејство на многе протеине и ензиме. Пренос сигнала, посредован јонима калцијума, укључен је и у прелажење и ослобађање протеина HMGB1 током инфекције (Zhang и сар., 2008) и стерилне инфламације (Tsung и сар., 2007). Овај процес регулишу калцијум/калмодулин зависне протеин киназе, (CaMK) I и IV, које промовишу фосфорилацију серина у молекулу HMGB1 (Zhang и сар., 2011). Такође, калцијум регулише и активност протеин киназе C која је и сама укључена у отпуштање протеина HMGB1 (Ma и сар., 2012). Спречавање калцијумског сигналинга доводи до смањеног ослобађања протеина HMGB1 и штити од оштећења узрокованих исхемијом и сепсом (Hataji и сар., 2010).

1.3.1.4. Улога сигналног пута азот монооксида

Азот моноксид (NO) представља важан сигнални молекул који ствара NO синтаза. У макрофагима, након активације ендотоксинима или цитокинима, продукује се индуцибилна NO синтаза (iNOS) и долази до ослобађања велике количине NO, чији је циљ да убије или спречи деловање микроорганизама или неопластичног ткива. Међутим, превисок ниво iNOS изазваће инфламацију, делом и кроз појачавање ослобађања HMGB1 (Tsoyi и сар., 2010). Више различитих студија показало је да на активно ослобађање протеина HMGB1, током инфламације, утичу TNF- α (Chen и сар., 2004), активирани MAP киназе (ERK, JNK, P38) (Zhou и сар., 2013), као и STAT1/3 сигнални пут (Hao и сар., 2013) Са друге стране, сам HMGB1 подстиче стварање iNOS, што за последицу може имати одржавање стања инфламације и настанак оштећења (Ren и сар., 2006).

1.3.1.5. Инфламазом зависни механизам

Инфламазоми представљају протеинске олигомере који се активирају као одговор на присуство DAMP, PAMP (енг. pathogen associated molecular pattern - PAMP) или метаболичког стреса и воде ка ослобађању проинфламацијских цитокина (IL-1 β и IL-18) и покретању урођеног имунског одговора (Schroder и Tschopp, 2010). Недавно је показано да инфламазоми играју значајну улогу у ослобађању протеина HMGB1 из активираних имунских ћелија (Barlan и сар., 2011) или ћелија канцера (Miller и сар., 2014). Инхибитори инфламазома спречавају ослобађање протеина HMGB1 и штите од оштећења изазваних сепсом или исхемијом/реперфузијом (Като и сар., 2013).

1.3.2. Пасивно ослобађање протеина HMGB1

Протеин HMGB1 пасивно ослобађају ћелије које умиру (некрозом, апоптозом, лизозомалном смрћу и аутофагијом) и ћелије оштећене хемиотерапијом, зрачењем, хипоксијом, хипертермијом, високим притиском, падом глукозе, токсинима итд. (Kang и сар., 2014a). У пасивно ослобађање протеина HMGB1 укључено је неколико механизма:

- Показано је да је PARP1 одговоран за ослобађање протеина HMGB1 током некрозе изазване ДНК оштећујућим агенсима (Kang и сар., 2014a).
- Антиоксидативни ензими CuZnSOD (бакар-цинк супероксид дисмутаза), MnSOD (манган супероксид дисмутаза) (Kang и сар., 2011), глутатион редуктаза (Chiang и Maric, 2011), тиоредоксин (Vezzoli и сар., 2011) и пероксиредоксин (Shichita и сар., 2012) такође регулишу ослобађање овог протеина.
- Показано је да и ћелије у апоптози ослобађају HMGB1 и нуклеозоме како би индуковале имунски одговор. Ослобађање HMGB1 покренуто је услед фрагментације ДНК (Yamada и сар., 2011).

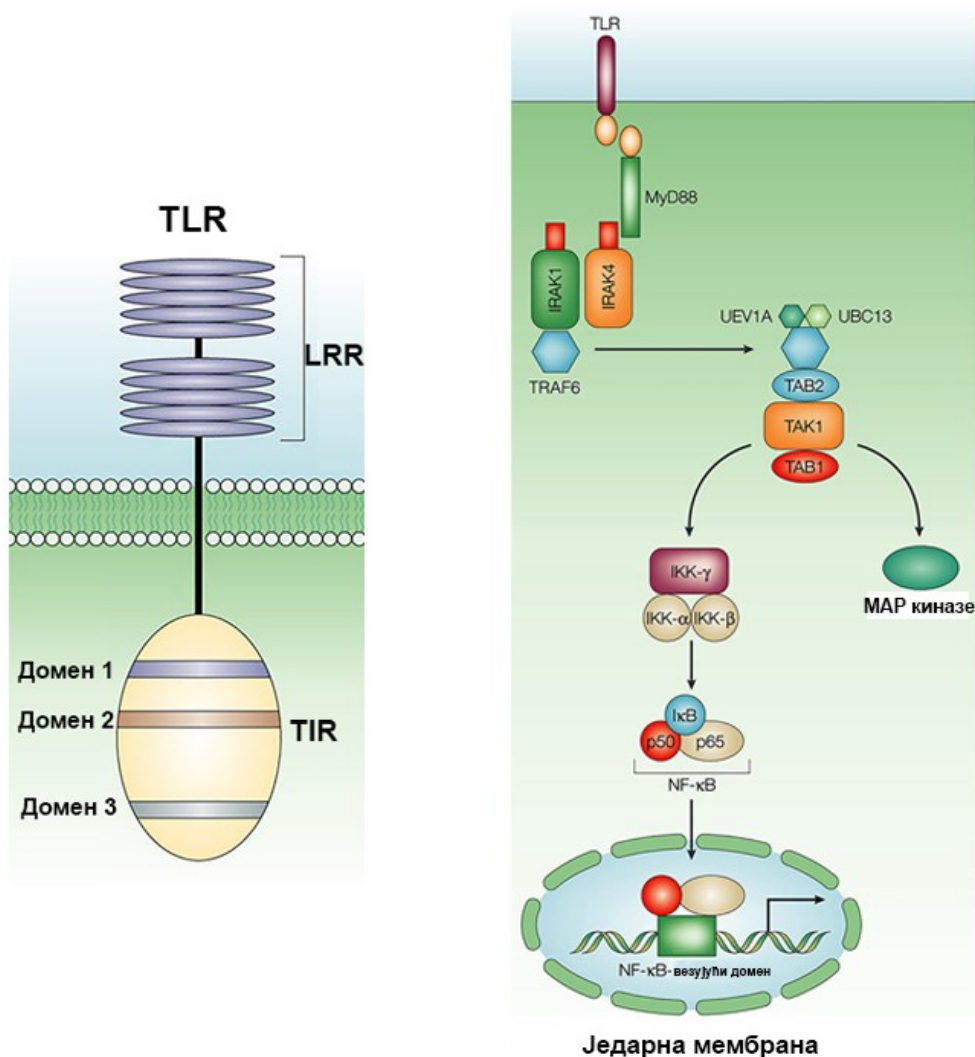
- Каспазе могу током апоптозе индуковати ослобађање HMGB1 тако што подстичу митохондрије на повећану продукцију ROS (Kang и сар., 2014а).
- Процес аутофагије укључен је у излучивање протеина HMGB1 из фибробласта и макрофага у одговору на гладовање и бактеријски липополисахарид (Tang и сар., 2011b).

1.4. HMGB1 рецептори

Ванћелијски HMGB1 своје бројне улоге остварује везивањем за специфичне мембранске рецепторе, чиме покреће различите сигналне путеве. До данас идентификовани рецептори преко којих делује HMGB1 су TLR (енг. Toll-like receptors – TLRs) 2, 4 и 9, RAGE, Mac-1, Sindekan-1 (CD138), Хемокин (С-Х-С мотив) рецептор 4 (CXCR4), CD24, Т-ћелијски имуноглобулин муцин-3 (Erlandsson и Andersson, 2004).

1.4.1. TLR рецептори

TLR рецептори представљају еволутивно конзервисану суперфамилију трансмембранских рецептора која има кључну улогу у раној одбрани организма од патогена (Beutler и Rietschel, 2003). Припадају типу I трансмембранских гликопротеина и великој суперфамилији рецептора која укључује и рецепторе за интерлеукин 1 (IL-1R) (Akira и Takeda, 2004). Одликују се присуством ванћелијског домена богатог леуцином (енг. leucine-rich repeat domains – LRR) и цитоплазматским TIR доменом (енг. Toll/IL-1 receptor – TIR) (слика 1.3). Конкавна површина ванћелијског LRR домена омогућава директно препознавање различитих патогена, укључујући DAMP, а његова јединственост код сваке врсте TLR рецептора, омогућава препознавање само специфичног лиганда. TIR садржи три конзервисана домена кључна у низводном преносу сигнала (Akira и Takeda, 2004).



Слика 1.3. Структура и пренос сигнала TLR рецептора – преузето и прилагођено од Akira и Takeda, 2004

Након везивања лиганда долази до димеризације TLR рецептора и промене његове конформације, што омогућава регрутовање низводних сигналних молекула. Међу њима су MyD88 (енг. adaptor molecule myeloid differentiation primary-response protein 88), IRAK киназе (енг. IL-1R-associated kinases), киназу TAK1 (енг. transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase), TAK1 везујући протеин 1 (TAB1), TAK1 везујући протеин 2 (TAB2) и TRAF6 (енг. tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6). Наведени адапторски протеини преносе сигнале са свих

TLR домена и ангажују друге низводне сигналне протеине. Различите врсте TLR користе различите комбинације адаптоских протеина како би одредиле низводни пренос сигнала. Једино TLR4 користи све врсте поменутих адаптоских протеина (Guo и Friedman, 2010).

Од TLR рецептора полазе два сигнална пута, MyD88-зависни и MyD88-независни пут (слика 1.4). MyD88-зависни пут низводно активира I κ B киназу, као и митоген-активирајуће протеин киназе (енг. mitogen-activated protein kinase – MAPK) (Paik и сар., 2003). Ови догађаји даље воде ка активацији транскрипционог регулатора NF- κ B и активаторског протеина AP-1, контролишући експресију проинфламацијских цитокина и других гена везаних за имунски одговор (Guo и Friedman, 2010). MyD88-независни пут доводи до активације интерферонског регулаторног фактора ((IRF)3) и подстиче експресију интерферона ((IFN)-b), као и интерферон респонсивних гена (Vogel и Fenton, 2003). MyD88-независни пут такође посредује у касној активацији NF- κ B и MAPK. Активација ова два сигнална пута низводно од TLR зависи од типа ћелије, као и од нивоа присутности лиганда који се везује за рецептор (McGettrick и O'Neill, 2010).

Протеин HMGB1 може остварити интеракцију са рецепторима TLR суперфамилије (TLR2, TLR4 и TLR9) и на тај начин активирати NF- κ B и IRF (енг. interferon-regulatory factorfamily – IRF) сигналне путеве који даље воде продукцији цитокина и хемокина, неопходних за инфламацију и имунски одговор (Kang и сар., 2014a). На структурном нивоу, активација HMGB1-TLR4 пута добро је проучена. Данас је познато да је за везивање протеина HMGB1 за TLR4 рецептор важна интрамолекуларна веза цистеина на позицијама Cys23–Cys45 у молекулу HMGB1, као и цистеинска резидуа на позицији Cys106 (Yang и сар., 2010, 2012). Такође, за започињање унутарћелијског сигналинга од TLR4 рецептора, неопходно је присуство и два корецептора, протеина CD14 и MD2, који заједно формирају рецепторски комплекс (da Silva Correia и сар., 2001). Стога, активност TLR4 рецептора и његова интеракција са лигандима зависи од узајамног дејства молекула лиганда са ванћелијским адаптоским протеином MD2 (Miyake, 2004). Протеин HMGB1 у комплексу са липидом може се, слично као и LPS, високим афинитетом везати за

CD14 и/или MD2, а затим се у комплексу са овим протеином везати за TLR4 на површини ћелије (Yang и сар., 2015) и индуковати пренос сигнала (Kim и сар., 2013). Код животиња које немају TLR4 показано је смањење HMGB1 посредованог оштећење ткива (Laird и сар., 2014), ћелијске миграције и адхезије (Baueг и сар., 2013), ангиогенезе (Lin и сар., 2011b), инфламације (Lv и сар., 2009) и имунског одговора (Apetoh и сар., 2007). TLR4 и TLR2 кључни су за појаву оштећења ткива (Herzog и сар., 2014), ћелијску миграцију и адхезију (Furlani и сар., 2012), инфламацију (Park и сар., 2006) и обнављање матичних ћелија (Conti и сар., 2013), док је TLR9 махом одговоран за имунски одговор индукован HMGB1-ДНК комплексом (Hirata и сар., 2013; Tian и сар., 2007).

Гени регулисани TLR рецепторима кодирају за цитокине и протеине укључене у контролу урођеног и стеченог имунитета, ћелијско преживљавање, апоптозу и фиброгенезу (Guo и Friedman, 2010).

1.4.2. RAGE рецептор

RAGE рецептор, члан суперфамилије имуноглобулинских гена, представља трансмембрански рецептор са једним ванћелијским доменом, кратким трансмембранским и цитоплазматским репом. Ванћелијски домен одговоран је за везивење лиганата, док је цитоплазматски неопходан за унутарћелијски пренос сигнала. Испрва је био препознат као рецептор који везује продукте повишене гликације (енг. advanced glycation end products – AGEs), али је данас познато да везује више различитих лиганата, међу њима и HMGB1, S100, амилоид- β -пептид, ДНК, РНК и друге молекуле који регулишу различите физиолошке и патолошке процесе (Kang и сар., 2014a). Велики број студија показао је да је RAGE неопходан за процесе миграције (Palumbo и сар., 2004), пролиферације (Kang и сар., 2010), регенерације (Degryse и сар., 2001), инфламације (He и сар., 2011), аутофагије (Kang и сар., 2012), стварања оштећења (Wolfson и сар., 2011) и имунског одговора посредованог протеином HMGB1 (LeBlanc и сар., 2014). Ванћелијски HMGB1 може да стимулише експресију RAGE рецептора у различитим типовима ћелија (Li и сар., 1998).

Сигнална оса HMGB1-RAGE представља потенцијално важну мету у болестима, као што су дијабетес (Manigrasso и сар., 2014, Petrovic и сар. 2017) и канцер (Sims и сар., 2010), али и неуродегенеративне (Li и сар., 1998), инфламацијске (Liliensiek и сар., 2004) и аутоимунске болести (Ullah и сар., 2014).

1.4.3. Улоге ванћелијског HMGB1

У ванћелијској средини, протеин HMGB1 остварује улоге у процесима инфламације, имунског одговора, миграције, инвазије, пролиферације, диференцијације, антимикробне одбране и регенерације ткива (Kang и сар., 2014).

1.4.3.1. HMGB1 и инфламацијски одговор

Haichao Wang са сарадницима је 1999. године направио велики искорак открићем да ванћелијски протеин HMGB1 учествује у инфламацији и инфекцији. Показано је да протеин HMGB1 има улогу касног медијатора са цитокинском активношћу у сепси, која је праћена системским инфламацијским одговором услед инфекције изазване микробима (Kang и сар., 2014a). Данас је познато да се ванћелијски протеин HMGB1 селективно везује за различите рецепторе (RAGE и TLR) и да на тај начин активира макрофаге, моноците, неутрофиле, еозинофиле, астроците, фибробласте, кератиноците, дендритске ћелије, ћелије природне убице, Т и ендотелске ћелије и друге да продукују и ослобађају цитокине (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), инфламацијски протеин макрофага (енг. macrophage inflammatory protein – MIP), хемокине, адхезивне молекуле и факторе раста (Kang и сар., 2014a). Молекуларни механизми који леже у основи проинфламацијске активности протеина HMGB1 укључују активацију неколико сигналних путева, међу којима су најпознатији p38, ERK, JNK, JAK, STAT1, Src, HSP27, EGR1 (Kang и сар., 2014a). Самостално, протеин HMGB1 има ниску проинфламацијску активност (Rouhiainen и сар., 2006), али она постаје изражена након његовог везивања за DAMP или PAMP (нпр. IL-1b (Hreggvidsdottir и сар., 2009), LPS (Hreggvidsdottir и сар., 2009),

CpG-ODN (Hreggvidsdottir и сар., 2009), липиде (Rouhiainen и сар., 2006), ДНК или нуклеозоме (Pisetsky и сар., 2011). Показано је да протеин HMGB1 игра улогу важног медијатора акутног оштећења органа плућа (Abraham и сар., 2000) и мозга (Agnello и сар., 2002), губитка панкреасних острваца (Matsuoka et al., 2010), цитоскелетног реаранжмана (Wolfson и сар., 2011), поремећаја цревне баријере (Sappington и сар., 2002), поремећаја баријере крвних судова (Wolfson и сар., 2011) и преканцерозних лезија (Dejean и сар., 2012), али и у многим хроничним инфламацијским и аутоимунским болестима (Kang и сар., 2014a). Спречавање излучивања или деловања протеина HMGB1 доводи до значајног смањења инфламацијског одговора, повреде ткива и смртности животиња (Kang и сар., 2014a).

1.4.3.2. HMGB1 и ћелијска миграција

Ћелијска миграција, процес важан за развитак и одржавање вишећелијских организама, присутан у многим физиолошким и патолошким стањима (Irina и Friedl, 2009), посредован је интеракцијама хемокина и одговарајућих рецептора. Бројне студије су навестиле да би протеин HMGB1 могао да, као хемокин, промовише миграцију више типова ћелија (Degryse и de Virgilio, 2003), укључујући неурите (Fages и сар., 2000), глатке мишићне ћелије (Degryse и сар., 2001), миобласте (Fages и сар., 2000), туморске ћелије (Fages и сар., 2000), стелатне ћелије јетре (Wang и сар., 2013), ендотелијалне ћелије (Furlani и сар., 2012), кератиноците (Ranzato и сар., 2009), моноците (Pedrazzi и сар., 2007), дендритске ћелије (Dumitriu и сар., 2006) и неутрофиле (Orlova и сар., 2007). Механизам деловања протеина HMGB1 укључује сигналну трансдукцију преко ERK (Degryse и сар., 2001), JNK (Wang и сар., 2013), PI3K/AKT и Src (Wang и сар., 2013), транскрипционог регулатора NF-κB, као и дејство на производњу хемокина (Kang и сар., 2014a). Ова открића указала су да миграција посредована протеином HMGB1 доприноси регрутовању ћелија урођеног имунитета (Degryse и сар., 2001) и стем ћелија (Palumbo и Bianchi, 2004) до места инфекције, повреде или регенерације ткива (Degryse и сар., 2001), атеросклерозе након повреде крвног суда, трансендотелне миграције и инвазије и метастазирања

тумора (Huttunen и сар., 2002). Сматра се да је за миграцију посредовану протеином HMGB1 од кључне важности рецептор RAGE.

1.4.3.3. HMGB1 у регенерацији ткива

Процес регенерације ткива подразумева истовремено обнављање великог броја сложених структура, што омогућава ткиву да се опорави од оштећења. Неколико динамичних процеса доприносе регенерацији ткива, укључујући зарастање ране, ћелијску смрт и дедиференцијацију, регрутовање и пролиферацију стем ћелија (Kang и сар., 2014a). Активирањем MAP киназног сигналног пута, HMGB1 подстиче регенерацију миокарда и миогенезу скелетних мишића (De Mori и сар., 2007). Такође, овај протеин подстиче регенерацију епитела регрутовањем епителијалних прогениторских ћелија до места ткивне повреде (Tamaі и сар., 2011), реаранжирање цитоскелета у ендотелијалним ћелијама плућа (Wolfson и сар., 2011) и периодонталну регенерацију (Wolf и сар., 2013).

1.5. Протеин HMGB1 и ћелијска смрт

Према морфолошким карактеристикама, извршена је основна подела ћелијских смрти на тип 1 ћелијску смрт или апоптозу, тип 2 или аутофагију и тип 3 или некрозу (ћелијско убиство). Апоптоза и аутофагија дешавају се како у физиолошким, тако и у патолошким условима, док се некроза јавља онда када се ћелија нађе у екстремним нефизиолошким условима. Током апоптозе и аутофагије ћелија активно учествује и улаже енергију, због чега се ови процеси називају још и програмирана ћелијска смрт или ћелијско самоубиство. Са друге стране, некроза представља пасивни процес, који се јавља услед грубог нарушавања ћелијске хомеостазе.

1.5.1. Протеин HMGB1 у некрози

Термин „некроза” прво су користили морфолози да би описали неповратно оштећење ткива у патолошким условима које нема одлике апоптозе и аутофагије (Zong и Thompson, 2006). Међутим, некроза није искључиво случајан процес, већ може бити и облик програмиране ћелијске смрти, као у случају некроптозе (Galluzzi и сар., 2012). Морфолошки, некроза се одликује ћелијским отицањем, пуцањем и распадањем ћелијских органела. У њеној основи налазе се увећан ниво јона калцијума, стварање ROS, оштећење липидних мембрана, дестабилизација лизозома, ослобађање лизозомских ензима који почињу да разграђују слободне ћелијске компоненте (Zong и Thompson, 2006). Сви ови фактори воде ослобађању HMGB1, због чега је овај протеин често коришћен као маркер некрозе (Kang и сар., 2012a). Губитак унутарћелијског HMGB1 такође је одлика и некрозе која се јавља као последица деловања цитотоксичних агенаса и инфламацијског стимулуса. Неки подаци сведоче и о томе да би губитак HMGB1 могао да утиче на прелазак некроптозе у апоптозу, указујући на могућу улогу овог протеина у балансирању између различитих врста ћелијских смрти (Kang и сар., 2014a).

1.5.2. Протеин HMGB1 у апоптози

Апоптоза се активира кроз различите сигналне путеве који резултују низом добро дефинисаних биохемијских (активације чланова проапоптотске Bcl-2 фамилије, активације каспаза, сечења супстрата) и морфолошких промена (стварање апоптотских тела). Веза између протеина HMGB1 и апоптозе проучавана је на нивоу ћелија канцера. С једне стране, овај протеин може бити ослобођен из ћелије канцера током њеног умирања процесом апоптозе у каснијој фази, док са друге стране ванћелијски оксидовани HMGB1 може подстаћи каспаза-зависну апоптозу. Шта више, унутарћелијски HMGB1 је, уопштено гледано, анти-апоптотски протеин у одговору на више стимулуса (UV зрачење, CD95, TRAIL, Casp-8, Вах) (Breznicescu и сар., 2003). Протеин HMGB1 има транскрипционо зависне (регулација генске

експресије Bcl-2 фамилије протеина) и независне улоге (регулација аутофагије и p53 локализације) у регулацији апоптозе (Kang и сар., 2014a). У неким случајевима висок ниво HMGB1 појачава осетљивост ћелија на апоптозу, из чега проистиче да овај протеин игра двоструку улогу у регулацији апоптозе (Guerin и сар., 2008).

1.5.3. Протеин HMGB1 у аутофагији

Аутофагија је еволутивно очуван процес који се јавља код великог броја врста. Укључује пут деградације посредован лизозомима који подразумева формирање фагофоре, аутофагозома, аутолизозома и прогресију самог процеса. Насупрот општој аутофагији, селективна аутофагија подразумева циљано уклањање оштећених органела, ћелијског дебриса, микроорганизама и патогена (Reggiori и сар., 2012). У процесу ћелијске смрти има двојаку улогу: са једне стране појачана аутофагија повећава способност ћелије да се одупре умирању, док са друге стране недостатак аутофагије води ћелијском умирању (Kroemer and Levine, 2008). Поремећај у одвијању аутофагије игра кључну улогу у здрављу и болести људи. Данас се аутофагија испитује и у контексту ослобађања, излучивања и разградње протеина HMGB1 (Dupont и сар., 2011; Kang и сар., 2014a; Zhan и сар., 2012). Протеин HMGB1 такође регулише процес аутофагије на више нивоа. Једарни HMGB1, као транскрипциони кофактор, регулише експресију гена задужених за одржавање динамике унутарћелијског трафикинга током аутофагије (Tang и сар., 2011c). Цитоплазматски HMGB1 конкурише протеину Bcl-2 за интеракцију са протеином Bcl-1, што за узврат подстиче стварање аутофагозома посредованих протеином Bcl-1. Ванћелијски HMGB1 у редукованом стању подстиче аутофагију везивањем за RAGE рецептор (Tang и сар., 2010a). Аутофагија посредована протеином HMGB1 појачава хеморезистенцију канцерних ћелија (Huang и сар., 2012), системску инфламацију током сепсе (Yanai и сар., 2013) и повреду јетре изазвану исхемијом (Shen и сар., 2013).

1.6. HMGB1 у инфламацијским и аутоимунским болестима

1.6.1. Улога протеина HMGB1 током сепсе

Сепса и септички шок представљају главне клиничке проблеме и водећи су разлози за смрт пацијената у јединицама интензивне неге широм света (Angus and van der Poll, 2013). Најчешће узроковано инфекцијом Грам негативним бактеријама, може доћи до прекомерног инфламацијског одговора домаћина и појаве штетног синдрома системске инфламације (Vincent и сар., 2009). Главна компонента Грам-негативних бактерија је LPS који подстиче секрецију различитих „раних” проинфламацијских цитокина (TNF-а и IL-1 β) у првим сатима након инфекције (Tracey и Cerami, 1993). HMGB1 је један од „касих” проинфламацијских цитокина, секретован од стране макрофага 20 сати након активације LPS (Wang и сар., 1999). *In vivo*, код људи је детектован 8 сати након почетка леталне ендотоксемије и сепсе, након чега наставља да расте, да би достигао плато између 16. и 32. сата. Током ендотоксемије и сепсе изазване опекотинама, ниво HMGB1 информационе РНК у различитим ткивима (мишићи, јетра, плућа) је повећан (Fang и сар., 2002; Lang и сар., 2003). Давање рекомбинантног протеина HMGB1 мишевима изазива поремећај у функционисању органа погођених сепсом, поремећај функције цревне баријере, акутно оштећење плућа, летално отказивање органа (Andersson и Tracey, 2011; Wang и сар., 2001). Насупрот томе, примена анти-HMGB1 антитела и других инхибитора овог протеина (етил пируват (Ulloa и сар., 2002), никотина (Wang и сар., 2004), кверцетина (Tang и сар., 2009) или хормона (инсулин (Hagiwara и сар., 2008), вазоактивни интестинални пептид (Chorny и Delgado, 2008)) штити од леталне ендотоксемије и сепсе изазване цекалном лигацијом. Може се закључити да се протеин HMGB1 одложено ослобађа и да функционише као касни медијатор сепсе и стога представља важну мету терапеутског деловања.

1.6.2. Улога протеина HMGB1 у оштећењима изазваним исхемијом

Исхемија/реперфузија (енг. ischemia reperfusion - I/R) представља патолошки процес који подразумева најпре наглашену хипоксију органа, праћену поновним успостављањем дотока крви, услед чега долази до појаве стерилне инфламације. Исхемија је најчешће последица зачепљења крвног суда, које је присутно у трансплантацији органа, трауми, можданом удару, инфаркту миокарда, ресекцији јетре (Kang и сар., 2014a). I/R има за последицу накупљање леукоцита и појачан оксидативни стрес на месту повреде, што подстиче ослобађање медијатора инфламације. Ови процеси доприносе локалном ткивном оштећењу. Све је више доказа о томе да је управо протеин HMGB1 важан медијатор оштећења јетре (Камо и сар., 2013), срца (Andrassy и сар., 2008), бубрега (Chen и сар., 2011), кичмене мождине (Gong и сар., 2012), мозга (Huang и сар., 2013) и црева (Tetteh и сар., 2013) изазваним I/R. Протеин HMGB1 такође представља биомаркер оштећења код трансплантације јетре и бубрега код људи (Kruger и сар., 2009; Tsung и сар., 2005). Инхибиција активности HMGB1 помоћу неутралишућег антитела довела је до значајног смањења оштећења изазваног I/R, док је додавање рекомбинантног протеина довело до погоршања (Tsung и сар., 2005). Отпуштање протеина HMGB1 током I/R у вези је са сигналним путевима ROS и јона калцијума (Tsung и сар., 2007), док је активност овог протеина зависна од неколико рецептора, TLR4 (Tsung и сар., 2005), TLR9 (Vamboat и сар., 2010) и RAGE (Zeng и сар., 2009). Третман HMGB1 неутралишућим антителима значајно побољшава стање након инфаркта јетре, бубрега и мозга (Kang и сар., 2014a).

1.6.3. Улога протеина HMGB1 у болестима јетре

Осим у исхемији (Vamboat и сар., 2010), трансплантацији (Pmakunnas и сар., 2008) и регенерацији (Ogiku и сар., 2011) јетре, протеин HMGB1 је укључен у неколико болести јетре (Chen и сар., 2013b).

1.6.3.1. Неалкохолна масна јетра

Неалкохолна масна јетра (енг. nonalcoholic fatty liver disease – NAFLD), један од најчешћих узрока хроничне болести јетре, одликује се присуством инфламације и накупљањем масти, што има за последицу оштећење јетре, укључујући стеатозу, неалкохолни стеатохепатитис, фиброзу и цирозу (Day и James, 1998). Ванћелијски HMGB1 појачава инфламацијски одговор и оштећење јетре током раног стадијума болести. У овом процесу учествује TLR4-MyD88 сигнални пут (Li и сар., 2011). Инхибиција активности протеина HMGB1 коришћењем неутралишућих антитела смањује производњу проинфламацијских цитокина (TNF- α и IL-6) и штити од експериментално изазваног NAFLD (Li и сар., 2011), што указује на то да протеин HMGB1 представља везу између акутног оштећења и инфламацијског одговора током NAFLD.

1.6.3.2. Фиброза јетре

Фиброза јетре, крајњи стадијум хроничне болести овог органа, одликује се израженим нагомилавањем ванћелијског матрикса (Friedman, 2008). *In vitro* експерименти указали су на то да протеин HMGB1 подстиче стелатне ћелије јетре на умножавање (Као и сар., 2008). Штавише, TLR4-MyD88 и MAPK-NF- κ B сигнални путеви неопходни су за HMGB1 посредовану фиброзу (Wang и сар., 2013). Наиме, показано је да су и ванћелијски и унутарћелијски HMGB1 позитивни регулатори фиброзе јетре (Albayrak и сар., 2010).

1.6.4. Улога протеина HMGB1 у настанку дијабетеса

Дијабетес тип 1/ДТ1, аутоимунски или јувенилни дијабетес, је аутоимунска болест. Оштећење посредовано цитокинима доприноси губитку β -ћелија током развоја аутоимунског дијабетеса. Некроза посредована IL-1 β , као и NO-зависно ослобађање протеина HMGB1 могу допринети развоју инсулитиса и настанку ДТ1 (Нап и сар., 2008). При том, губитак RAGE и TLR4, кључних HMGB1 рецептора, инхибира настајање ДТ1 (Li и сар., 2012). Током трансплантације панкреасних острваца (врсте третмана оболелих од ДТ1) HMGB1 посредовани инфламацијски одговор може изазвати одбацивање трансплантата, посредовано TLR2 и TLR4 (Itoh и сар., 2012). Осим током ДТ1, HMGB1 посредована инфламација и ангиогенеза могу олакшати и настанак дијабетеса тип 2 (Biscetti и сар., 2010; Škrha Jr и сар., 2012).

1.7. Дијабетес

Дијабетес представља сложени метаболички поремећај чија је главна одлика повишен ниво шећера у крви, односно хипергликемија. Дијабетес је један од главних узрочника смртности у свету који погађа око 8% светске популације, при чему је број оболелих у сталном порасту. Разликују се два типа дијабетеса, *diabetes melitus* тип 1/ДТ1 или инсулин-зависан дијабетес, и *diabetes melitus* тип 2/ДТ2, инсулин-независан дијабетес. Инсулин-зависан дијабетес (ДТ1) је поремећај метаболизма глукозе кога карактерише смањена или потпуно заустављена производња инсулина изазвана деструкцијом бета ћелија панкреаса од стране аутоантитела (Mehers и Gillespie, 2008). ДТ2 настаје услед инсулинске резистенције, а повезан је са гојазношћу и старењем (Wright и сар, 2006). Неконтролисана хипергликемија код дијабетичних пацијената доводи се у везу са развојем секундарних дијабетичних компликација (Hunt и сар., 1988) тј. оштећењима, дисфункцијом и отказивањем различитих органа, нарочито очију (ретинопатија), бубрега (нефропатија), нерава (неуропатија), срца (инфаркт миокарда) и крвних судова (стеросклероза) (American Diabetes Association, 2010; Stirban и Tschoepe, 2008).

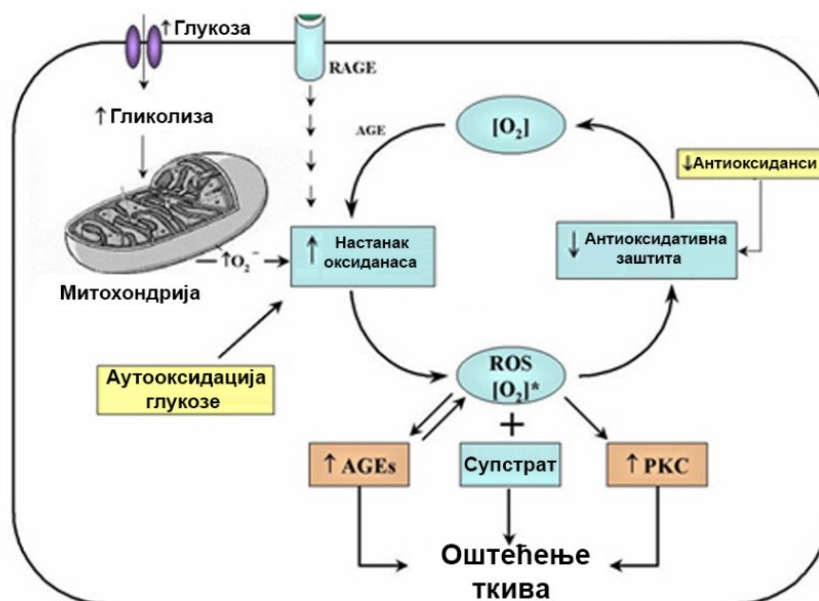
1.7.1. Оксидативни стрес као последица хипергликемије

Хронична хипергликемија током дијабетеса узрокује повећано стварање ROS, што води настанку оксидативног стреса. Осим што настали оксидативни стрес доводи до оштећења ћелија и развоја секундарних дијабетичних компликација (Jaganјас и сар., 2013), он може играти улогу и у настанку дијабетеса, делујући на пропадање панкреасних β -ћелија које синтетишу и ослобађају инсулин (Drews и сар, 2010).

У физиолошким условима, одређена количина слободних кисеоничних врста неопходна је за нормално функционисање организма, имајући у виду број и значај њихових улога. ROS учествује у регулацији унутарћелијског преноса сигнала, одигравању метаболичких процеса у организму и подстиче транскрипцију гена који кодирају транскрипционе факторе важне за диференцијацију, развој и ћелијску адхезију, сигналне путеве и повећану експресију антиоксидативних ензима (Gomes и сар., 2012). Стога је за нормално функционисање организма важно одржавање равнотеже између стварања и уклањања слободних кисеоничних врста. Током дијабетеса, хронично повишени ниво глукозе доводи до прекомерног и неконтролисаног настајања ROS (Fakhruddin и сар., 2017), те се као последица такве неравнотеже у ћелији јавља оксидативни стрес који има штетно дејство (Pizzino и сар., 2017). Слободне врсте кисеоника (O_2^- , H_2O_2 , OH^- , $1O_2^-$) су изузетно реактивни молекули који у биолошким системима модификују структурне и функционалне молекуле (липиде, нуклеинске киселине и протеине) (Leung и Nieto, 2013) (слика 1.6).

Постоји неколико механизма којима се ROS ослобађа у ћелији: појачана гликолиза (Vind и сар., 2012), унутарћелијска активација полиолског пута (Williamson и сар., 1993), аутооксидација глукозе (Wolff и сар., 1991), протеин киназа С зависна активација NAD(P)H оксидазе (Inoguchi и сар., 2003), појачани флукс хексозаминског пута (Rolo и Palmeira, 2006), формирање крајњих продуката повишене гликације (AGE) (Giacco и Brownlee, 2010), појачана експресија RAGE

рецептора (Giacco и Brownlee, 2010) и неензиматска гликација протеина (Ceriello и сар., 1992) (слика 1.4).



Слика.1.4. Повезаност настанка оксиданаса, антиоксидативне активности, оксидативног стреса и оксидативног оштећења током дијабетеса. Преузето и прилагођено из Chikezie и сар., 2015

Неензиматска гликација је спонтанa реакција која се одвија између глюкозе и аминокиселинске групе протеина из које настају Шифова база и стабилнији Амадори продукт (Aronson и Rayfield, 2002). Аутооксидацијом Амадори продуката настају крајњи производи повишене гликације (AGE) (Rolo и Palmeira, 2006). Глукотоксичност је додатно наглашена везивањем AGE за одговарајуће рецепторе, чиме се промовише оксидативни стрес унутар ћелије, и то: активацијом полиолског пута, активацијом изоформи протеин киназе C и трансформишућег фактора раста β (TGF- β). Такође, активирају се и путеви повезани са ћелијским стресом, као што су једарни фактор NF- κ B, p38, митоген активирајуће протеин киназе, NH₂-терминалне JUN киназе/стресом активирани протеин киназе и хексозамин (Evans и сар., 2003). Услед активације NF- κ B долази до повећања експресије различитих цитокина (Palsamy и сар., 2010).

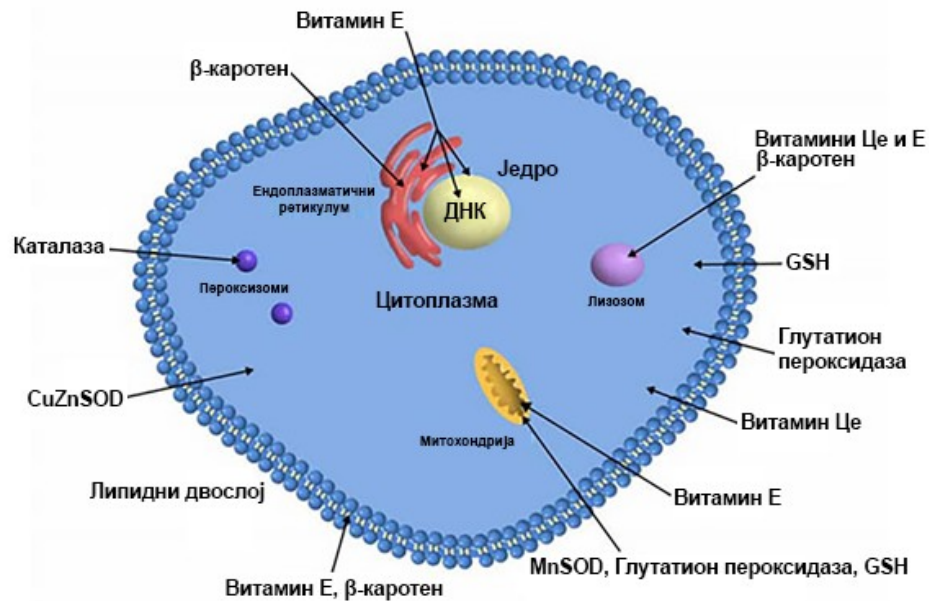
Електрон-транспортни ланац у митохондријама такође је важан извор ROS. Сматра се да превелико ангажовање митохондрија резултује стварањем ROS у раној фази дијабетеса, али и касније током настанка дијабетичних компликација. Током дијабетеса, услед оксидативног стреса митохондрије прекомерно производе супероксидне радикале у ендотелним ћелијама крвних судова и миокардијума (Nishikawa и Araki, 2006). Оксидативни стрес има улогу медијатора у инсулинској резистенцији и њеном напредовању ка глукозној интолеранцији и појави дијабетеса (Evans и сар., 2003). Поред тога, оксидативни стрес ослабљује антиоксидативни систем заштите организма. Тако ћелије ткива, услед немогућности да се адекватно супротставе повећаном броју слободних кисеоничних врста, постају подложније оксидативном оштећењу које директно погађа ћелијске макромолекуле. ROS може утицати и на модификацију нуклеотида унутар ДНК молекула (Ahsan и сар., 2003) и сулфхидрилних група протеина и изазивати фрагментацију рибонуклеопротеина (Waris и Alam, 1998).

Како би се спречило оксидативно оштећење, организам садржи систем антиоксидативне заштите. Овај одбрамбени систем заштите обухвата ензимску и неензимску компоненту (слика 1.5).

1) Ензимска компонента антиоксидативног система налази се у митохондријама, цитоплазми и ванћелијском простору, на местима на којима се ослобађа највише слободних радикала. Чине је антиоксидативни ензими супероксид дисмутаза (енг. superoxide dismutase - SOD), каталаза (енг. catalase - CAT), глутатион пероксидаза (енг. glutathione peroxidase - GSH-Px), глутатион редуктаза (енг. glutathione reductase - GR), глутатион С-трансфераза (енг. glutathione S-transferase - GST).

2) Неензимску компоненту система чине:

- Високомолекулски ендогени антиоксиданси (трансферин, геритин, хаптоглобин (енг. haptoglobin - Hp), хемопексин, албумин)
- Нискомолекулски ендогени антиоксиданти (глутатион (енг. glutation - GSH), витамин Ц, витамин Е, убиквинон, β-каротени, липоична киселина, билирубин, флавоноиди, мокраћна киселина).



Слика 1.5. Приказ ензимског антиоксидативног система и најзначајнијих неензимских антиоксиданаса организма. Преузето и прилагођено са <https://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>

1.7.1.1. Антиоксидативни ензими

Супероксид дисмутаза (SOD). Представља прву линију одбране од слободних радикала, катализујући превођење супероксид анјон радикала до водоник пероксида и кисеоника.

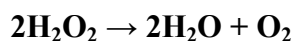


Водоник пероксид даље неутралишу глутатион пероксидаза или каталаза.

Постоје три изоформе супероксид дисмутазе: бакар-цинк SOD (CuZnSOD), превасходно смештена у цитоплазми ћелија, манган SOD (MnSOD), локализована у митохондријама ћелија и ванћелијска SOD (EC SOD) која своју биолошку улогу обавља у ванћелијској средини.

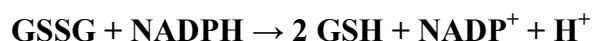
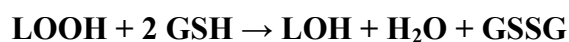
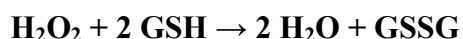
У јетри дијабетичних пацова измерена је смањена активност SOD (Manna и сар., 2010). Сматра се да би смањена активност овог ензима у бубрезима могла да доприноси развоју дијабетичне нефропатије (Fujita и сар., 2009).

Каталаза (CAT). Ензим присутан у свим ткивима сисара, при чему највећу активност испољава у јетри и еритроцитима. Унутар ћелије смештена је у пероксизомима и митохондријама где катализује реакцију превођења водоник пероксида до воде и кисеоника.



Константно повишена активност CAT утврђена је у срцу, аорти и мозгу дијабетичних пацова. Насупрот томе, смањена активност овог ензима детектована је у јетри и бубрезима дијабетичних животиња (Maritim и сар., 1999).

Глутатион пероксидаза (GSH-Px), глутатион редуктаза (GR), глутатион С-трансфераза (GST). Ова три ензима заузимају централно место у оквиру глутатион редокс циклуса који представља главни пут редукције органских хидропероксида. GSH-Px, у присуству редукованог глутатиона као даваоца електрона, катализује редукцију водоник пероксида до воде или органских хидропероксида у алкохол. Активношћу GR омогућена је стална регенерација редукованог глутатиона, будући да GR редукује оксидовани глутатион (GSSG) у редуковани глутатион (GSH) у присуству редукованог NADPH.



GST је ензим присутан код свих аеробних организама. Код сисара је присутан у свим ткивима, а највећу активност има у јетри. Овај ензим катализује коњугацију редукованог глутатиона преко сулфхидрилних група, са електрофилним центрима различитих супстрата, међу њима ксенобиотицима или ендогеним електрофилима, као и продуктима оксидативних оштећења организма. Формирањем коњугата настају хидрофилни метаболити који могу бити излучени из организма (Buetler и Eaton, 1992). Током дијабетеса активност GSH-Px повишена је у јетри, бубрезима, аорти, панкреасу, крви и црвеним крвним зрнцима, док је у срцу и ретини смањена (Maritim

и сар., 2003). Активност глутатион редуктазе смањена је у ретини и плазми, а повећана у срцу дијабетичних животиња (Maritim и сар., 2003).

Глутатион (GSH) је један од најважнијих неензимских антиоксиданата. То је трипептид (γ -глутамил-цистеин-глицин) који се јавља у тиол-редукованој (GSH) форми и сулфид-оксидованом (GSSG) облику (Flenley и сар., 1987). Око 95% унутарћелијског глутатиона налази се у редукованом облику. Кључан је у процесима синтезе и разградње протеина, настанку дезоксирибонуклеотидних прекурсора, у редукционим процесима, као и у регулацији активности ензима.

1.7.1.2. Хаптоглобин као антиоксиданс

Хаптоглобин припада групи акутно-фазних протеина и има висок афинитет везивања хемоглобина. Његова синтеза и секреција од стране хепатоцита повећана је током акутно-фазног одговора (Gabay и Kushner, 1999). У стањима повишене хемоллизе, хемоглобин постаје изразито токсичан услед прооксидативних особина хема, који учествује у Фентоновој реакцији из које, као производ, настају реактивне врсте кисеоника. У оваквим условима хаптоглобин везује слободни хемоглобин и транспортује га до јетре и макрофага (Watanabe и сар., 2009). На овај начин хаптоглобин штити организам од настанка оксидативног оштећења посредованог гвожђем. Осим као антиоксиданс, хаптоглобин има антиинфламацијске и имуномодулаторске карактеристике (Gabay и Kushner, 1999).

1.8. Значај јетре у одржавању глукозне хомеостазе

Јетра игра кључну улогу у регулацији метаболизма угљених хидрата. Њено нормално функционисање неопходно је за одржавање нивоа шећера у крви и континуирано снабдевање других органа довољном количином глукозе као извора енергије.

Јетра користи глукозу као извор енергије, има могућност њеног складиштења у виду гликогена, као и способност *de novo* синтезе глукозе из неугљенохидратних

прекурсора током процеса глуконеогенезе (Gavin и сар., 1999). Ћелије јетре поседују специфичне мембранске рецепторе за инсулин, преко којих инсулин омогућава унос и коришћење глукозе. Глукоза затим може бити употребљена као извор енергије (процес гликолизе) или ускладиштена у виду полимера гликогена код животиња. Инсулин подстиче синтезу гликогена, али је капацитет његовог складиштења у ткивима ограничен, имајући у виду да се ради о гломазном молекулу. Прекомерно нагомилавање гликогена у јетри уочено је код 80% пацијената оболелих од дијабетеса (Stone и Van Thiel, 1985). Уз то, код 40-70% дијабетичних пацијената долази до нагомилавања масти у јетри. Масноћа се у јетри складишти у форми триглицерида и може се јавити као последица повећаног транспорта масти у јетру, појачане синтезе масноће на нивоу јетре и услед смањене оксидације или уклањања масноће из јетре (Gavin и сар., 1999). Неалкохолни стеатохепатитис (енг. nonalcoholic steatohepatitis – NASH) је облик масне јетре где се услед нагомилавања масноћа јавља лобуларна инфламација и стеатонекроза (Bhatt и Smith, 2015). Дијабетес повећава ризик од појаве стеатохепатитиса, који може напредовати до фиброзе и цирозе јетре (Loomba и сар., 2012).

Спектар биохемијских промена на нивоу јетре које се дешавају током дијабетеса, сличне су променама типичним за болести јетре, почев од секреције измењених ензима јетре, па све до развоја хепатоцелуларног карцинома и терминалног отказивања јетре (Mavrogiannaki и Migdalis, 2013). Први и најзначајнији показатељи процене оштећења јетре су ниво аланин трансминазе (енг. alanine transaminase - ALT), аспартат трансминазе (енг. aspartate transaminase - AST), алкалне фосфатазе (енг. alkaline phosphatase - ALP) и γ -глутамил транспептидазе (енг. γ -glutamyltranspeptidase - GGT) (Nannipieri и сар., 2005).

Недостатак инсулина утиче на повећање синтезе хормонски осетљиве липазе у масном ткиву, што даље води до повећања липолизе и повећања циркулишућих слободних масних киселина које се напослетку нагомилавају у јетри. Ови процеси доводе до повећаног уноса липопротеина ниске густине и синтезе триглицерида (Mohamed и сар., 2016). У исто време, повишени глукагон спречава ослобађање триглицерида из јетре. Стога, нагомилавање масти у јетри дешава се услед

неравнотеже у узимању, синтези, ослобађању и оксидацији слободних масних киселина на нивоу јетре (Cohen и сар., 2011). Такође, повећан ниво адипоцитокина доприноси појави митохондријског оксидативног стреса и доводи до настанка слободних радикала и пероксизома. Повећање митохондријског оксидативног стреса изазива мутациона оштећења на нивоу молекула ДНК, а стварање ROS може бити окидач низа штетних ефеката на нивоу митохондријског респираторног ланца. Такав штетни циклус експоненцијално се појачава до нивоа на ком не може бити неутрализован нормалним физиолошким механизмима, због чега долази до појаве оштећења јетре (García-Correa и сар., 2009). Некротични хепатоцити, али и они под инфламацијом, ослобађају неколико типова хемијских медијатора који подстичу стелатне ћелије на производњу фактора раста везивног ткива и колагена, услед чега долази до нагомилавања ванћелијског матрикса тј. фаворизовања фиброзе (García-Correa и сар., 2009).

1.9. Узроци оштећења јетре у дијабетесу

1.9.1. Оксидативни стрес као узрок оштећења јетре

Стварање оксиданата, какав је O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot од стране активираних Купферових ћелија, сматра се пресудним за настанак оштећења јетре (Wei и сар., 2010). Купферове ћелије, познате и као макрофаги јетре, су једини тип непаренхимских ћелија које доприносе одржавању интегритета ћелија јетре. Међутим, ове фагоцитарне ћелије такође подлежу дејству оксидативног стреса који стварају суседне ћелије, али и сопственим имунским реакцијама (Robbins и сар., 2010). Прекомерна продукција ROS може проузроковати неповратне оксидативне модификације липида, протеина и угљених хидрата (Leung и Nieto, 2013).

1.9.1.1. Оксидација протеина

Оксидација протеина подразумева њихову ковалентну модификацију, насталу директним деловањем ROS или индиректном реакцијом споредних продуката оксидативног стреса (Shacter, 2000). Прекомерна производња слободних радикала доводи до унакрсних интеракција између различитих протеина, али и протеина и липида, што за последицу има промену структуре и функције протеина, услед њихове разградње или нарушавања аминокиселинске секвенце (Shacter, 2000). Штетне последице насталих промена укључују инхибицију ензиматске и везујуће функције протеина, повећану подложност агрегацији, резистенцију на протеолизу, повећан или снижен ћелијски унос и промењену имуногеност (Ahmed и сар., 2004; Shacter, 2000). Цистеин и метионин спадају у најосетљивије аминокиселине које могу бити модификоване од стране свих оксидирајућих врста (Shacter, 2000; Zuwała-Jagiello и сар., 2009). Будући да је управо цистеин код великог броја метаболичких ензима, киназа, фосфатаза и транскрипционих фактора кључна резидуа, следи да оксидативне модификације којима подлеже доводе до промена функционалних својстава и активности протеина (Shacter, 2000; Zuwała-Jagiello и сар., 2009). Истраживања су показала да су серумске концентрације оксидованих протеина јако повишене у случају дијабетеса (Witko-Sarsat и сар., 1998).

1.9.1.2. Оксидација масти

Липидна пероксидација је феномен који прати патогенезу многих обољења, укључујући и дијабетес (Nishigaki и сар., 1981). Липидна пероксидација погађа структуру липида и представља прву штетну последицу дејства ROS (Тoborek и сар., 1992). Полинезасићене слободне масне киселине, које улазе у састав мембранских фосфолипида, због својих вишеструких двоструких веза, изузетно су осетљиве на дејство слободних радикала (Nowak, 2013). Реакцијом липида и хидроксил радикала, сам молекул липида постаје радикал, који у присуству кисеоника прелази у пероксирадикал. Пероксирадикал, сам по себи јако реактиван, реагује ланчано са следећим молекулом липида, при чему настаје хидропероксид и нови липидни

радикал. Резултат ових реакција је настанак високо реактивних цитотоксичних липидних радикала који, услед своје блиске везе са другим липидима биомембрана, имају способност да ланчано стварају нове липидне пероксиде (Mylonas и Kouretas, 1999). На тај начин одвија се ланчана реакција липидне пероксидације. Настали хидропероксиди испољавају штетан ефекат на ћелије, како директним дејством, тако и кроз деградацију до високо токсичних хидроксил-радикала. Као крајњи продукти липидне пероксидације настају реактивни алдехиди, малондиалдехид (енг. malodialdehyde - MDA) и 4-хидроксиноненал, који имају цитотоксични и мутагени ефекат (Ayala и сар., 2014).

Оксидовани липиди утичу на ћелијску функцију јер се нагомилавају унутар ћелијске мембране, доводећи до њеног цурења и ремећења функције мембранских рецептора (Halliwell и Chirico, 1993), што може довести до инфламације и ћелијске некрозе (Sebeková и сар., 2002). Присуство липидне пероксидације, праћене повећаним нивоом липидних пероксида и MDA у плазми, серуму и ткивима дијабетичних пацијената, сматра се јасним показатељем размера оштећења на ткивном и ћелијском нивоу и једним од главних узрочника појаве атеросклерозе и других дијабетичних компликација (Shao и Heinecke, 2009).

Код пацијената са неалкохолном масном јетром, липидна пероксидација даје иницијални импулс за ослобађање инфламацијских медијатора као што је TNF- α , преко активације адипоцитокина и других сигналних путева. Овај штетни циклус доводи до активације стелатних ћелија и даље ка пролиферацији и синтези колагенозних супстанци које фаворизују фиброзу. Овај корак кључан је у свим процесима хроничног оштећења јетре (Moreira, 2007).

Повишен ниво липидне пероксидације представља везу између хипергликемије и оксидативног стреса током дијабетеса (Asmat и сар., 2016).

1.9.2. Инфламација као узрок оштећења јетре

Иако је инфламација првенствено користан процес који се активира како би се повратила нарушена хомеостаза ткива, у случајевима када је њен интензитет или трајање прекомерно, она доводи до оштећења. У дијабетесу, присуство хроничне инфламације ниског степена повећава ризик од развоја инсулинске резистенције, кардиоваскуларних компликација и проблема са бубрезима (Downs и Faulkner, 2015a). С обзиром на то да је главни извор циркулишућих цитокина и акутно-фазних протеина, јетра представља саставни део имунског система која доприноси контроли системске инфламације (Vode и сар., 2012) У дијабетесу, хронична хипергликемија ствара услове који промовишу повреду хепатоцита, а инфламација може повећати ризик од развоја обољења јетре попут цирозе, хепатитиса, карцинома и нелакохолне масне јетре (Logia и сар., 2013). Код пацијената и са ДТ1 и са ДТ2 показано је увећано присуство проинфламацијских цитокина у циркулацији, пре свега TNF- α , IL-1 β и IL-6 као и акутно-фазних протеина попут хаптоглобина, алфа-2 макроглобулина и других, који се примарно синтетишу у хепатоцитима. Познато је да TNF- α , у зависности од своје концентрације, може имати или заштитне или штетне ефекте. Ово је показано код акутне повреду јетре (Dong и сар., 2016), где његово повећано присуство покреће низ унутарћелијских догађаја који резултирају активацијом апоптозе, типа ћелијске смрти која се повећава код јетре дијабетичног пацова (Petrović и сар. 2017). Према Dasu и Jialal-(Dasu и Jialal, 2011), висок ниво глукозе током дијабетеса индукује инфламацију, праћену увећаном продукцијом цитокина, кроз увећану активност TLR рецептора и низводних сигналних путева који доводе до активирања NF- κ B транскрипционог регулатора, битног за индуцибилну транскрипцију гена за различите цитокине, акутно-фазне протеине и антиоксидативне ензиме. Здрава јетра садржи низак ниво различитих TLR, док у патолошким условима долази до увећања њиховог присуства. Повећан ниво TLR4 потврђен је код повреду јетре током делимичне хепатектомије као и исхемије, где је

укључен у уклањање ендотоксина, у производњу проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина, као и у стварање ROS (Schwabe и сар., 2006).

С обзиром на то да је инфламација један од главних етиолошких фактора у развоју и прогресији повреде ткива повезаних са дијабетесом, важно је истражити дијабетесом-индуковане сигналне путеве који одржавају инфламацијско окружење и идентификовати ендogene учеснике који би били погодни терапијски циљеви за контролу инфламације и њоме посредованих оштећења. Тим пре што се број оболелих од дијабетеса стално увећава, а са продужавањем дужине живота оболелих повећава се учесталост касних компликација дијабетеса.

2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Ендогени молекули могу имати важну улогу у појави и развоју компликација у многим хроничним обољењима укључујући и дијабетес. Један од ендогених протеина који последњих деценија посебно окупира пажњу истраживача, а чија је биологија слабо изучавана у дијабетесу је HMGB1. До сада је показано да се овај протеин, првенствено окарактерисан као протеин који се везује за ДНК и има улогу у одржавању хроматинске структуре и транскрипцији, у патолошким стањима може наћи и у ванћелијској средини, где се понаша као проинфламацијски цитокин и активатор имунског система. У ванћелијску средину HMGB1 доспева пасивно, ослобађањем из некротичних, оштећених и стресираних ћелија, или активном секрецијом из активираних имунских ћелија. Иако HMGB1 има кључну улогу у активацији имунског одговора и иницијацији репаративних механизма, његова прекомерна акумулација у циркулацији или ванћелијском простору ткива ремети хомеостазу и може довести до прогресије органских оштећења и болести.

Инсулин-зависни дијабетес типа 1 (ДТ1) је поремећај метаболизма глукозе кога карактерише хипоинсулинемија, изазвана деструкцијом бета-ћелија панкреаса, и хипергликемија. Јетра, као један од циљних органа деловања инсулина, заузима важно место у регулацији хомеостазе глукозе. Хипоинсулинемија и хипергликемија, главне карактеристике дијабетеса, узрокују појаву метаболичког и оксидативног стреса које прати стање хронично слабе инфламације, што заједно доприноси настанку и прогресији дегенеративних поремећаја и дисфункцији јетре. С обзиром на то да у условима оксидативног стреса хепатоцити из културе ћелија излучују HMGB1, за очекивати је да у дијабетесу, током одговора на стресогене сигнале и ћелијска оштећења, овај протеин може бити хронично секретован и из хепатоцита, те самим тим може представљати важан паракрини медијатор дисфункције јетре.

Ослобађању HMGB1 из стресираних ћелија претходи његова транслокација из једра у цитоплазму. Сматра се да овом преласку нарочито доприносе структурне

модификације, типа ацетилације и фосфорилације. Биолошке функције HMGB1 протеина зависе од његове ћелијске локализације, интерагујућих партнера и редокс стања. У условима оксидативног стреса овај редокс-сензитиван протеин подлеже оксидацији, као такав, посредством својих интеракција са рецептором TLR4, може покретати различите унутарћелијске сигналне путеве који воде продукцији проинфламацијских цитокина, инфламацији, апоптози или пролиферацији. На основу ових сазнања постављен је општи циљ ове докторске дисертације – истражити понашање HMGB1 протеина у ћелијама јетре пацова са експериментално изазваним ДТ1 и утврдити његов допринос у патолошким променама јетре у условима дијабетеса.

За остваривање општег циља постављени су појединачни циљеви, који подразумевају да се на модел систему ДТ1 изазваног инјектирањем једнократне дозе стрептозотоцина, у временском периоду са најизраженијим степеном оксидативног стреса, инфламације и структурних промена у јетри, код мужјака пацова соја Wistar, испитају:

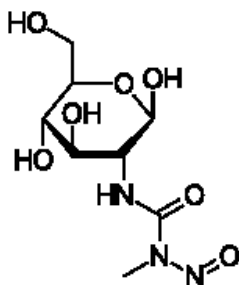
1. Субћелијско и ванћелијско присуство протеина HMGB1
2. Типови присутних структурних модификација
3. Интеракције HMGB1 протеина са TLR4 рецептором ћелија јетре
4. Допринос HMGB1/TLR4 осе у активацији проинфламацијских сигналних путева, као и продукцији проинфламацијских цитокина и акутно-фазних протеина.
5. Допринос HMGB1/TLR4 осе антиоксидативној одбрани кроз утицај на регулацију експресије антиоксидативних ензима.
6. Утицај HMGB1/TLR4 осе на регенеративни капацитет јетре деловањем на циклин D1/p21 пут.
7. Утицај смањења нивоа ванћелијског HMGB1 у јетри, третманом дијабетичних пацова антиоксидансом мелатонином или третманом инхибитором његове секреције - етил пируватом, на инфламацијски, оксидативни, регенеративни капацитет јетре и оштећења.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Коришћене хемијске супстанце

3.1.1. Стептозотозин

Дијабетес тип 1 (ДТ1) је изазиван третирањем животиња стрептозотозинском (Streptozotocin – STZ, MP Biomedicals llc). Стрептозотозин је растворан у свежем натријум-цитратном пуферу (0,01 M, pH 4,5) и одмах након растварања инједиран животињама, једнократно, интраперитонеално, у дози од 65 mg/kg телесне масе. Пацови су сматрани дијабетичним уколико им је ниво глукозе у крви био изнад 20 mmol/l 48 сати након инјектирања STZ.

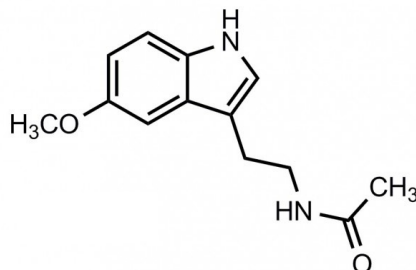


Слика 3.1. Хемијска структура стрептозотозина

STZ представља дериват нитрозоуреае. Будући да је токсичан за β ћелије панкреаса, користи се за добијање животињских модела дијабетеса. STZ улази у ћелију преко глукозног транспортера типа 2. Унутар ћелије се спонтано разлаже, при чему настаје реактивни метилкарбонијум јон који алкилује ДНК и доводи до нарушавања њене структуре. Такође, након третмана STZ јавља се повећана дефосфорилација АТР, што доводи до стварања реактивних врста. Као последица насталих дешавања долази до деструкције β ћелија панкреаса некрозом, хипоинсулинемије и хипергликемије (Lenzen, 2008).

3.1.2. Мелатонин

Третман мелатонином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) коришћен је у циљу смањења оксидативног стреса и њиме изазваног оштећења јетре код пацова са дијабетесом. Мелатонин (енг. N-acetyl-5-methoxytryptamine), хормон који лучи епифиза, осим своје примарне улоге у регулацији циркадијалног ритма, показује снажан антиоксидативни потенцијал. Има способност директног уклањања реактивних врста, штити ДНК и модификује активност прооксидативних и антиоксидативних ензима (Anwar и Meki, 2003).

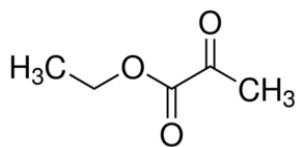


Слика 3.2. Хемијска структура мелатонина

У третману животиња коришћен је раствор мелатонина, припреман у 1% етанолу, на недељном нивоу. Из литературе је познато да се дневна примена мелатонина у дози од 0,2 mg/kg телесне масе показала као ефикасна у заштити пацова са дијабетесом од оксидативног стреса (Montilla и сар., 1998). Стога је у третману мелатонином коришћена ова доза, инјецирана интраперитонеално, једном дневно, у 9:00 часова. Третман је започет три дана пре инјецирања STZ и настављен је свакодневно, до краја експерименталног периода.

3.1.3. Етил пируват

Етил пируват, дериват пирогрођане киселине, познат је по свом антиинфламацијском деловању, између осталог и путем спречавања активног ослобађања протеина HMGB1 из ћелија (Kim и сар., 2016).



Слика 3.3. Хемијска структура етил пирувата

У циљу инхибиције активне секреције HMGB1 протеина, пацови су третирани етил пируватом раствараном у Рингеровом раствору који садржи Na (130 mmol/l), K (4 mmol/l), Ca (2,7 mmol/L) и Cl (139 mmol/L), у финалној запремини од 400 μ l. Етил пируват је инјектиран једном дневно, интраперитонеално, у дози од 80 mg/kg телесне масе, почев од десетог дана након индукције дијабетеса. Третман је настављен до краја испитиваног периода.

3.2. Експерименталне животиње, експерименталне групе и протокол

3.2.1. Експерименталне животиње

У експерименталном раду коришћени су мужјаци албино пацова соја Wistar, старости 2 месеца, масе 190-210 g, узгајани у гајилишту Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду. Животиње су гајене под контролисаним условима, на температури од 20 до 22°C и са дневно-ноћним ритмом од 12 сати. Све експерименталне процедуре које су спроведене на животињама у овој тези су одобрене од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (број одобрења: 02-15/10), у складу са прописаним етичким нормама (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, објављен од стране US National Institute of Health).

3.2.2. Експерименталне групе

Пацови којима је индукован дијабетес насумично су подељени у три групе које су жртвоване декапитовањем две (D2), четири (D4) и осам (D8) недеља након

инјектирања STZ. Након индукције дијабетеса, свакодневно је праћен број преживелих јединки, док је ниво глукозе у крви и телесна маса животиња мерена једном недељно, како код дијабетичних, тако и код контролних животиња. Број пацова по групи износио је 15.

Након што је показано да контролни пацови инјектирани физиолошким раствором, натријум-цитратним пуфером, 1% етанолом или Рингеровим раствором, не показују значајне разлике у погледу испитиваних параметара приказаних у тези, формирано је шест експерименталних група: (К) - контролна група третирана само физиолошким раствором, n=15; (D4) - дијабетична група, n=15; (К+М) - група контролних пацова третираних мелатонином, n=15; (D4+М) - група дијабетичних пацова третираних мелатонином, n=15; (К+ЕР) - група контролних пацова третираних етил-пируватом, n=10; (D4+ЕР) - група дијабетичних пацова третирана етил-пируватом, n=10.

3.2.3. Протокол

Контролни и третирани пацови су мерени и одређиван је ниво глукозе из узорка крви добијеног из репне вене пацова, коришћењем ручног глукометра (GlucoSure Plus, Apex Biotechnology Corp, Taiwan). Пацови су жртвовани декапитацијом, при чему је један део крви сакупљен у епрувету ради добијања серума. Сакупљена крв остављена је на собној температури да коагулише, а затим је центрифугирана на 4000 x g у трајању од 15 минута. Серум, добијен у виду супернатанта изнад талоба крвних ћелија, чуван је на -80°C ради даљих анализа. Други део крви сакупљан је у епрувете са антикоагулансом хепарином (1000 IU хепарина). Некоагулисана крв је центрифугирана на 4000 x g у трајању од 15 минута. Плазма, у виду супернатанта изнад талоба еритроцита, чувана је за даље анализе на -80°C. Узорци серума коришћени су за мерење концентрације инсулина, аланин- (AST), и аспартат- (ALT) аминотрансфераза, као и за анализу нивоа протеина HMGB1. Плазма је коришћена за мерење концентрација H_2O_2 , O_2^- и малондиалдехида.

Након брзе изолације, одмах по декапитацији, мерена је маса јетре. Затим је узиман део јетре ради даље припреме хистолошких препарата, комет есеја, укупних хомогената ткива и субћелијских фракција. Остатак ткива је замрзаван и чуван на -80°C .

3.3. Методе

3.3.1. Одређивање концентрације инсулина у серуму

Концентрација инсулина у серуму одређивана је ензимским имуноесејом (енг. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA), према приложеном упутству произвођача (Mercoxia Rat Insulin ELISA, Uppsala, Sweden). Процедура се заснива на директној сендвич техници у којој се користе два моноклонска антитела која су специфична за различите антигене детерминанте пацовског инсулинског молекула. За време инкубације, инсулин из тестираног узорка реагује са једне стране са анти-инсулинским антителом које је везано за дно бунарића у микротитар плочи, а са друге стране са анти-инсулинским антителом коњугованим са пероксидазом рена (енг. horseradish peroxidase – HRP) које се детектује реакцијом са 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМВ).

Током експеримента су на микротитар плоче обложене антителом на инсулин, додавана одговарајућа разблажења стандарда и испитивани узорци серума у трипликату. Преко њих је наливан раствор ензимског коњугата (пероксидазом коњуговано моноклонско анти-инсулин антитело). Након двочасовне инкубације на собној температури бунарићи су испирани пуфером за испирање пет пута. Након последњег, у бунариће је додаван супстрат и инкубиран 15 минута. Након прекидања реакције наливањем „стоп“ раствора, у ELISA читачу је мерена апсорбанца на 450 nm. На основу стандардне криве вредности стандарда, очитаване су вредности одговарајућих концентрација инсулина у испитиваним серумима, изражене у pmol/l.

3.3.2. Одређивање концентрације ALT и AST

Активности аминотрансфераза (ALT и AST) серума одређиване су коришћењем оптимизоване стандардне кинетичке методе IFCC (енг. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

Принцип методе заснива се на чињеници да у присуству AST, α -кетоглутарат реагује са L-аспартатом и формира L-глутамат и оксалоацетат, док у присуству ALT, α -кетоглутарат реагује са L-аланином и формира L-глутамат и пируват. Индикатор реакције користи оксалоацетат, односно пируват за кинетичко одређивање потрошње NADH (никотинамид аденин динуклеотид). Оксидација NADH се одређује праћењем смањења апсорбанце на 340/380 nm у времену које је пропорционално активностима AST, односно ALT у серуму. Добијене вредности за AST и ALT изражаване су у јединицама/литру (U/l).

3.3.3. Одређивање концентрације IL-6 и TNF- α у серуму

Концентрације IL-6 и TNF- α у серуму одређиване су ензимским имуноесејом (ELISA) према приложеном упутству произвођача (за IL-6 (R&D systems, Minneapolis, MN), за TNF- α (TNF alpha Rat ELISA Kit, Thermo Scientific)). Принцип методе ензимског имуноесеја за одређивање концентрација оба испитивана цитокина заснива се на директној сендвич техници у којој моноклонско антитело на одговарајући протеин, којим је обложено дно бунарића у микротитар плочи, везује IL-6, односно TNF- α из стандарда или узорка. За испитивани протеин се затим везује друго биотин-коњуговано антитело које ће везати стрептавидин-HRP, који након додавања супстрата за пероксидазу даје обојени продукт чија се апсорбанца мери на 450 nm и у директној је корелацији са количином одговарајућег протеина у серуму јетре пацова.

Сви раствори су припремани према упутствима произвођача, непосредно пред употребу и темперирани на собној температури. За одређивање концентрација IL-6 и TNF- α коришћене су микротитар плоче обложене одговарајућим антителом. У

одговарајуће бунариће микротитар плоча додавани су, по већ утврђеном редоследу, стандарди и испитивани узорци (серуми) у запремини од 100 μl , у трипликату. У бунариће је затим додаван раствор биотин коњугата (биотином коњуговано антитело на IL-6, односно TNF- α) и инкубирано два сата на собној температури. Након извршене инкубације сви бунарићи су испирани пет пута са по 300 μl пуфера за испирање. Након последњег испирања додавано је по 100 μl стрептавидин-HRP у сваки бунарић и инкубирано 15 минута. Реакција је заустављена додавањем 50 μl одговарајуће киселине, након чега је у ELISA читачу мерена апсорбанца на 450 nm. На основу апсорбанци стандарда формиране су стандардне криве за IL-6 и TNF- α , са којих су читаване вредности одговарајућих концентрација IL-6, односно TNF- α у испитиваним серумима и изражене у pg/ml.

3.3.4. Одређивање концентрације супероксид анјона, водоник пероксида и малондиалдехида

3.3.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјона

Супероксид анјон радикал у плазми детектован је спектрофотометријском методом по Auclair и Voisin (Auclair и Voisin, 1985), која се заснива на редукцији нитро плаво тетразолијума (енг. nitroblue tetrazolium – NBT) од стране супероксид анјон радикала, који том приликом формира тамни несолубилни преципитат диформаза. У кварцну кивету за анализу додавана је реакциона смеша која садржи 1 mM NBT (раствореног у 0,05M фосфатном пуферу pH 8,6 са 0,1 mM EDTA) и 0,1 mg/ml желатина који формазан одржава у раствору. Редукција NBT која започиње додавањем 50 μl плазме бележена је спектрофотометријски као промена апсорбанце на 550 nm током пет минута. Прерачунавање је вршено тако што је од промене апсорбанце узорка одузимања промена апсорбанце следеће пробе, разлика је дељена корекционим фактором (0,015) и запремином плазме (0,05 ml), а затим је добијена вредност дељена са 1000 дајући резултат у nmol NBT/ml плазме.

3.3.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида

Концентрација водоник пероксида (H_2O_2) у плазми одређивана је спектрофотометријском методом по Pick и Kiesari (1980). Заснива се на оксидацији фенол црвеног са H_2O_2 у присуству пероксидазе рена као катализатора. У 0,1 ml узорка додаван је 1 ml раствор фенол црвеног (140 mM NaCl, 10 mM калијум-фосфатног пуфера, pH 7.0, 5.5 mM декстрозе, 0.1 g/l фенол црвеног, 8.5 U/ml (50 μ l/ml) пероксидазе рена). Смеша је мешана на Vortex-мешалици и инкубирана 10 минута на собној температури. Након истека овог времена реакција је заустављена додавањем 1 N NaOH, док pH садржаја у епруветама није подешена на 12,5. Апсорбанце узорка су мерене спектрофотометријски на 610 nm. Концентрације H_2O_2 су читаване са одговарајуће стандардне криве за H_2O_2 и изражаване у nmol/ml плазме.

3.3.4.3. Одређивање концентрације малондиалдехида (MDA)

Интензитет липидне пероксидације одређиван је у узорцима плазме и укупних хомогената по методи Ohkawa и сарадника (Ohkawa и сар., 1979). Принцип методе је базиран на спектрофотометријском одређивању производа липидне пероксидације, малондиалдехида (MDA) и тиобарбитурне киселине у киселој средини на 532 nm.

За мерење малондиалдехида у плазми у 250 μ l плазме додавано је 125 μ l трихлор-сирћетне киселине (28% TCA у води), вортексовано, а затим центрифугирано 10 минута на 3000 x g. Након центрифугирања, супернатант (200 μ l) је пребациван у чисту епендорф епрувету и додавано је 50 μ l тиобарбитурне киселине (1% TBA у 0.05N NaOH), вортексовано, а затим инкубирано 15 минута на 95°C.

За мерење малондиалдехида у ткиву, 10% хомогенату ткива јетре припремљеном у 1,15% раствору KCl (0,1 ml) додаје се 8,1% SDS (0,2 ml), 20% CH_3COOH , pH 3,5 (1,5 ml), 0,8% водени раствор TBA (1,5 ml) и 0,7 ml dH_2O . Смеша је инкубирана на 95°C један сат, а затим охлађена на собну температуру. Охлађеној

смеси додаје се 5 ml n-бутанола и пиридина (15:1, v/v) и 1 ml dH₂O, уз јако мешање. Узорци се центрифугирају 15 минута на 3000 x g, при чему се стварају два слоја.

Концентрација тиобарбитурне киселине – реагујуће супстанце (енг. thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) мери се у обојеном слоју на таласној дужини 532 nm. Као стандард употребљава се тетраметоксипропан (малоналдеhid тетрамeтил ацетал). Вредности концентрација малондиалдехида у испитиваним узорцима плазме изражаване су у nmol/ml, а у хомогенатима ткива у nmol/mg протеина.

3.3.5. Одређивање ДНК оштећења у јетри пацова методом комет есеја (енг. SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis)

Степен оштећења ДНК у ћелијама јетре одређиван је алкалним комет есејом по методи (Singh и сар., 1988). У комет анализи коришћене су ћелије јетре добијене уситњавањем ткива у хладном HBSS пуферу (0,14 g/l CaCl₂, 0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgCl₂×6H₂O, 0,1 g/l MgSO₄×7H₂O, 8,0 g/l NaCl, 0,35 g/l NaHCO₃, 0,09 g/l Na₂HPO₄×7H₂O, 1,0 g/l D-глукозе) који је садржавао 20 mM EDTA и 10% DMSO (диметилсулфоксид). Јетра је сечена најпре на крупне комаде. Након слегања исечених комада, пуфер у коме је ткиво сечено је уклоњен. На исечено ткиво је затим додат свеж пуфер и цео поступак је поновљен. У следећем кораку јетра је уситњена на fine комадиће и из суспензије је узимано 10 µl по узорку. Сваки узорак ћелијске суспензије мешан је са 75 µl 1% LMPA (енг. low melting point agarose – LMPA) и претемперан на 42°C. Равномерним накапавањем узорци су разливани на претходно припремљене микроскопске плочице. Припрема плочице подразумева прекривање плочице 1,5% агарозом која након сушења формира танак слој на који се наноси узорак. Агарозе су прављене у PBS пуферу (20mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 70mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7,4). Након наношења узорка раствореног у LMPA на микроскопску плочицу, поставља се покровно стакло и препарат се инкубира 10 минута како би се агароза стегла. Затим се покровно стакло уклања и наноси се још један слој 1% LMPA, који се као и у претходном кораку покрива покровним стаклом.

Након стежања агарозе поново се уклања покровно стакло. Микроскопске плочице се затим смештају у хладан пуфер за лизу. (2,5 М NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH пуфера 10,0) током два сата на 4°C. Након лизирања, микроскопске плочице су потапане у пуфер за електрофорезу (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH пуфера 13,0) током 30 минута на 4°C. У овом кораку одвија се денатурација ДНК на базном pH. Плочице су даље смештане у систем за електрофорезу, која је трајала 30 минута при напону од 0,01 kV и јачини струје од 139 mA. По завршеној електрофорези, плочице су испране три пута по пет минута у пуферу за неутрализацију (0,4 Tris-HCl pH 7,4) и обележене бојом за нуклеинске киселине SYBR GREEN I (Sigma Aldrich, S 9430). Комете су визуализоване и фотографисане помоћу флуоресцентног микроскопа Leica DMLB (увећање 40x) који је повезан са CCD камером.

Комете су класификоване визуелном методом у пет категорија: 0, 1, 2, 3 и 4. Категорија 0 обухвата ћелије без оштећења, категорије 1, 2 и 3 обухватају ћелије са кратком, средњом и дугачком миграцијом ДНК, док категорији 4 припадају ћелије са веома великим оштећењима (мала глава и дугачак реп комете). Квантификација параметара комета вршена је употребом компјутерског програма TriTekCometScore™ Freeware v1.5. Приказан је параметар „олив“ момент (производ процента укупне ДНК у репу и растојања између центара масе главе и репних регија комете). Све вредности изражене су арбитрарним јединицама.

3.3.6. Мерење активности ензима антиоксидативне заштите у јетри

Активност антиоксидативних ензима у јетри мерена је коришћењем 10% хомогената свеже јетре, припремљеном у сукрозном пуферу (250 mM сукрозе, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) и центрифугираном на 100000 x g, током 90 минута, на 4°C. Добијени супернатанти чувани су за следеће анализе на -80°C.

3.3.6.1. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност CAT је одређена по методи Beutler (Beutler, 1982). Метода се заснива на мерењу степена деградације H_2O_2 активношћу каталазе присутне у узорку. Реакција се одигравала у инкубационој смеши која је укључивала ТЕ пуфер pH 8.0 (1M TRIS -HCl pH 8,0, 5mM EDTA), хомогенат јетре и 10 mM H_2O_2 .

У стаклену кивету сипано је 1,5 ml подешеног раствора H_2O_2 у ТЕ пуферу и узорак (5-10 μ l). Реакција је започињала додавањем узорка у пуфер, а пад апсорбанце је праћен спектрофотометријски на 230 nm, током три минута, на температури од 25°C. Како би било избегнуто стварање мехурића услед ослобађања кисеоника током реакције, неопходно је да концентрација H_2O_2 износи тачно 10 mM. Концентрација H_2O_2 одређивана је мерењем апсорбанце 0,9 ml 1 M ТЕ пуфера, pH 7,0 (разблажен дестилованом водом у односу 1:10) и на тај начин добијена је апсорбанца A1. У следећем кораку је додавано 0,1 ml 30% H_2O_2 (разблажен дестилованом водом у односу 1:100) и мерена је апсорбанца A2. Вредност милимоларног екстинкционог коефицијента за водоник пероксид на 230 nm износи 0,071, док је концентрација разблаженог водоник пероксида $c=141$ mmol (A2-A1). Раствор H_2O_2 , концентрације 10 mmol, добијан је разблаживањем водоник пероксида дестилованом водом у односу $c/10$. Активност CAT изражавана је у јединицама по милиграму протеина (U/mg протеина). Јединица активности каталазе дефинисана је као број милимолова H_2O_2 редукованих у минуту (mmol H_2O_2 /min).

3.3.6.2. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Активност ензима супероксид дисмутазе (SOD) одређивана је епинефринском методом (Misra и Fridovich, 1972). Метода је заснована на способности SOD, присутног у узорку раствореном у 50 mM натријум-карбонатном пуферу pH 10,2, да инхибира аутооксидацију епинефрина. Смањење брзине аутооксидације адреналина, зависне од супероксид анјон радикала кога уклања SOD, праћена је спектрофотометријски. У стаклену кивету за читавање додавано је 3 ml натријум-карбонатног пуфера, узорак и количина подешеног раствора адреналина. Промена

апсорбанце праћена је спектрофотометријски на 480 nm, на температури од 25°C, током 10 минута. Очитавање је вршено на сваки минут. За израчунавање вредности SOD коришћена је вредност промене апсорбанце узорка према слепој проби (3 ml натријум-карбонатног пуфера + количина епинефрина чија је промена апсорбанце у опсегу од 0,020 до 0,022). Јединица активности SOD дефинише се као количина ензима која изазива 50% инхибиције аутооксидације епинефрина у линеарном делу промене апсорбанце. Активности SOD за ткиво јетре представљају укупну активност супероксид дисмутазе, коју чине CuZnSOD и MnSOD. Активност је изражавана у јединицама по милиграму протеина (U/mg протеина).

3.3.6.3. Одређивање активности глутатион-S-трансферазе

Активност ензима глутатион-S-трансферазе (GST) одређивана је спектрофотометријски, по методи коју су описали Habig и сарадници (Habig и сар., 1974). Метода је базирана на реакцији 1-хлоро-2,4-динитробензена (CDNB) са сулфхидрилном (-SH) групом редукованог глутатиона (GSH) која је катализована GST, присутном у узорку. Реакциона смеша садржала је 0,5 М фосфатни пуфер рН 6,5 (KH₂PO₄ и K₂HPO₄), 30 mM CDNB у дестилованој води, прво је инкубирана на 37°C, током 5 минута. Реакција је започета додавањем хомогената јетре и 20 mM GSH.

У кварцну кивету за очитавање додавано је 1,5 ml дестиловане воде, 0,1 ml CDNB, 0,6 ml фосфатног пуфера и 0,3 ml GSH. Реакција је започињала додавањем хомогената јетре и GSH. Праћење промене апсорбанце праћено је спектрофотометријски према слепој проби (сви раствори као за анализу, осим узорка) на таласној дужини од 340 nm, на температури од 25°C, сваких 30 секунди, током три минута. Активност GST у ткиву јетре изражена је у наномолима GSH утрошеним у минуту на mg протеина (nmol GSH/мин/mg протеина = U/mg протеина).

3.3.7. Припрема укупног хомогената јетре

Према методи Choi и Waxman (Choi и Waxman, 1999), ткиво јетре (200 mg) хомогенизовано је у стакленом хомогенизеру на леду у 0,6 ml охлађеног пуфера који је садржао 10 mM Tris-HCl pH=7,6, 1 mM EDTA, 250 mM сахарозу, протеазне и фосфатазне инхибиторе (5 mg/ml апротинина, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml леупептина). Хомогенат је центрифугиран 20 минута на брзини од 3000 x g у Eppendorf 5415 R центрифуги, на 4°C. Супернатант који представља укупни протеински екстракт пребачен је у нову епрувету, аликвотиран је, а затим чуван на -80°C за даље коришћење.

3.3.8. Изолација субћелијских протеинских фракција

За изолацију субћелијских фракција протеина коришћен је Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues (Thermo Scientific, САД). Процедура изолације рађена је према упутствима произвођача. 200 mg ткива јетре нежно је испрано у ледено хладном PBS. Након уклањања вишка течности, ткиво је уситњено на комадиће, а затим пребачено у претходно охлађени хомогенизер. Хомогенизација је вршена у 10-20 завеслаја у ледено хладном цитоплазматском екстракционом пуферу (енг. cytoplasmic extraction buffer – СЕВ), коме је претходно додат коктел протеазних и фосфатазних инхибитора (5 mg/ml апротинина, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml леупептина).

Поступак субћелијског фракционисања протеина

Цедиљка (саставни део кита) је стављена у коничну епрувету запремине 15 ml која се налазила на леду. Након пребацивања претходно припремљеног хомогената ткива у епрувету са цедиљком, вршено је центрифугирање на 500 x g у трајању од пет минута. Добијени супернатант (цитоплазматска фракција) затим је пребачена у чисту, претходно охлађену епрувету на леду. У преостали талог је након тога сипан ледено хладни мембрански екстракциони пуфер (енг. membrane extraction buffer – МЕВ), коме су претходно додати протеазни инхибитори. Након вортексовања смеше

у трајању од пет секунди на највећој брзини, вршена је инкубација уз благо мућкање, током десет минута, на 4°C. После поновног центрифугирања у трајању од пет минута на 3000 x g, добијени супернатант (мембранска фракција) пребачен је у чисту, претходно охлађену епрувету на леду. У преостали талог сипан је ледено хладни једарни екстракциони пуфер (енг. nuclear extraction buffer – NEB), коме су претходно додати протеазни инхибитори. Следило је вортексовање смеше од петнаест секунди на највећој брзини, затим инкубација од тридесет минута на 4°C, уз благо мућкање. Након центрифугирања у трајању од пет минута на 5000 x g, супернатант (солубилна једарна фракција) је пребачен у чисту, претходно охлађену епрувету на леду. У преостали талог је затим додаван хроматин-везујући екстракциони пуфер који је добијен додавањем 5 µl 100 mM CaCl₂ и 3 µl микрококалне нуклеазе (300 јединица) у 100 µl NEB пуфера. Након вортексовања смеше на највећој брзини, петнаест секунди, епрувета са садржајем је инкубирана тридесет минута на собној температури. Овај корак праћен је вортексовањем, а затим и центрифугирањем на 16000 x g, у трајању од пет минута. Добити супернатант представља хроматин-везујућу фракцију. Изоловане фракције су чуване на -80°C за даље анализе.

3.3.9. Изолација солубилне једарне протеинске фракције

Солубилни једарни протеини хепатоцита пацова изоловани су по методи Gorskog и сарадника. (Gorski и сар., 1986). Метода је заснована на изолацији једара у пуферу са ниском концентрацијом соли и високом концентрацијом сахарозе и глицерола. У пуферу оваквог састава, једра су једине структуре које се таложе током тридесетоминутног центрифугирања. У циљу спречавања деловања ендогених нуклеаза током изолације, двовалентни катјони се уклањају помоћу EDTA и замењују полиамином спермидином. Овај поступак спречава деловање ендогених нуклеаза на хроматин, чије је одржавање у ненарушеном стању важно за његово потпуно уклањање у каснијем кораку изолације.

Након вађења, јетра је хомогенизована на леду у пуферу за хомогенизацију (10 mM Нерес pH 7,6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1 mM спермидина, 1 mM фенилметилсулфонилфлуорида (PMSF), 1 mM дитиотритола (DTT), 10% глицерола, 2 М сахароза). После провлачења кроз двоструки слој стерилне газе, хомогенат је наслојен на јастуче од пуфера за хомогенизацију. Након центрифугирања у трајању од тридесет минута на 72000 x g на 4°C (Beckman Coulter L7-55, ротор SW 28, Швајцарска), талог добијених једара је ресуспендован у смеси пуфера за хомогенизацију и глицерола (у односу 9:1, v/v). После благог хомогенизовања хомогенат је наслојен на јастуче и поново центрифугиран (rotor SW 28, 72000 x g, тридесет минута, на 4°C). Једра су затим лизирана хомогенизовањем у свеже припремљеном лизирајућем пуферу (10 mM Нерес pH 7,6, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10% глицерол). У циљу уклањања хроматина, у суспензију је, уз стално мешање, укапаван раствор 4 М амонијум-сулфата (NH₄)₂SO₄ до финалне концентрације од 0,36 М. Хроматин је обаран током једночасовног центрифугирања вискозног лизата на 82000 x g на 4°C у ротору Ti-50. У одвојен супернатант је додаван чврст амонијум-сулфат до финалне концентрације од 0,3 g/ml. Након растварања амонијум-сулфата, у циљу исољавања протеина вршена је инкубација на леду у трајању од 20-30 минута. Једарни протеини су оборени центрифугирањем (82000 x g, 30 минута, 4°C, Ti-50) и добијени талог је растваран у пуферу за дијализу (25 mM Нерес pH 7,6, 40 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM EDTA, 10% глицерол) и дијализиран је преко ноћи наспрам пуфера истог састава. Дијализирани узорак је центрифугиран (микрофуга MLW TH12, 9300 x g, пет минута, 4°C). Супернатант је аликвотиран и чуван на -80°C до употребе.

3.3.10. Одређивање концентрације протеина

Концентрације протеина одређиване су методом Lowry и сарадника (Lowry и сар., 1951). Узорак протеина запремине 5–10 µl разблажен је водом до финалне запремине од 200 µl и помешан са 1 ml свеже припремљеног раствора који садржи 1 ml 1% CuSO₄, 1 ml 2% K-Na-тартарата и 98 ml 2% Na₂CO₃ у 0,1 N NaOH. Смеша је

промешана и инкубирана петнаест минута на собној температури, после чега је узорцима додат Фолинов реагенс разблажен у односу 1:2 (v/v). Након тридесет минута инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца узорака на 720 nm, наспрам „слепе“ пробе на спектрофотометру (Shimatzu UV-160, Јапан). Концентрације протеина очитаване су са стандардне праве (A720) у функцији концентрације протеина, добијене одређивањем апсорбанце стандардних концентрација серумског албумина говечета.

3.3.11. Електрофоретске технике за раздвајање протеина

3.3.11.1. Електрофоретско раздвајање протеина под денатуришућим условима – Глицинска SDS-PAGE

За раздвајање и карактеризацију протеина према молекулским масама, коришћена је техника једнодимензионалне електрофорезе у полиакриламидном гелу у присуству натријум-додецилсулфата и глицина (глицинска SDS-PAGE). Ову методу поставио је Laemmli 1970. године (Laemmli, 1970).

Електрофореза је вршена у Bio-Rad систему (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165-2940). За раздвајање протеина коришћен је 12% полиакриламидни гел, 0,375 М Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% амонијум-персулфат (AMPS) и 0,1% TEMED (тетраметилендиамин). Након полимеризације, на гел за раздвајање протеина наливан је 4% гел за сконцентрисавање узорака, 0,125 М Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% AMPS и 0,1% TEMED. Као електродни пуфер коришћен је Трис-глицински пуфер, 0,192 М глицин, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, и 0,1% SDS (Laemmli, 1970). Протеини су растварани у пуферу за узорке који садржи 2% SDS, 0,0625 М Tris-HCl, pH 6,8, 5% β -меркаптоетанол (β -ME) и 8,8% глицерол. У пуферу за узорке протеини су денатурисани загревањем у трајању од три минута на 95°C. Кроз гел за сконцентрисавање електрофореза је текла при напону од 0,12 kV, а кроз гел за раздвајање на 0,15 kV. Као индикаторска боја употребљаван је 0,1% раствор

бромфенол плавог у пуферу за узорке. По завршетку електрофорезе, гелови су бојени Комаси (енг. Coomassie) плавим или су коришћени за пренос електрофоретски раздвојених протеина на мембране.

3.3.11.2. Дводимензионална електрофореза протеина на полиакриламидном гелу

Дводимензионална гел електрофореза је комбинација изоелектрофокусирања (ИЕФ) и SDS-PAGE вертикалне електрофорезе (O'Farrell, 1975). Поступак подразумева електрофоретско раздвајање протеина у две димензије, најпре на рН градијенту на основу изоелектричних тачака – изоелектрофокусирање (прва димензија), а затим на полиакриламидном гелу у присуству SDS-а по молекулским масама (друга димензија).

За раздвајање протеина у првој димензији под дејством електричног поља, коришћени су комерцијални гелови у облику трака са имобилисаним рН градијентом 3-10 (DryStrip рН 3-10 NL Amersham/LIFE Sciences GE Healthcare). У првом кораку вршена је рехидратација трака. Смеша за рехидратацију, финалне запремине 125 μ l за појединачну траку, садржала је пуфер за рехидратацију (4% CHAPS, 8М уреа), протеински узорак који се анализира (30 μ g), као и 40 mM DTT, 2% IPG пуфера и 0,002% бромфенол плавог (BPB), који су додавани пред употребу. Инкубација трака у пуферу за рехидратацију вршена је у трајању од двадесет сати. Рехидратисане трачице постављане су затим у апарат за изоелектрофокусирање (Ettan™ IPGphor™ 3 Isoelectric Focusing System, GE Healthcare). Након изоелектрофокусирања, следио је корак еквилибрације који представља припрему трака за дводимензиону електрофорезу. Еквилибрација је најпре вршена инкубацијом трака у DTT пуферу за еквилибрацију (6М уреа, 2% SDS, 75 mM Tris-HCl рН 8,8, 29,3% глицерол, 1% DTT) у трајању од петнаест минута, а затим још петнаест минута у IAA пуферу за еквилибрацију (6М уреа, 2% SDS, 75 mM Tris-HCl рН 8,8, 29,3% глицерол, 4% IAA). Након еквилибрације, трака са протеинима узорка, раздвојеним према изоелектричној тачки, смештана је у апарат за електрофорезу (Mini-PROTEAN II,

Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165-2940), у циљу раздвајања протеина и према молекулској маси. За раздвајање протеина коришћен је 12% полиакриламидни гел, по процедури описаној у поглављу 3.3.11.1. По завршетку електрофорезе, гелови су бојени Commassie плавим или су преношени на мембране.

3.3.11.3. Бојење протеина на полиакриламидном гелу сребром

Методe бојења протеина солима сребра, након електрофоретског раздвајања SDS-PAGE, базирају се на редукцији јона сребра везаних за бочне ланце аминокиселина у метално сребро. Бојење протеина сребром пружа могућност детекције 0,1–1,0 ng протеина.

Бојење протеина сребром рађено је по модификованој методи Henkenshovena и Dernicka (Heukeshoven и Dernick, 1985). По завршетку SDS-PAGE гел је потапан у фиксатив (10% глацијална сирћетна киселина/30% етанол) у коме је инкубиран најмање 180 минута. Након тога гел је испиран најпре 10% етанолом (2x10 минута), а затим дестилованом водом (3x10 минута). Пре бојења сребром извршена је сензитивизација гела Фармеровим редуцером (0,15% калијум ферицијанид, 0,5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05% Na_2CO_3) у трајању од 10 секунди, након чега је гел испиран водом (3x10 минута). Бојење гела вршено је током 60 минута у 0,1% раствору сребро нитрата. Након кратког испирања водом развијана је боја редукцијом везаног сребра у развијачу (2,5% Na_2CO_3 анх./0,02% формалдехид). Реакција је заустављена потапањем гела у 1% раствор сирћетне киселине. Након 5 минута гелови су испирани водом (3x10 минута) у којој су чувани на +4°C.

3.3.12. Пренос протеина на мембрану

Након раздвајања на SDS-PAGE, протеини су пренети на одговарајуће мембране под утицајем електричне струје по методи Burnettea (Burnette, 1981). Коришћене су PVDF мембране (енг. polyvinylidene difluoride, Hybond-P, RPN303F, Amersham Pharmacia Biotech,), које су оптимизоване за пренос протеина. Пренос

протеина вршен је у мини апарату за трансфер (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Након електрофорезе, гел и мембрана су инкубирани тридесет минута у хладном пуферу за трансфер (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM глицин, 20% метанол). Гел и мембрана су затим положени у сендвич од филтер папира (Whatman 3MM) и сунђера и постављени у апарат за трансфер. Под утицајем константне струје пренос је ишао преко ноћи на 0,03 kV и 40 mA. По завршеном трансферу мембрана је обојена бојом Ponceau-S (1% Ponceau-S у 5% сирћетној киселини), а гел Coomassie плавим ради провере исправности тока трансфера и електрофорезе. Мембране су даље коришћене за имуноблот анализу.

3.3.13. Имуноблот анализа протеина

Имунолошка детекција протеина рађена је по модификованој методи Towbin и сарадника (Towbin и сар., 1979). Мембране са пренетим протеинима најпре су испиране два до три пута, у трајању од десет минута, у 0,2 % раствору Tween 20 у TBS пуферу (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl), скраћено TBS-T. Након испирања, протеини на мембрани су блокирани четрдесетпетоминутним инкубирањем у 5% немасном млеку раствореном у TBS-T пуферу, на собној температури, уз лагано мућкање. Мембране су затим испране са три брзе измене пуфера и три пута по 15-5-5 минута у TBS-T пуферу. Након тога мембране су инкубирани са примарним антителом разблаженим у одговарајућем односу са 3% млеком/серумом говечета, раствореном у TBS-T пуферу, 90 минута на собној температури уз лагано мућкање. По завршеној инкубацији, мембране су испране са три брзе измене пуфера и три пута по 15-5-5 минута у TBS-T пуферу. Затим су инкубирани са секундарним антителом које је коњуговано пероксидазом рена у одговарајућем разблажењу, у раствору 3% млека у TBS-T, 60 минута на собној температури уз лагано мућкање. Након једносатне инкубације, невезана секундарна антитела су одстрањена испирањем, пет пута по пет минута у раствору TBS-T. Након тога, рађена је визуализација награђених комплекса антиген-антитело, бојењем

мембране луминол реагентом (Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, sc-2048, САД) и стављањем под филмове (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN3103K, САД) према упутствима произвођача. Квантификација протеина је урађена у програму (Phoretix v1.1) и изражена релативним јединицама.

Табела 3.1. Подаци о примарним антителима коришћеним у имуноблот анализи

Антиген	Молекулска маса (кДа)	Порекло	Произвођач	Разблажење
HMGB1	29	зечје	Abcam	1:1000
HMGB1	29	мишје	Cell Signaling	1:3000
CAT	60	зечје	Abcam	1:1000
CuZnSOD	19	козје	Santa Cruz	1:750
MnSOD	25	зечје	Santa Cruz	1:1000
TNF- α	26	мишје	Abcam	1:200
IL-6	25	козје	Santa Cruz	1:400
Ацетил-лизин		зечје	Cell Signaling	1:1000
TLR4	95	зечје	Abcam	1:500
p38	38	зечје	Santa Cruz	1:1000
p-p38	38	зечје	Santa Cruz	1:750
ERK1/2	44,42	зечје	Santa Cruz	1:1250
p-ERK 1/2	44,42	козје	Santa Cruz	1:750
JNK	46,54	мишје	Abcam	1:1000
p-JNK	46	козје	Santa Cruz	1:750
NF κ B p65	65	зечје	Cell Signaling	1:1000
p- NF κ B p65	65	зечје	Santa Cruz	1:750
JAK1	130	зечје	Santa Cruz	1:1000
p-JAK1	130	козје	Santa Cruz	1:1000
STAT3	91,86	зечје	Cell Signaling	1:2000
p-STAT3	91,86	зечје	Cell Signaling	1:1000
HO-1	32	козје	Santa Cruz	1:5000
Nrf2	60	зечје	Abcam	1:400
Hp- β	45	зечје	Abcam	1:8000
p53	53	зечје	Abcam	1:1000
p21	21	зечје	Santa Cruz	1:1000
Циклин D1	36	зечје	Santa Cruz	1:100
β -актин	40	зечје	Abcam	1:1000
Ламин В	68	козје	Santa Cruz	1:1000

3.3.14. Ко-имунопреципитација протеина

Имунопреципитација се користи за изучавање биохемијских особина и посттранслационих модификација протеина, као и протеин-протеин интеракција. Метода је заснована на интеракцији жељеног протеина са одговарајућим антителом што омогућава издвајање протеина из протеинске фракције или ћелијског лизата. Настали комплекс између протеина и антитела издваја се помоћу специфичног, несолубилног протеина који има способност везивања антитела, означеног као Протеин А, односно Протеин Г. Протеини А и Г конјуговани су са несолубилним матриksom, агарозом или сефарозом. Центрифугирањем се добија талог у ком се налази комплекс антиген-антитело-Протеин А/Г. Из талоба се антиген ослобађа кувањем у пуферу са SDS. Наредним центрифугирањем издваја се супернатант са имунопреципитованим протеином, као и протеинима који се налазе у интеракцији са њим. Даље се може приступити раздвајању протеина SDS-PAGE методом и пратећој имуноблот анализи.

Имунопреципитација рађена је по условима описаним код Ускоковић и сарадника (Uskoković и сар., 2012). Протеински узорак хомогената (200 µg) инкубиран је са 2 µg примарног мишјег анти-НМGB1 антитела у хладном пуферу за имунопреципитацију (10 mM Tris HCl, pH 7,6, 4 mM EDTA, 10% глицерол, 50 mM NaCl) у који су додати инхибитори протеаза и фосфатаза (5 mg/ml аprotинина, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml леупептина), у финалној запремини од 800 µl. Инкубација са антителом је извођена преко ноћи на 4°C. На комплетну смешу после инкубације је додато 50 µl испраних агарозних куглица, куплованих са протеином А/Г. Инкубација је настављена један сат на 4°C на ротирајућој платформи. Након инкубације узорак је центрифугиран на 9300 x g, један минут, на 4°C. Супернатант је пажљиво одливен, а талог куглица испиран пет пута са 500 µl охлађеног пуфера за имунопреципитацију. После последњег испирања супернатант је пажљиво уклоњен, а на талог је додато 50 µl пуфера за узорке (2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% β-меркаптоетанол, 8,8%

глицерол). Талог је вортексован и загреван на 100°C, десет минута. Након загревања узорак је центрифугиран на 9300 x g, пет минута на собној температури. Добијени супернатант је пребачен у нову мини епрувету. Након овакве припреме узорак је био спреман за наношење на гел и за електрофоретско раздвајање.

3.3.15. Изолација гликопротеина

У циљу изолације гликопротеина из комплексне протеинске смеше ткивних хомогената јетре, коришћен је Glycoprotein Isolation Kit, WGA кит (Thermo Scientific, САД). Овај кит омогућава изоловање гликопротеина из комплексних протеинских смеша помоћу аглутинина, лектина пшеничне клице (WGA), имобилизованог на агарози. Лектини су протеини који имају селективни афинитет за угљене хидрате. WGA лектин високим афинитетом везује N-ацетил глукозамин (енг. N-acetyl glucosamine – GlcNAC) и GlcNAC терминалне структуре, најчешће присутне међу серумским и мембранским гликопротеинима.

Поступак је спроведен према упутствима произвођача. Први корак, припрема узорака, подразумевала је разблаживање 1,5 mg протеина, цитоплазматске и једарне фракције ћелија јетре, у пуферу за везивање/испирање, у односу 4:1 (v/v). Затим је припремана свака колона додавањем 200 µl 50% хомогене суспензије WGA лектина. Након корака испирања лектина пуфером за везивање/испирање, на припремљену колону наношен је узорак. Инкубација узорка на лектинској колони трајала је десет минута на собној температури, уз мешање на ротационој платформи. Даље је вршено центрифугирање у трајању од једног минута на 1000 x g, како би се одбацио невезани део узорка, а затим и два испирања коришћењем пуфера за везивање/испирање. Уследиле су две инкубације узорка у лектинској колони, у пуферу за везивање/испирање, које су трајале по пет минута, на собној температури, уз мешање, између којих је вршено испирање. Након центрифугирања, у циљу одбацивања невезаних протеина, на лектинску смолу са везаним протеинима наношено 200 µl пуфера за елуцију. Инкубација у пуферу за елуцију трајала је десет минута, на собној температури, уз мешање на ротационој платформи. По инкубацији,

вршено је центрифугирање, током ког је прикупљан елуат богат гликопротеинима. Претходна два корака су поновљена још једанпут. Добијени елуати гликопротеина чувани су на -80°C до употребе.

3.3.16. Изолација фосфопротеина

За изолацију фосфопротеина из ткива јетре пацова коришћен је кит PhosphoProtein Purification Kit, QIAGEN. Кит омогућава изолацију фосфорилисаних протеина, независно од врсте аминокиселине која је носилац фосфатне групе.

Први корак подразумевао је додавање $875\ \mu\text{l}$ CHAPS у $35\ \text{ml}$ фосфопротеин-лизирајућег пуфера и додавање $75\ \mu\text{l}$ CHAPS у $3\ \text{ml}$ фосфопротеин-елуционог пуфера, како би финална концентрација CHAPS у оба пуфера износила $0,25\%$ (v/v). Затим је у $5\ \text{ml}$ аликвота фосфопротеин-лизирајућег пуфера, који садржи CHAPS (припремљен у претходном кораку), додавана једна таблета протеазних инхибитора (из кита) и $10\ \mu\text{l}$ шток раствора бензназе, која доводи до деградације свих форми ДНК и РНК молекула који би сметали изолацији фосфопротеина. Помоћу TissueRuptor хомогенизера је затим, на средњој брзини, вршена хомогенизација $30\ \text{mg}$ ткива јетре у $350\ \mu\text{l}$ пуфера за лизирање. Следило је разблаживање добијених хомогената са $1500\ \mu\text{l}$ пуфера за лизирање и инкубирање хомогената у трајању од тридесет минута на 4°C , уз вортексовање на сваких десет минута. Након инкубације вршено је центрифугирање хомогената на $10000\ \times\ g$, 4°C током тридесет минута. За време центрифугирања припремане су колоне за пречишћавање фосфопротеина одстрањивањем течности за одржавање колоне. На колоне је затим, у циљу еквилибрисања, наливано по $4\ \text{ml}$ фосфопротеинског пуфера за лизирање који садржи $0,25\%$ CHAPS. По завршетку центрифугирања одређивана је концентрација протеина добијених лизата. Затим је узимана запремина лизата која садржи $2,5\ \text{mg}$ протеина и прилагођавана на финалну концентрацију од $0,1\ \text{mg/ml}$, додавањем фосфопротеинског пуфера за лизирање који садржи $0,25\%$ CHAPS. Корак

разблаживања узорака неопходан је у циљу откривања свих фосфо група протеина, чак и оних скривених унутар протеинских комплекса.

Лизат је затим лагано сипан у горњи резервоар колоне за пречишћавање фосфопротеина. Корак проласка лизата кроз колону трајао је око педесет минута и извођен је на собној температури, што је довољно времена да се готово сви фосфопротеини вежу за афинитетну колону. По завршетку овог корака колона је, због евентуално заосталих нефосфорилисаних протеина, испирана са 6 ml фосфопротеинског лизирајућег пуфера. Након што је сав пуфер прошао кроз колону, додавано је 500 µl фосфопротеинског елуционог пуфера који садржи 0,25% CHAPS. По скупљању првог елуата, корак елуције је поновљен још четири пута. Након одређивања концентрација свих елуираних фракција утврђено је да је највећи принос у фракцијама 3 и 4. Да би узорак могао бити коришћен за имуноблот анализе неопходно је било извршити концентровање узорка, коришћењем Nanoser ултрафилтрационих колоне (саставни део кита) и елуата са највећим приносом протеина. 500 µl протеинске фракције наношено је у резервоар Nanoser колоне. Колоне су затим центрифугиране на 10000 x g, у трајању од десет минута. Након центрифугирања, сконцентрисани узорак се налазио у комори за задржавање, одакле је узиман и коришћен за даље анализе.

3.3.17. Припрема ткива за хистолошку анализу

Одмах након жртвовања узиман је део јетре. Затим је ткиво фиксирано у Буоновом фиксативу (пикринска киселина: барни формалин : глацијална сирћетна киселина у односу 15:9:1) у трајању од 48 сати. Након фиксирања ткиво је испирано у дестилованој води. Уследила је дехидратација ткива његовим провлачењем кроз серију алкохола растуће концентрације, почев од 30% етанола, преко 50%, 70%, 96%, до 100% етанола. Следећи корак био је просветљивање ткива које је вршено држањем ткива у ксилолу два пута у трајању од пет до петнаест минута. Након просветљивања ткива приступано је кораку калупљења ткива у парафину. Ткиво се смешта у

загрејани парафин и оставља у термостату на 55°C у трајању од једног сата. Након истека тог времена, износи се из термостата на собну температуру и оставља преко ноћи. Укалупљено ткиво се затим исеца из парафина, поставља и причвршћује на дрвене калупе. Пресеци ткива, дебљине 5 μm , добијени су сечењем на микротому (Leica, Немачка), и постављани на микроскопске плочице. Након сушења плочица, препарати су били спремни за даље анализе.

3.3.17.1. Хематоксилин-еозин бојење хистолошких препарата

Ова врста бојења користи се за приказивање структурних промена у морфологији јетре и присуства некрозе. Хематоксилин је базна (позитивна) боја која се везује за базифилне супстанце (ДНК, РНК) и даје тамно плаво или љубичасто обојење. Еозин је кисела (негативна) боја, везује се за ацидофилне супстанце (протеини) и даје црвено или розе обојење.

Бојењу ткивних препарата претходила је депарафинизација и рехидратација ткива. Плочице са пресецима ткива најпре су провлачене кроз ксилол, а затим кроз серију алкохола падајуће концентрације и то најпре кроз 100%, а затим редом кроз 96% и 70% етанол. У последњем кораку рехидратације, плочице са препаратима су држане у води до обезбојавања. Уследило је бојење хематоксилином, у трајању од једног минута, затим испирање у води током пет минута, а потом и бојење еозином у трајању од пет минута. Даље се приступило дехидратацији, тако што су плочице провлачене кроз серију алкохола растуће концентрације, редом кроз 70%, 96% и 100% етанол, а затим кроз ксилол. Након овог корака следило је монтирање покровног стакла. За визуелизацију је коришћен светлосни микроскоп (Opton, Zeiss, Немачка).

3.3.17.2. Имунохистохемијско обележавање ткивних препарата

Имуно обележавању ткивних препарата претходила је депарафинизација и рехидратација ткива. Плочице са пресецима ткива најпре су провлачене два пута кроз ксилол, а затим кроз серију алкохола падајуће концентрације и то најпре кроз 100%

етанол, а затим редом кроз 96% и 70% етанол. У последњем кораку рехидратације, плочице са препаратима су држане у води до обезбојавања. Следио је корак откривања епитопа који је вршен загревањем плочица у микроталасној пећници, претходно уроњених у натријум-цитратни пуфер (3- Na -цитрат, дестилована вода, Tween). Овај корак понављан је још два пута, после чега је препарат охлађен. Након хлађења и испирања у PBS-у, извршено је блокирање препарата у трајању од 60 минута, у нормалном свињском серуму (енг. normal swine serum) (Дакo, Данска), разблаженом у фосфатном пуферу (1:10). Потом је наношено примарно антитело, специфично на HMGB1, на ткивни препарат (концентрација антитела била је 1:500). Инкубација примарног антитела вршена је на 4°C преко ноћи. Следећи корак је било испирање у PBS-у током пет минута, а затим је препарат третиран 3% водоник пероксидом у трајању од петнаест минута. Следила је инкубација са специфичним секундарним антителом у трајању од 60 минута. Након још једног испирања у PBS-у, препарат је третиран 3,3'-диаминобензидином (DAB). По испирању препарата у води, наношен је хематоксилин у трајању од 30 секунди. Након поновног испирања у води следио је процес дехидратације препарата на претходно описан начин, после чега је монтирано покровно стакло. За визуелизацију је коришћен светлосни микроскоп (Opton, Zeiss, Немачка)

3.3.18. Статистичка обрада података

Све вредности изражене су као средња вредност \pm статистичка грешка. Разлике између одговарајућих средњих вредности одређене су помоћу једностране ANOVA са post-hoc Mann-Whitney U тестом. P вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним.

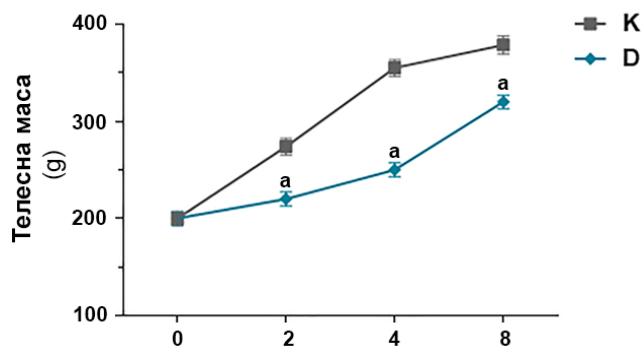
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дијабетични, оксидативни и инфламацијски статус пацова у периоду са ДТ1

Са циљем да се одреди експериментални период у којем су промене у општем статусу пацова са ДТ1 најизраженије, испитиване су промене телесне масе, биохемијског, оксидацијског и инфламацијског статуса у другој (развојна фаза), четвртој и осмој (стабилна фаза) недељи дијабетеса.

4.1.1. Телесна маса

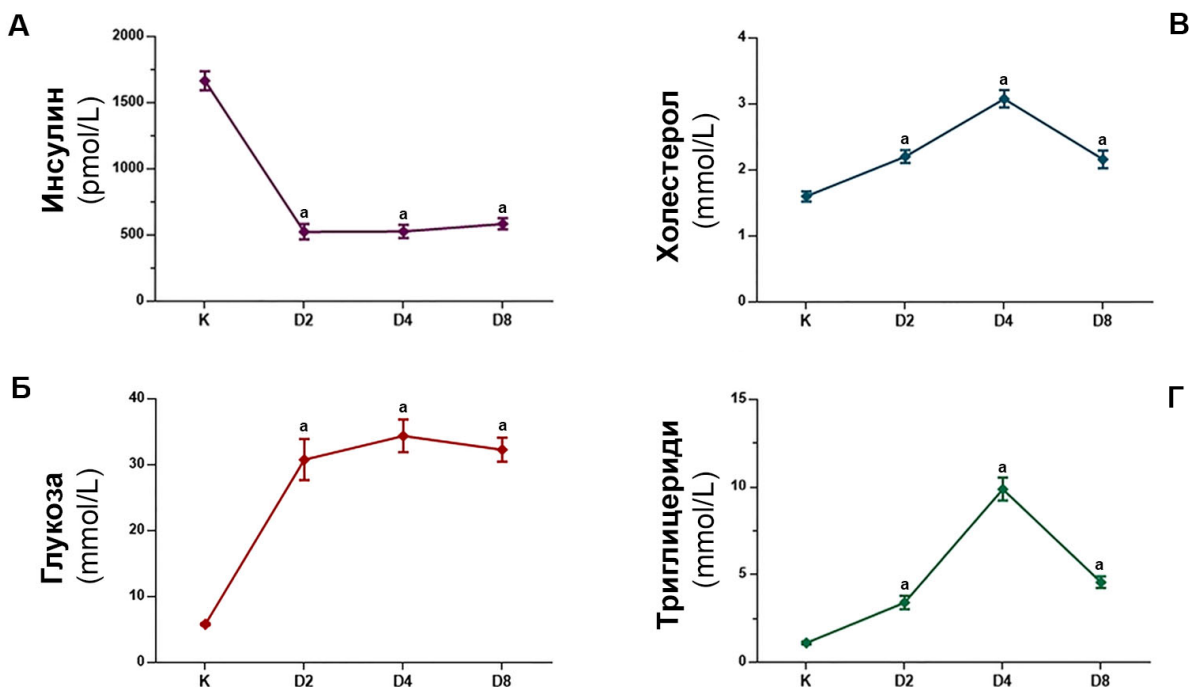
На слици 4.1 приказане су промене телесне масе пацова са ДТ1 у односу на одговарајуће вредности контролних животиња на крају друге, четврте и осме недеље. Код пацова са ДТ1 уочава се значајан пад телесне масе у односу на одговарајуће контролне вредности током испитиваног експерименталног периода. Највећи пад забележен је у четвртој недељи када је телесна маса 30% ($p < 0,05$) мања у односу на одговарајућу контролну вредност.



Слика 4.1. Промена телесне масе пацова са индукованим дијабетесом током периода од осам недеља. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.1.2. Биохемијски статус

Дијабетес карактерише присуство сталне хипоинсулинемије, хипергликемије, хиперхолестеролемије и хипертриглицеридемије. Одређивањем концентрације инсулина у серуму пацова са ДТ1 (слика 4.2А), већ у другој недељи забележен је пад за око 3 пута ($p < 0,05$) који се на том нивоу задржао до краја осме недеље. Пад концентрације инсулина прати пораст нивоа глукозе (слика 4.2Б) који је највећи у четвртој недељи дијабетеса (6 пута, $p < 0,05$). У четвртој недељи забележен је и највећи пораст концентрације холестерола (2 пута, $p < 0,05$) и триглицерида (9,2 пута, $p < 0,05$).



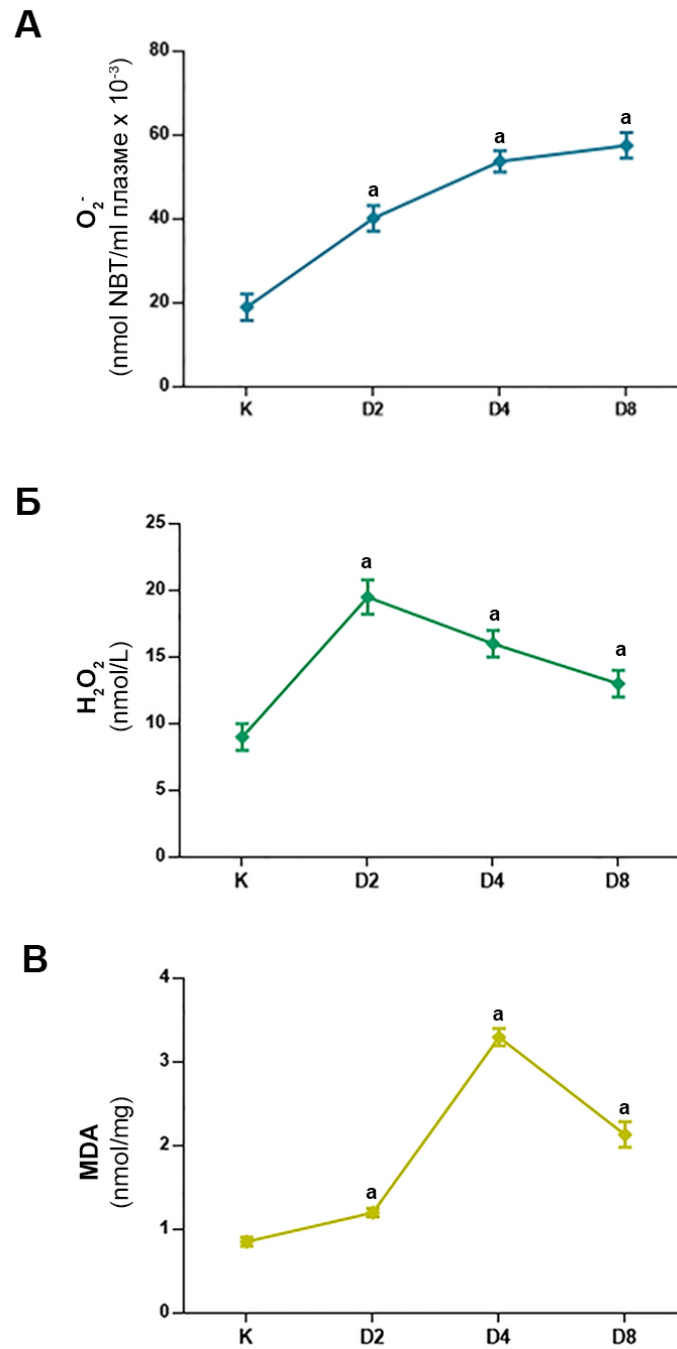
Слика 4.2. Биохемијски статус пацова са индукованим дијабетесом током периода од осам недеља. (А) Промене концентрације инсулина. (Б). Промене концентрације глукозе. (В) Промене концентрације холестерола. (Г) Промене концентрације триглицерида у серуму. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.1.3. Оксидативни статус

Током дијабетеса, стално повишен ниво шећера у крви доводи до повећаног стварања слободних врста кисеоника. Мерење присуства супероксид анјон радикала (O_2^-) у плазми пацова са ДТ1 показало је његов прогресивни пораст почев од друге до осме недеље након индукције дијабетеса, у односу на контролне вредности (слика 4.3А). Највећи пораст концентрације O_2^- забележен је на крају осме недеље (3 пута, $p < 0,05$). У четвртој недељи дијабетеса концентрација O_2^- увећана је 2,8 пута ($p < 0,05$).

Водоник пероксид (H_2O_2) у ванћелијској средини може ступити у Фентонову реакцију и довести до стварања хидроксил радикала који реагује са макромолекулима узрокујући њихово оштећење. На основу резултата приказаних на слици 4.3Б уочава се да је концентрација H_2O_2 током испитиваног експерименталног периода трајања дијабетеса значајно повишена. Максимална вредност измерена је две недеље након иницирања STZ и повећана је 2,8 пута ($p < 0,05$) у односу на контролну вредност (слика 4.3Б). Након овог периода, концентрација H_2O_2 постепено опада, мада је и даље увећана у односу на контролну вредност. Ово увећање у четвртој недељи дијабетеса износи 2 пута ($p < 0,05$).

С обзиром на то да су липиди, од свих макромолекула, најосетљивији на деловање слободних радикала, мерена је концентрација малондиалдехида (MDA), стабилног продукта липидне пероксидације изазване дејством слободних кисеоничних врста. На слици 4.3В уочава се повећање концентрације MDA у плазми дијабетичних пацова у свим испитиваним временским периодима у односу на контролну вредност. Највећи пораст концентрације (3,9 пута, $p < 0,05$) забележен је на крају четврте недеље дијабетеса. Након овог периода долази до пада концентрације MDA, тако да на крају осме недеље има вредност 2,5 пута ($p < 0,05$) већу у односу на контролну вредност.

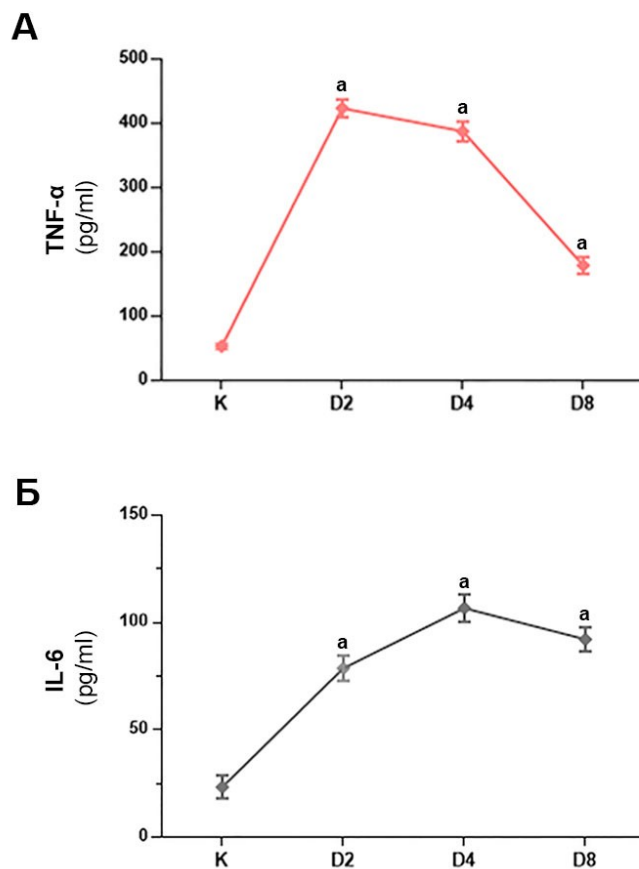


Слика 4.3. Оксидативни статус пацова са STZ-индукованим дијабетесом током периода од осам недеља. (А) Промене нивоа O_2^- у плазми. (Б) Промене нивоа H_2O_2 у плазми. (В) Промене нивоа MDA у плазми. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.1.4. Инфламацијски статус

Резултати приказани на слици 4.4. показују статистички значајно повећање концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6, важних за процену присуства хроничног инфламацијског стања, у серуму дијабетичних пацова. Две недеље након индукције дијабетеса измерен је максимални пораст концентрације TNF- α (9 пута, $p < 0,05$) у односу на контролну вредност. Након друге недеље, бележи се благи пад концентрације TNF- α . У четвртој недељи је 8,3 пута ($p < 0,05$) већи у поређењу са контролном вредношћу, а на крају осме недеље 4 пута ($p < 0,05$).

Концентрација IL-6 у серуму пацова са дијабетесом (слика 4.4Б) расте до краја четврте недеље, када достиже највећу вредност, 4 пута ($p < 0,05$) већу у односу на контролну. Након четврте недеље бележи се благи пад концентрације IL-6 на ниво који је у осмој недељи већи 3,7 пута ($p < 0,05$) у поређењу са контролном вредношћу.



Слика 4.4. Инфламацијски статус пацова са STZ-индукованим дијабетесом током периода од осам недеља. (А) Промене концентрације TNF- α у серуму. (Б) Промене концентрације IL-6 у серуму. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.2. Структурне и функционалне промене у јетри пацова са ДТ1

Са циљем да се одреди експериментални период у којем су патолошке промене у јетри пацова са ДТ1 најизраженије, испитиване су промене функционалних параметара јетре, њене структуре, присуство ДНК оштећења, оксидативног стреса и инфламације у другој (развојна фаза), четвртој и осмој (стабилна фаза) недељи дијабетеса.

4.2.1. Концентрације аминотрансфераза

Са циљем да се испитају промене функционалног стања јетре пацова са ДТ1, праћене су промене активности аланин аминотрансферазе (ALT) и аспартат аминотрансферазе (AST) у серуму (табела 1). Ове трансминазе користе се као серумски маркери оштећења/инфламације јетре. Уочено је статистички значајно увећање активности обе трансминазе у серумима свих испитиваних дијабетичних група у односу на контролне вредности што говори у прилог постојању хроничне инфламације јетре. Највеће активности за обе трансминазе забележене су у четвртој недељи дијабетеса и износе 2,3 пута ($p < 0,05$) за ALT и 3,5 пута ($p < 0,05$) за AST.

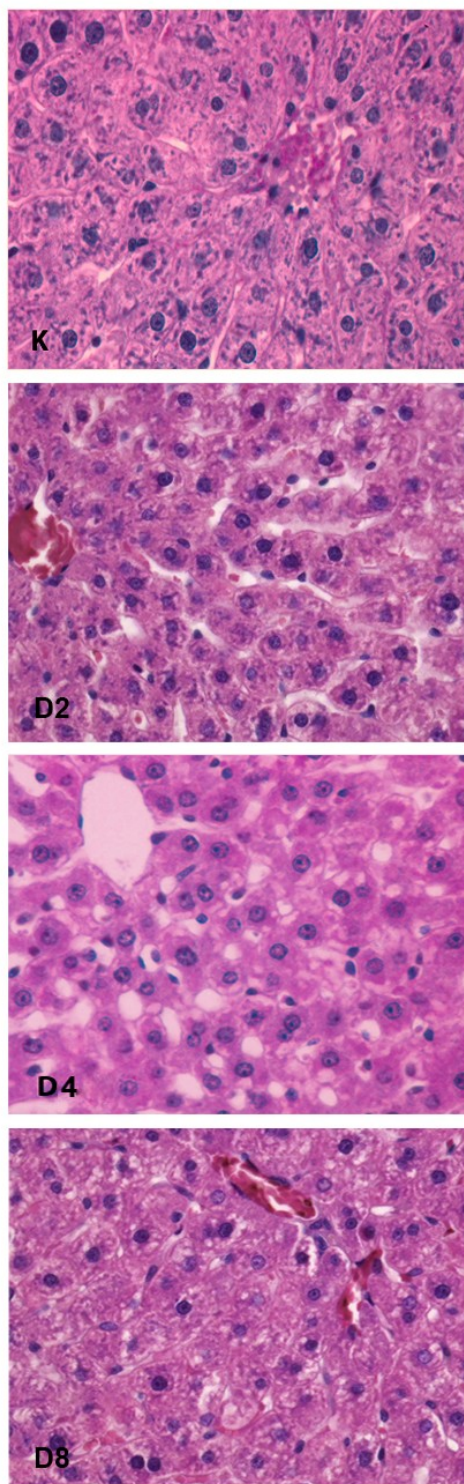
Табела 1. Промене активности аминотрансфераза (ALT и AST) у серуму пацова са индукованим дијабетесом током периода од осам недеља.

	K	D2	D4	D8
ALT (U/l)	48,5±2,9	111,2±6,5 ^a	173,4±10,4 ^a	138,5±8,4 ^a
AST (U/l)	186,7±11,2	262,5±18,4 ^a	452,5±32,4 ^a	223,7±17,5 ^a

K – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.2.2. Хистопатолошка анализа ткива јетре дијабетичних пацова

На пресецима ткива јетре дијабетичних пацова уочени су поремећаји у организацији ткива јетре током трајања дијабетеса (слика 4.5). Најупечатљивије промене уочене су на пресецима јетре дијабетичних пацова жртвованих на крају четврте недеље, када је хистолошком анализом показано да је нарушена архитектоника гредица, да су нејасне границе ћелија, изражено присуство хидропсне дегенерације ћелија (степен 4, оштећење >50%) (табела 2) и ћелијске некрозе (степен 2, заступљеност некрозе 5-25%) (табела 2). Хидропсна дегенерација јавља се услед измењене пропустљивости ћелијске мембране настале оштећењем липидног двослоја, због чега долази до неконтролисаног уласка воде и Na^+ јона, што за последицу има бубрење ћелије. Такође, уочена је дилатација синусоида, проминентне Купферове ћелије и присуство бинуклеарних ћелија (слика 4.5). На пресецима јетре пацова жртвованих на крају осме недеље дијабетеса, уочена је ретракција цитоплазме од плазмалеме и вакуолизација (степен 3, оштећење 26-50%), присуство некрозе (степен 2, заступљеност некрозе 5-25%) (табела 2), већином компримовани синусоиди, мање проминентне Купферове ћелије.



Слика 4.5. Пресеци ткива јетре пацова. Репрезентативне слике пресека ткива јетре пацова. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Увећање x40.

Табела 2. Степен хидропсне дегенерације ћелија јетре пацова и некрозе током дијабетеса

	К	D2	D4	D8
Дегенерација ћелија јетре	1	2	4	3
	<5%	5-25%	>50%	26-50%
Некроза	0	1	2	2
	0%	< 5%	5-25%	5-25%

Промене су одређиване по методи Lobenhofег и сарадника (Lobenhofег и сар., 2006): 1 – минималне промене (мање од 5% ћелија, 2 – умерене промене (5-25% ћелија), 3 – јаке промене (26-50% ћелија) и 4 – интензивне промене (преко 50% ћелија). К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ.

4.2.3. Оксидативни статус јетре

Да би се потврдило присуство оксидативног стреса у дијабетичној јетри, одређиван је ниво липидних пероксида у хомогенатима јетре изолованих из пацова у различитим временским тачкама. Измерене концентрације липидних пероксида значајно су повишене у јетри током трајања дијабетеса (слика 4.6А). Максимално повећање, у односу на контролну вредност, измерено је у јетри пацова након четири недеље од инјектирања STZ (4 пута, $p < 0,05$). Након овог периода, концентрација MDA опада, али ипак остаје значајно повишена, те на крају осме недеље има вредност око 3 пута ($p < 0,05$) већу у односу на контролну вредност.

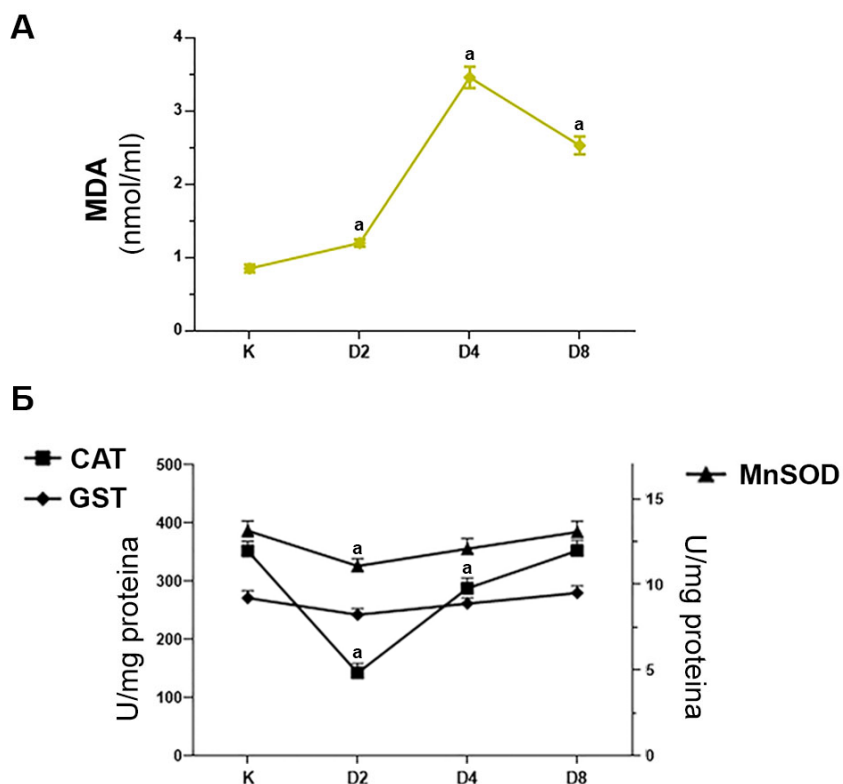
Са циљем да се утврди степен антиоксидативне заштите у јетри пацова са ДТ1 испитиване су активности антиоксидативних ензима (CAT, MnSOD, GST) у хомогенатима јетре пацова.

Активност CAT показује тенденцију опадања током целог експерименталног периода, осим у осмој недељи када је њена активност блиска контролном нивоу. Највећи пад активности CAT измерен је на крају друге недеље од индукције ДТ1, за 60% ($p < 0,05$) у односу на њену активност у јетри контролних пацова. На крају

четврте недеље активност CAT је 21% ($p < 0,05$) нижа у односу на контролни ниво, да би на крају осме недеље била блиска контролном нивоу (слика 4.6Б).

Статистички значајна промена нивоа активности ензима GST није уочена током трајања експерименталног периода (слика 4.6Б).

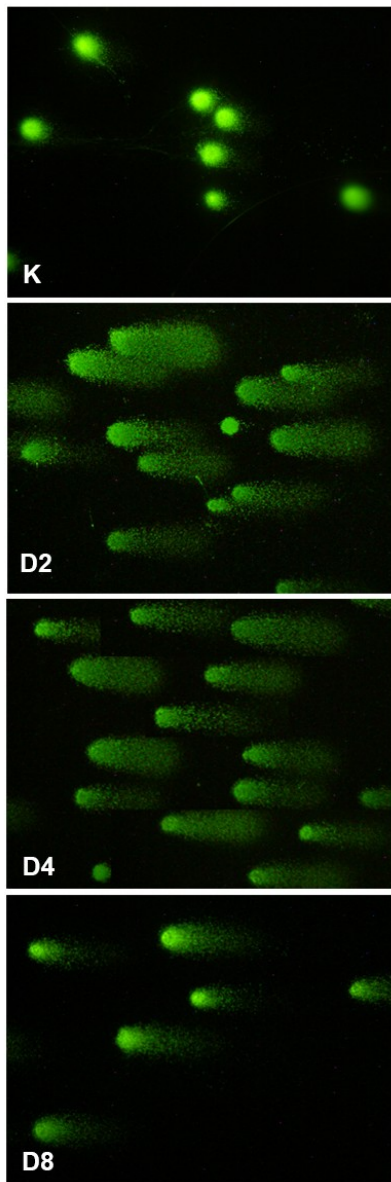
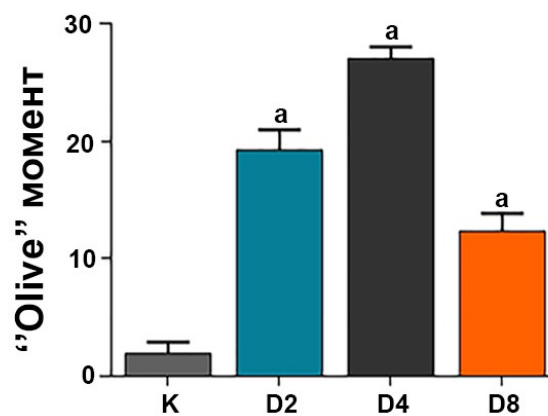
На основу графика на слици 4.6Б уочава се значајно опадање активности MnSOD на крају друге недеље дијабетеса, 30% ($p < 0,05$), у поређењу са активношћу у јетри контролних пацова. Након друге недеље активност MnSOD расте, али је на крају четврте недеље од инјектирања STZ и даље на 10% нижи у односу на контролни ниво (слика 4.6Б).



Слика 4.6. Оксидативни статус јетре пацова са STZ-индукованим дијабетесом током периода од осам недеља. (А) Промене концентрација MDA у јетри пацова. (Б) Промене активности ензима CAT, MnSOD, GST у јетри. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од инјектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.2.4. ДНК оштећења у ћелијама јетре

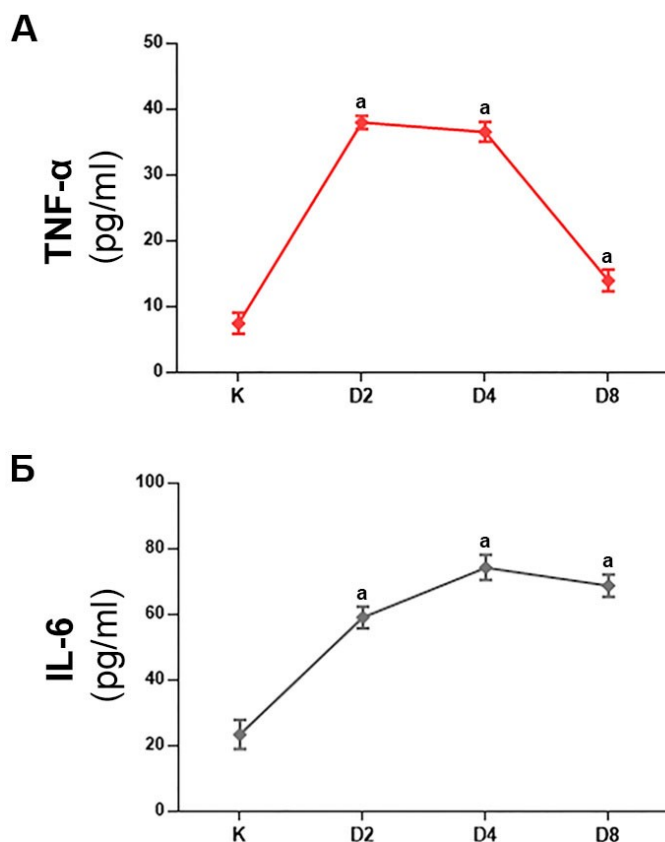
Присуство липидне пероксидације и снижен ниво антиоксидативне заштите у јетри током дијабетеса могу узроковати појаву ДНК оштећења. За анализу присуства ДНК оштећења коришћен је метод комет есеја, која се заснива на томе да оштећени делови ДНК, током електрофоретског раздвајања, путују из једра у правцу катоде (у смеру струје) чиме долази до настајања структура које изгледом подсећају на комете, са сјајном главом и репом. Количина ДНК присутна у репу комете, указује на степен ДНК оштећења. У случају контролне групе животиња, највећи број ћелија одликовао се одсуством репа комете (слика 4.7А), из чега се може закључити да у овим ћелијама нема ДНК оштећења. Насупрот томе, код ћелија јетре пацова са дијабетесом, запажена је велика количина ДНК у репу комета што указује на висок ниво дволанчаних прекида ДНК молекула. Анализа “Olive” момента (слика 4.7Б), који представља производ процента укупне ДНК у репу и растојања између центара масе главе и репних регија комете, указала је на увећање ДНК оштећења у дијабетичној јетри, и то за 19 пута ($p < 0,05$) након две недеље дијабетеса, 26 пута код D4 и 12 пута код D8, у поређењу са ћелијама јетре контролне групе животиња (слика 4.7Б).

A**Б**

Слика 4.7. ДНК оштећења у ћелијама јетре дијабетичних пацова. (А) Репрезентативне слике ДНК оштећења утврђене методом комет есеја. (Б) Графички приказ процене ДНК оштећења коришћењем „Olive“ момента као параметра ДНК оштећења. Приказане су средње вредности \pm стандардна грешка „Olive“ момента комета, добијена из три независна експеримента. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од ињектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.2.5. Инфламацијски статус јетре

Стање хроничне инфламације у дијабетесу карактерише увећано присуство проинфламацијских цитокина и акутно фазних протеина у циркулацији (Devaraj и сар., 2007). Јетра је главни извор циркулишућих цитокина и акутно фазних протеина, и суштински саставни део имуног система с обзиром на то да доприноси контроли системске инфламације (Bode и сар., 2012). Резултати приказани на слици 4.8 показују статистички значајно повећање концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6 у хомогенатима јетре дијабетичних пацова током периода од осам недеља. У односу на контролну вредност, максимални пораст концентрације TNF- α (5,1 пута, $p < 0,05$) измерен је две недеље након инјектирања STZ (слика 4.8А). У четвртој недељи концентрација TNF- α је статистички незначајно смањена у односу на другу недељу и 4,9 пута ($p < 0,05$) је већа у односу на контролну вредност. На крају осме недеље измерени ниво овог цитокина у хомогенатима јетре је значајно нижи од нивоа у четвртој недељи али је и даље 1,9 пута ($p < 0,05$) већи у поређењу са контролном вредношћу (слика 4.8А). Највећи пораст концентрације IL-6 у хомогенатима јетре забележен је у четвртој недељи дијабетеса (3,3 пута, $p < 0,05$). У осмој недељи детектован је статистички незначајан пад концентрације односу на четврту недељу (слика 4.8Б).

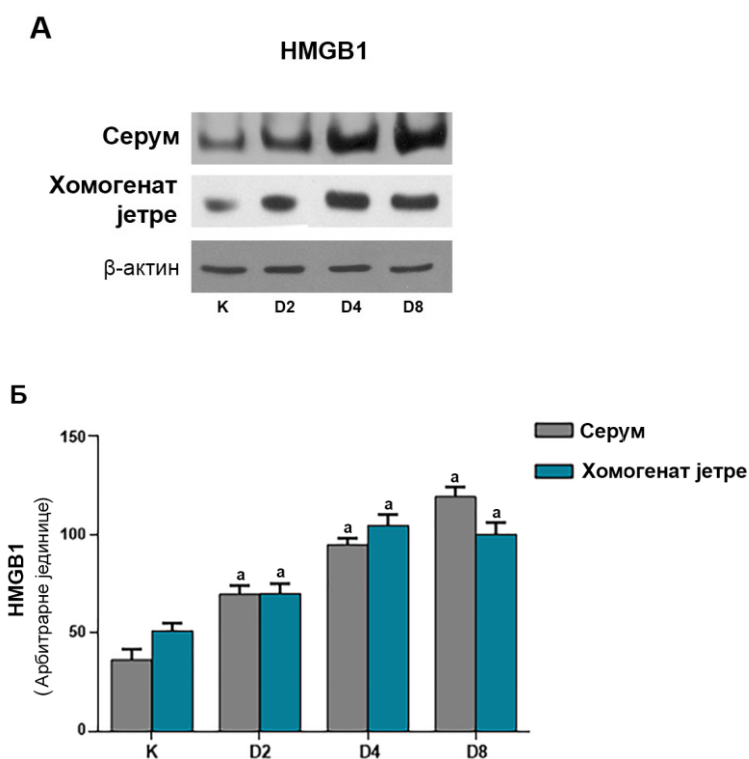


Слика 4.8. Инфламацијски статус јетре пацова са ДТ1. (А) Промене концентрација TNF- α у хомогенатима јетри пацова. (Б) Промене концентрација IL-6 у хомогенатима јетри пацова. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од ињектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.2.6. Присуство HMGB1 протеина у серуму и јетри пацова са ДТ1

Претходно приказани резултати указују на присуство оштећења у јетри током дијабетеса и присуство хроничне инфламације. Како оштећене ћелије ослобађају HMGB1 протеин у ванћелијску средину, у којој он има улогу алармина, некротичног маркера или проинфламаторног цитокина, одређивана је његова присутност у серуму и ткиву јетре пацова током дијабетеса (слика 4.9). Методом имуноблот анализе

серума контролних и пацова жртвованих две, четири и осам недеља након индукције дијабетеса, утврђено је прогресивно увећање нивоа HMGB1 протеина (слика 4.9А). У другој недељи дијабетеса серумски ниво HMGB1 је 1,9 пута ($p < 0,05$) већи у односу на контролну вредност, у четвртој недељи 2,4 пута ($p < 0,05$), а у осмој недељи 3,3 пута ($p < 0,05$) (слика 4.9Б). Имуноблот анализа укупних хомогената јетри показала је да је максимална присутност HMGB1 (2,5 пута, $p < 0,05$) детектована у четвртој недељи дијабетеса. У другој недељи ниво присутности HMGB1 већи је 1,4 пута ($p < 0,05$) у односу на контролну вредност, а у осмој недељи 2 пута ($p < 0,05$) (слика 4.9Б).



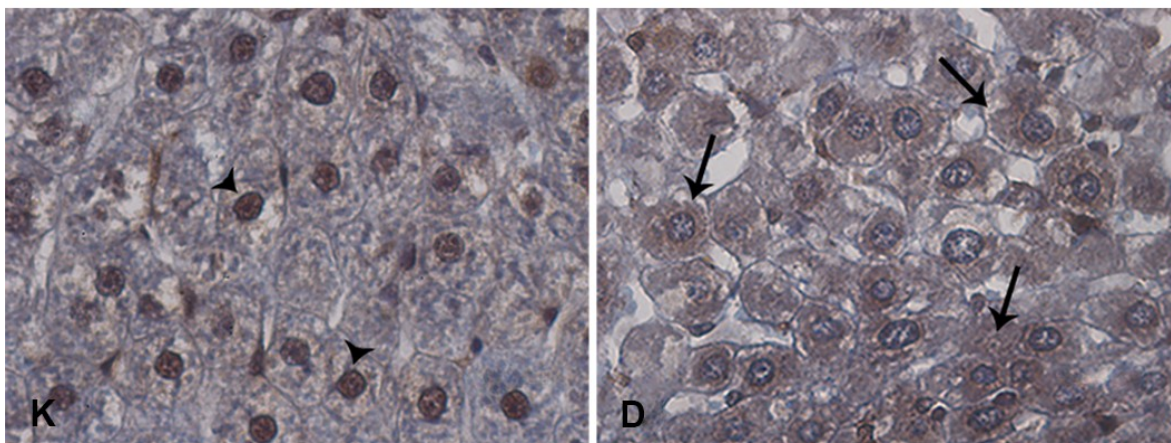
Слика 4.9. Присутност HMGB1 протеина у серуму и јетри пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа протеина серума и хомогената јетри пацова на присуство HMGB1 током дијабетеса. (Б) Графички приказ квантификације детектованих промена. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D2 – дијабетична група жртвована на крају 2. недеље, D4 – дијабетична група жртвована на крају 4. недеље, D8 – дијабетична група жртвована на крају 8. недеље од ињектирања STZ. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.3. Унутарћелијска локализација и структурне модификације НМGB1 протеина у јетри пацова са ДТ1

Већина резултата истраживања биохемијских, оксидативних и инфламацијских параметара у серуму и јетри пацова са ДТ1, као и резултати хистолошке анализе ткива јетре, анализе ДНК оштећења и анализе присуства НМGB1 протеина, указују да су најизраженије промене уочене у узорцима четврте недеље дијабетеса. Због тога су за даља истраживања, која су у вези са карактеризацијом структуре и улоге НМGB1 протеина у дијабетесу, коришћени узорци пацова жртвованих четири недеље након индукције ДТ1.

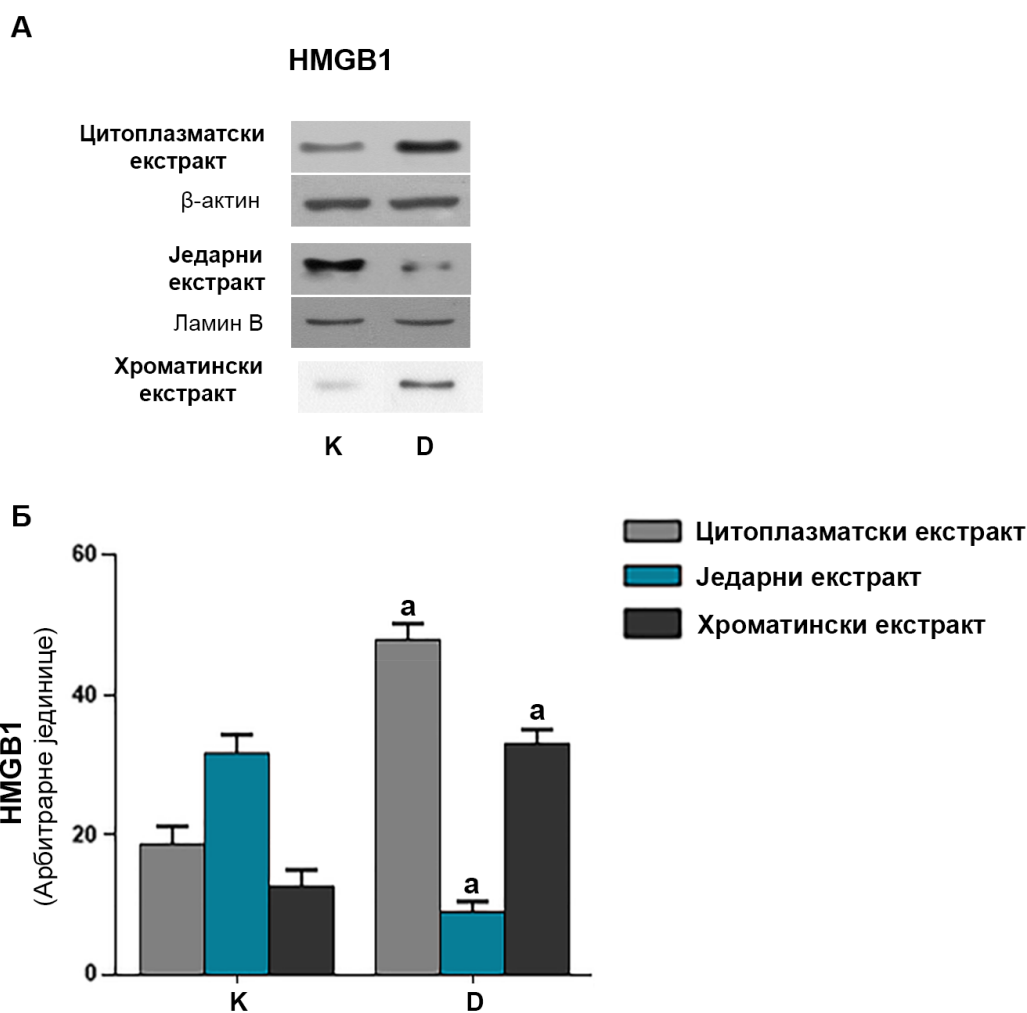
4.3.1. Унутарћелијска локализација НМGB1 протеина у јетри пацова са ДТ1

Према литературним подацима, изласку НМGB1 протеина из активираних или стресираних ћелија у ванћелијску средину претходи његова унутарћелијска релокализација посредована постранслационим структурним модификацијама (Andersson и сар., 2014). У циљу утврђивања промена у унутарћелијској локализацији протеина НМGB1 у дијабетесу, најпре је рађена имунохистохемијска анализа ткивних препарата јетри. Ова анализа (слика 4.10) је показала је да се током дијабетеса протеин НМGB1 релокализује из једра у цитоплазму хепатоцита. Док је на пресецима јетри контролних животиња имунопозитивност интензивна и сконцентрисана на нивоу једара, на препаратима јетри дијабетичних пацова интензивна имунопозитивност детектована је унутар цитоплазме ћелија.



Слика 4.10. Имунохистохемијска анализа ткива јетре на присутност HMGB1 протеина. K – контролна група, D – дијабетична група. Врх стрелице – имунообојеност једра, стрелица – имунообојеност цитоплазме. Увећање x40

Имунохистохемијски детектована унутарћелијска редистрибуција и акумулација HMGB1 протеина у цитоплазми ћелија јетри пацова са ДТ1, потврђена је и имуноблот анализом цитоплазматског, једарног и хроматинског екстракта ћелија јетри (слика 4.11А). Ова анализа указала је на повећање нивоа HMGB1 протеина у цитоплазми ћелија јетре дијабетичних пацова за око 2,5 пута ($p < 0,05$) у односу на контролни ниво и смањење присуства HMGB1 у растворној једарној фракцији за око 72% ($p < 0,05$) (слика 4.11Б). Такође, овом анализом је утврђено увећање присуства HMGB1 протеина у хроматинској фракцији једра у условима дијабетеса за око 2,6 пута ($p < 0,05$) у односу на контролни ниво, што може бити последица јачег везивања HMGB1 за хроматин код ћелија које умиру процесом апоптозе (Magna и Pisetsky, 2014).



Слика 4.11. Унутарћелијска редистрибуција HMGB1 протеина. (А) Имуноблот анализа протеина цитоплазматског, једарног и хроматинског екстракта ћелија јетри пацова на присуство HMGB1 током дијабетеса. (Б) Графички приказ квантификације добијених промена. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

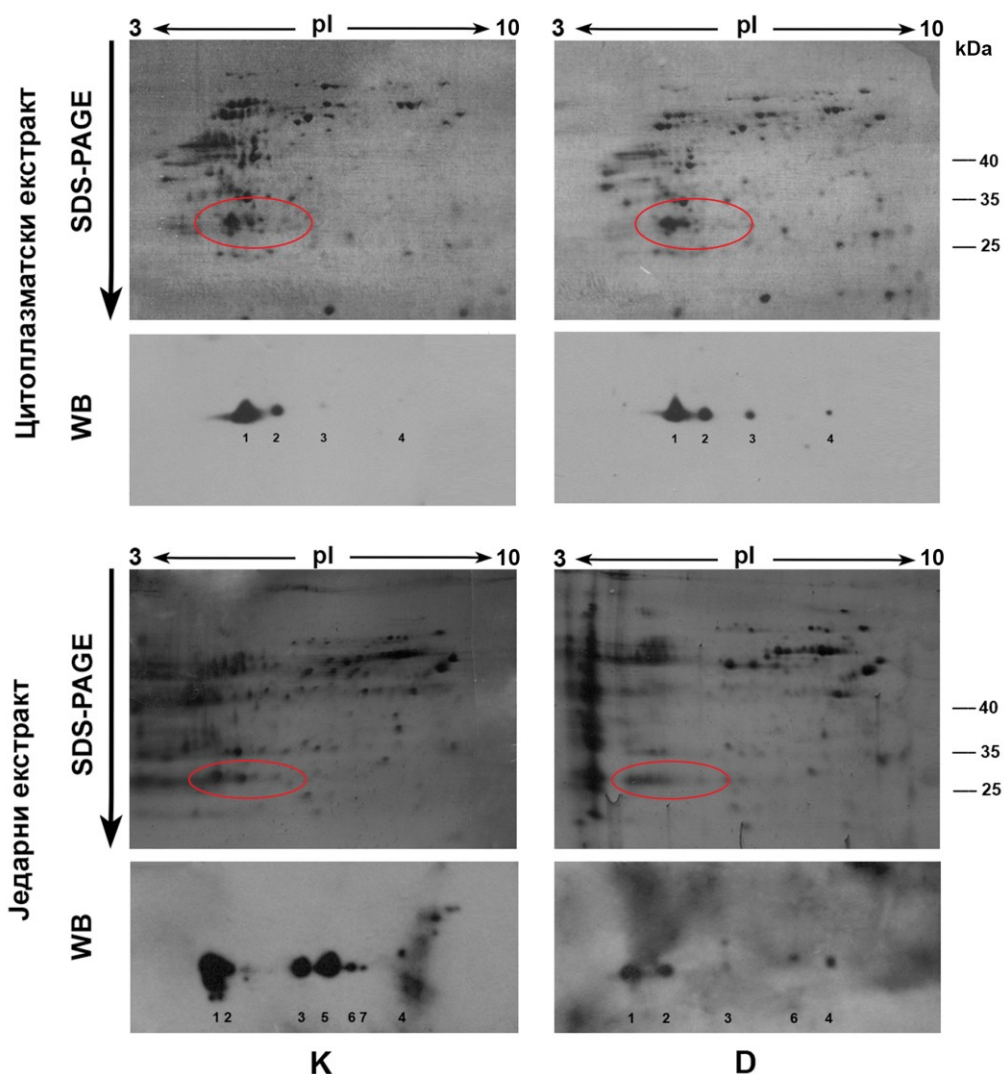
4.3.2. Структурне модификације протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1

Алтернативна локализација протеина у два различита ћелијска одељка мора бити подвргнута прецизној контроли и мора одговарати алтернативним стањима протеина. Ова алтернативна стања најчешће се доводе у везу са присуством различитих посттранслационих модификација на протеину које могу довести до стварања различитих изоформи. Како функције HMGB1 зависе од његове ћелијске локализације и бројних посттранслационих модификација којима овај протеин подлеже, анализирали смо најпре промене у присуству HMGB1 изоформи у ћелијама јетре у дијабетесу, а затим потенцијалну модификованост HMGB1 протеина ацетилацијом, фосфорилацијом, гликозилацијом.

4.3.2.1. Анализа присуства HMGB1 изоформи у цитоплазми и једру ћелија јетри пацова са ДТ1

За утврђивање квалитативних и релативних квантитативних промена у присуству HMGB1 изоформи, протеини цитоплазматског и укупног једарног екстракта јетри контролних и дијабетичних пацова су раздвајани методом дводимензионе (2D) електрофорезе и потом бојени сребром, или, након трансфера на мембране, подвргнути имуноблот анализи. Као што се са слике 4.12 може видети, анти-HMGB1 антитело детектовало је изоформе у цитоплазматском и једарном екстракту како контролних, тако и дијабетичних пацова на најмање 4-7 различитих места дуж градијента рН, са сличним молекулским тежинама. У цитоплазми ћелија из контролне јетре детектоване су 2 доминантне изоформе (обележене са 1 и 2) и још две слабо присутне (обележене са 3 и 4). У цитоплазми ћелија из јетре дијабетичних пацова долази до мањег смањења присуства изоформе 1 и значајног увећања присуства изоформи 2, 3 и 4 у поређењу са контролном групом. У једарним екстрактима контролних јетри детектовано је 7 изоформи, од којих оне обележене са 1, 2, 3 и 4 одговарају позицији цитоплазматских HMGB1 изоформи 1, 2, 3 и 4. Поред

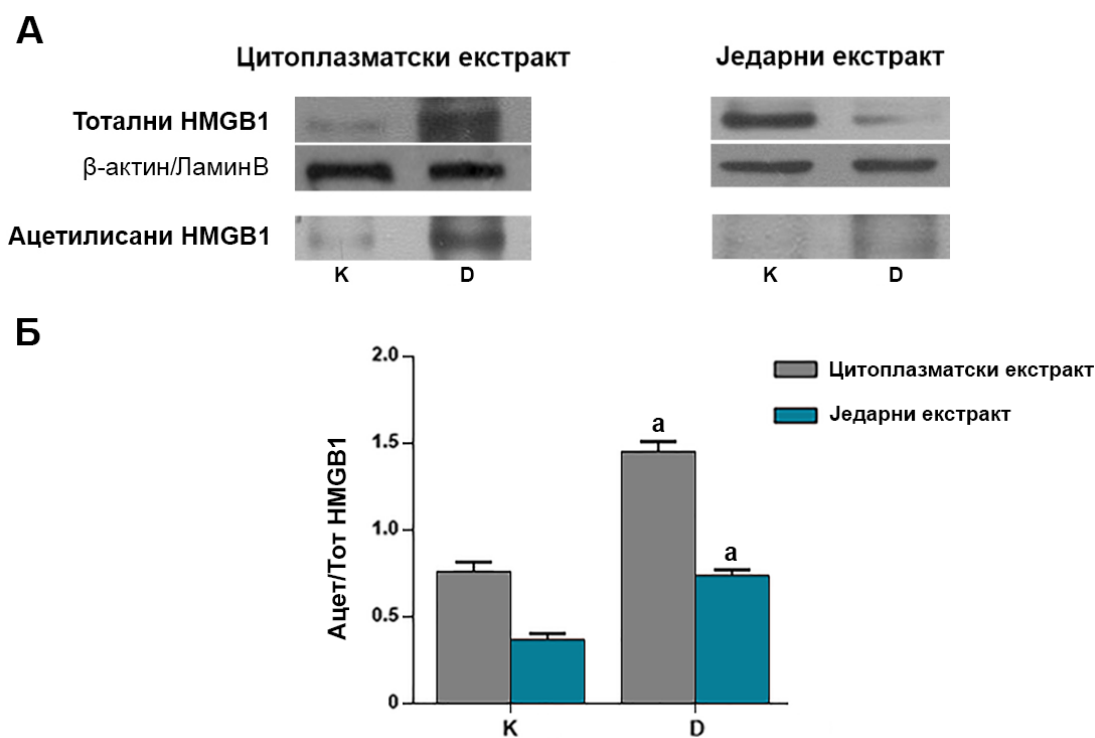
ових детектоване су још 3 изоформе, обележене са 5, 6 и 7. У једарном екстракту јетри пацова са дијабетесом уочава се смањено присуство HMGB1 изоформи. Иако је детектовано веће присуство изоформе 2 у поређењу са контролном групом, значајно је смањено присуство изоформи 1 и 3, док се изоформе 5 и 7 не детектују. На основу ових резултата претпостављено је да до промена у присуству HMGB1 изоформи највероватније долази услед структурних модификација HMGB1 протеина како у једру, што може бити разлог његовог преласка у цитоплазму, тако и у цитоплазми.



Слика 4.12. Анализа присуства HMGB1 изоформи. Протеини цитоплазматског и једарног екстракта раздвојени 2D SDS-PAGE електрофорезом и обојени сребром. Имуноблот анализа присуства HMGB1 изоформи у цитоплазми и једру ћелија јетри пацова са ДТ1. К – контролна група, D – дијабетична група.

4.3.2.2. Ацетилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1

Будући да је ацетилација HMGB1 у активираним или стресираним ћелијама кључна структурна модификација за прелазак HMGB1 протеина из једра у цитоплазму и онемогућавање његовог уласка у једро (Bonaldi и сар., 2003), најпре је испитивано присуство ове структурне модификације на HMGB1 протеину. Имуноблот анализом цитоплазматске и једарне фракције ћелија јетре дијабетичних пацова, уз коришћење одговарајућег антитела које препознаје ацетилисане лизинске остатке, уочено је да је код пацова са дијабетесом однос ацетилисаног и тоталног HMGB1 повећан 1,9 пута ($p < 0,05$) у цитоплазматској фракцији и 1,5 пута ($p < 0,05$) у једарном екстракту, у поређењу са контролним вредностима (слика 4.13Б).



Слика 4.13. Ацетилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа протеина цитоплазматског и једарног екстракта ћелија јетри пацова на присуство ацетилисаног HMGB1 током дијабетеса. (Б) Графички приказ односа ацетилисаног и укупног HMGB1. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, Д – дијабетична група. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом

4.3.2.3. Фосфорилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1

Фосфорилација је друга структурна модификација HMGB1 која утиче на његову прераспodelу између једра и цитоплазме (Kang и сар., 2009; Oh и сар., 2009). Коришћењем комерцијалног кита изоловани су фосфорилисани протеини из цитоплазматског екстракта ћелија јетре, а затим су једнаке количине фосфопротеина из контролне и дијабетичне јетре анализирани имуноблот методом уз коришћење одговарајућег антитела за HMGB1 (слика 4.14А). Добијени резултат, приказан на слици 4.14Б, указује на увећање фосфорилације HMGB1 протеина у цитоплазми ћелија јетре дијабетичних пацова за око 13 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролом.

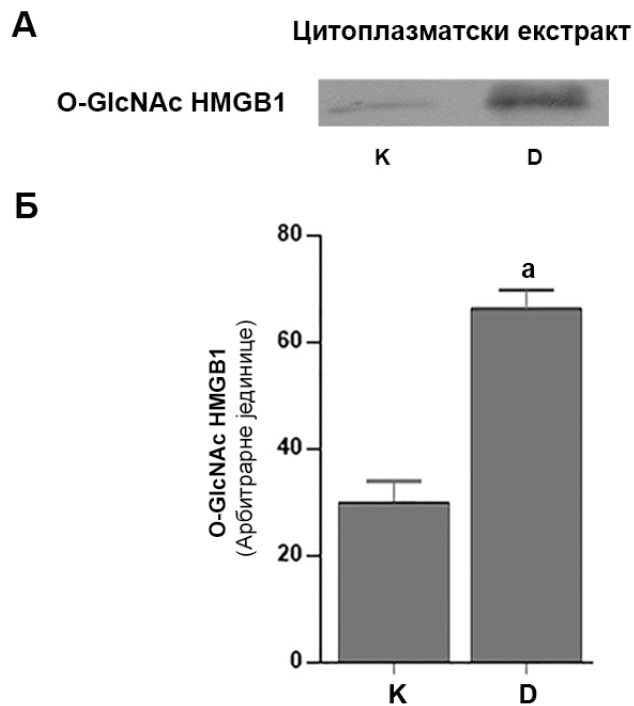


Слика 4.14. Фосфорилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа протеина цитоплазматског екстракта јетри пацова на присуство фосфорилисаног HMGB1 током дијабетеса. (Б) Графички приказ квантификације детектованих фосфорилисаних изоформи HMGB1. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, Д – дијабетична група, Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

4.3.2.4. Гликозилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1

Хронично повећање нивоа глукозе у крви доводи до повећања флуksа глукозе кроз пут биосинтезе хексозамина чији крајњи продукт, UDP-GlcNAc, представља супстрат код везивања β -Н-ацетилглукозамина (O-GlcNAc) за хидроксилни кисеоник бочних ланаца серина или треонина. Ова O-гликозилација регулише широки распон протеина преко интерференције са фосфорилацијом. Налик фосфорилацији, регулише стабилност, активност и субћелијску локализацију протеина (Issad, 2010). Код дијабетеса је уочено повећано присуство Ser/Thr- GlcNAc у регулаторним протеинима као последица повећане експесије глутамин: фруктоза-6-фосфат аминотрансферазе (Hanover и сар., 1999)

За анализу O-GlcNAc гликозилованости HMGB1 током дијабетеса коришћене су колоне за изоловање O-GlcNAc модификованих протеина из цитоплазматских и једарних екстраката јетри пацова, а затим су једанке количине гликопротеина анализиране имуноблот методом, уз коришћење антитела за HMGB1 (слика 4.15А). Из добијених резултата приказаних на графику (слика 4.15Б), може се закључити да је HMGB1 у цитоплазми ћелија јетре дијабетичних пацова 2,2 пута ($p < 0,05$) више O-GlcNAc гликозилован у односу на контролне узорке. Међу једарним гликопротеинима како контролних тако и дијабетичних пацова није детектован HMGB1 протеин.



Слика 4.15. Гликозилација протеина HMGB1 у јетри пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа протеина цитоплазматског екстракта јетри пацова на присуство O-GlcNAc гликозилованог HMGB1 током дијабетеса. (Б) Графички приказ квантификације детектованих изоформи O-GlcNAc HMGB1. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом.

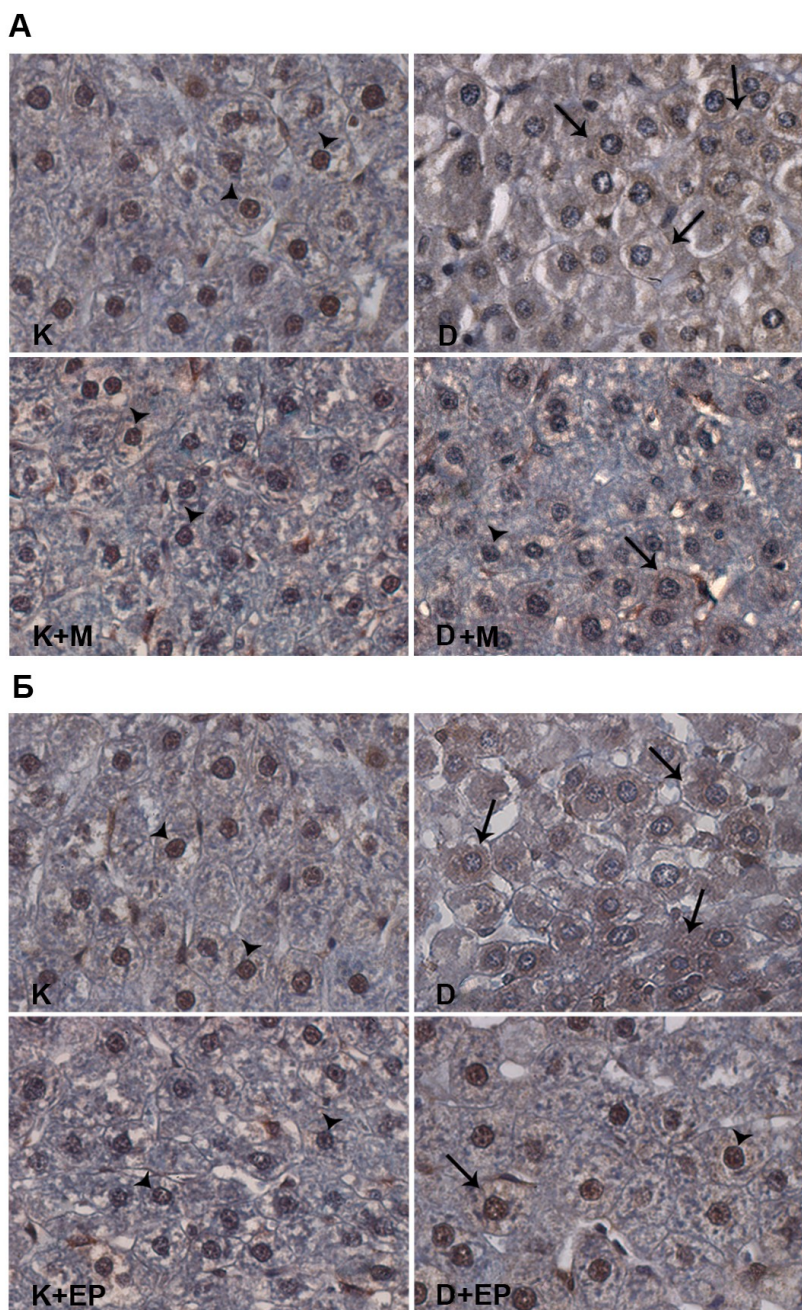
4.4. Функције HMGB1 протеина у ДТ1

За анализу функција HMGB1 протеина у јетри пацова са ДТ1, поред контролних и дијабетичних пацова, формиране су и групе експерименталних животиња, како контролних тако и дијабетичних, код којих је индиректно (хроничним третманом са антиоксидансом мелатонином) или директно (хроничним третманом са инхибитором секреције HMGB1 – етил пируватом) индуковано смањење ванћелијског присуства HMGB1 протеина.

4.4.1. Унутарћелијска локализација HMGB1 у јетри пацова третираних мелатонином или етил пируватом

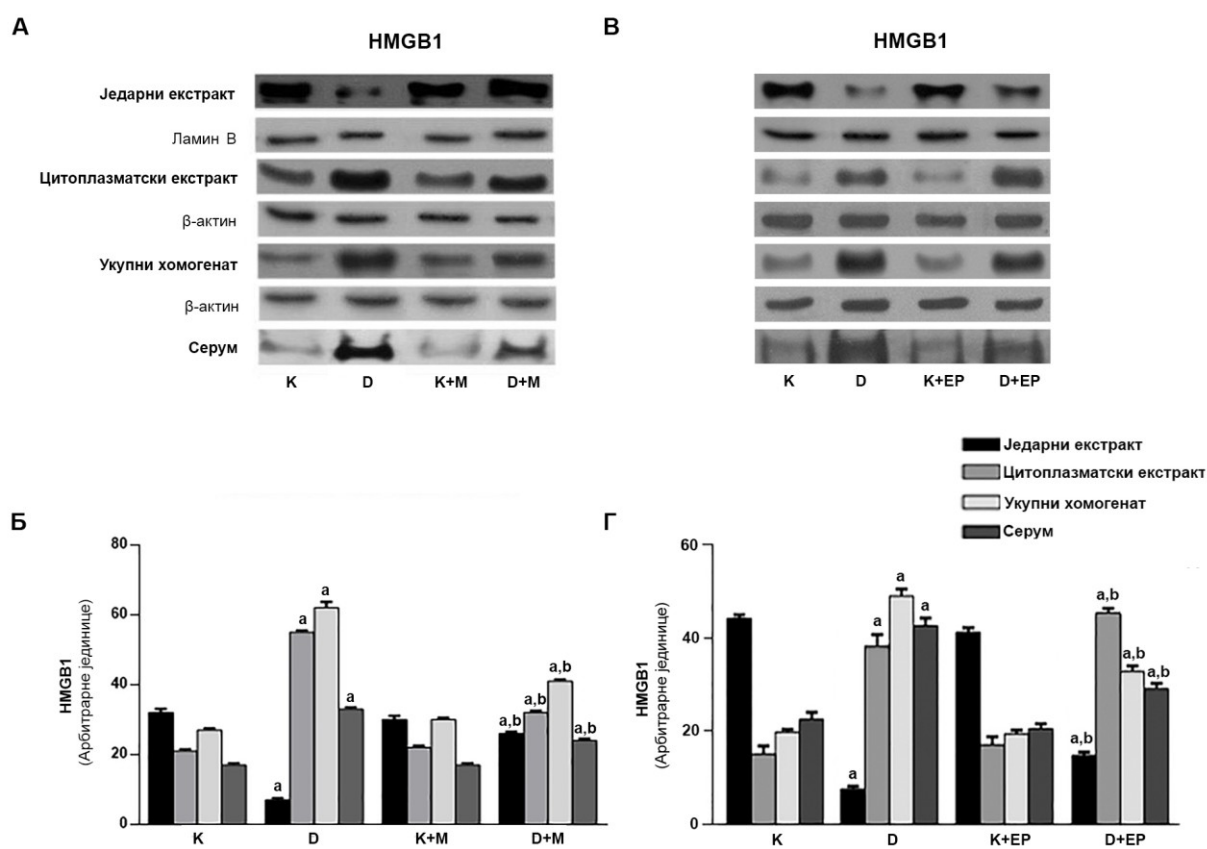
Имунохистохемијска анализа ткивних препарата јетри изолованих из контролних, дијабетичних и пацова третираних мелатонином (слика 4.16А) показала је да третман контролних пацова није довео до промена у имунопозитивности једра, карактеристичној за контролне услове, за разлику од дијабетичних пацова код којих је смањена имунопозитивност у цитоплазми, а повећана у једру. Овом анализом указано је да третман мелатонином утиче на задржавање протеина HMGB1 унутар једара ћелија јетри дијабетичних пацова.

На сличан начин, имунохистохемијска анализа ткивних препарата јетри изолованих из контролних, дијабетичних и пацова третираних етил пируватом (слика 4.16.Б) показала је да овај инхибитор секреције HMGB1 доводи до задржавања HMGB1 протеина у једру ћелија јетри дијабетичних пацова, иако је детектована слаба имунопозитивност и у цитоплазми. Овом анализом указано је да третман етил пируватом такође утиче на задржавање протеина HMGB1 унутар једара ћелија јетри дијабетичних пацова.



Слика 4.16. Унутарћелијска локализација НМГВ1 у јетри пацова третираних мелатонином или етил пируватом. (А) Имунохистохемијска анализа присуства протеина НМГВ1у ћелијама јетре пацова третираних мелатонином. (Б) Имунохистохемијска анализа присустваа протеина НМГВ1 у ћелијама јетре пацова третираних етил пируватом. К – контролна група, D – дијабетична група, К+М – контролна група третирана мелатонином, D+М – дијабетична група третирана мелатонином, К+ЕП – контролна група третирана етил пируватом, D+ЕП – дијабетична група третирана етил пируватом. Врх стрелице – имунообојеност једра, стрелица – имунообојеност цитоплазме. Увећање x40

У циљу потврђивања имунохистохемијски детектованих промена субћелијске локализације HMGB1 након третмана мелатонином или етил пируватом, вршена је имуноблот анализа једарних и цитоплазматских екстракта ћелија јетре, али и укупних хомогената јетре и серума (слика 4.17).



Слика 4.17. Редистрибуција и унутарћелијска локализација HMGB1 протеина. (А) Имуноблот анализа протеина једарног екстракта, цитоплазматског екстракта, , укупних хомогената ћелија јетри и серума пацова третираних мелатонином на присуство HMGB1. (Б) Графички приказ квантификације детектованих трака. (В) Имуноблот анализа протеина једарног екстракта, цитоплазматског екстракта, укупних хомогената ћелија јетри и серума пацова третираних етил пируватом на присуство HMGB1. (Г) Графички приказ квантификације детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+M – контролна група третирана мелатонином, D+M – дијабетична група третирана мелатонином, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; б, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

Третман дијабетичних пацова мелатонином (слика 4.17А) довео је до значајних промена на нивоу присутности НМGB1 у свим испитиваним ћелијским фракцијама и серуму. Мелатонин је код дијабетичних пацова довео до смањеног изласка НМGB1 из једра, о чему сведочи повећање нивоа овог протеина у једарном екстракту за око 3,9 пута ($p < 0,05$), као и смањење његовог нивоа у цитоплазматском екстракту за 40% ($p < 0,05$), у односу на вредности добијене за дијабетичну групу. Детектовано је такође и значајно ($p < 0,05$) смањење присуства НМGB1 у хомогенату јетре (36%) и серуму (30%) (слика 4.17Б) .

Третман дијабетичних пацова етил пируватом (слика 4.17В) повећао је присуство НМGB1 протеина у једарном екстракту за око 1,7 пута ($p < 0,05$), као и у цитоплазматском екстракту за 1,2 пута ($p < 0,05$). Ове промене праћене су смањењем нивоа НМGB1 у хомогенату јетре за око 41% ($p < 0,05$) и у серуму за 31% ($p < 0,05$), у поређењу са дијабетичном групом животиња (слика 4.17Г).

На основу приказаних резултата може се закључити да обе врсте третмана доводе до смањеног присуства НМGB1 протеина у серуму и јетри дијабетичних пацова.

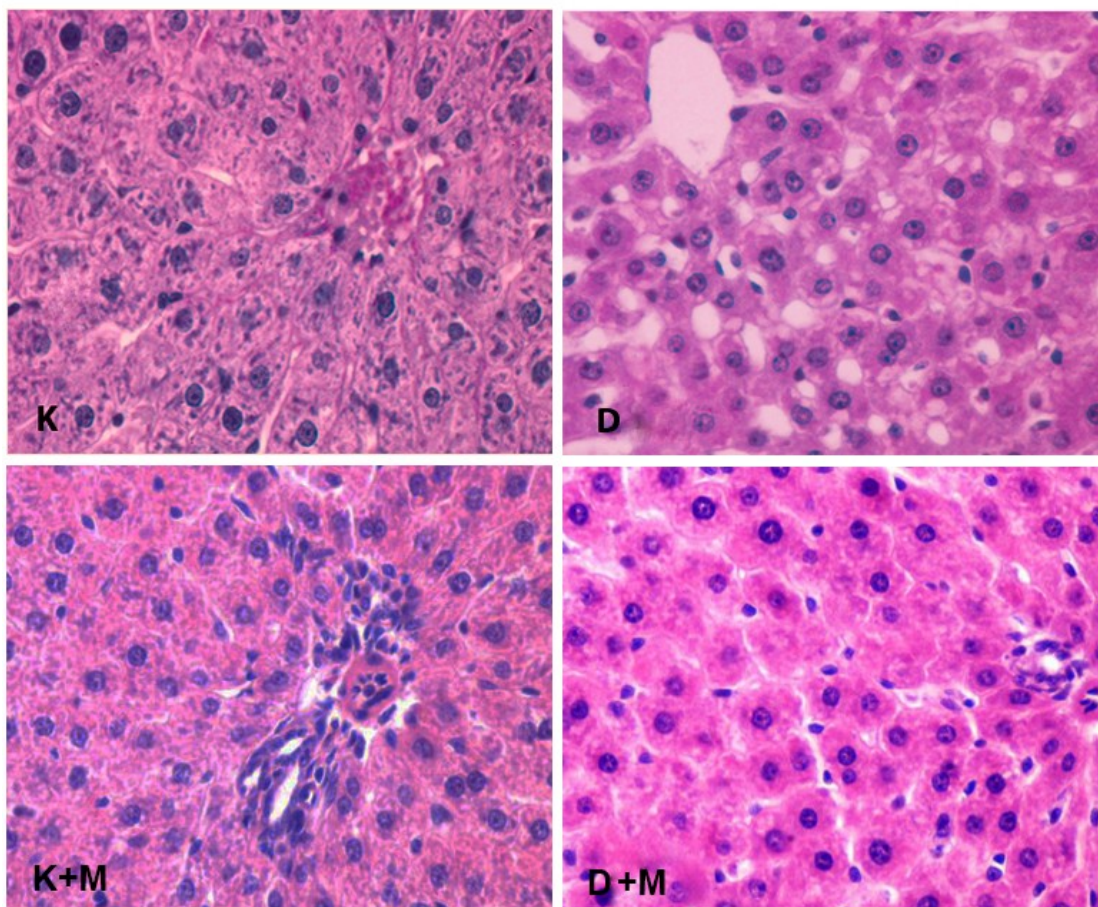
4.4.2. Протективни ефекти мелатонина и етил пирувата на јетру дијабетичних пацова

Са циљем да ниво присутности НМGB1 у јетри и ванћелијској средини корелишемо са патолошким променама детектованим у јетри пацова са ДТ1, након третмана дијабетичних пацова мелатонином или етил пируватом, вршена је хистолошка анализа јетре, као и њен оксидативни и инфламацијски статус.

4.4.2.1 Хистолошка анализа ткива јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом

Хистолошка анализа јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином (слика 4.18) показала је значајно побољшање стања јетре у односу на стање јетре

дијабетичне групе. Третман мелатонином довео је до нормализације структуре јетре, минималне дегенерације ћелија јетре (степен 1, оштећење <5%) и значајног смањења некрозе (степен 1, заступљеност некрозе <5% ћелија) (табела 3).



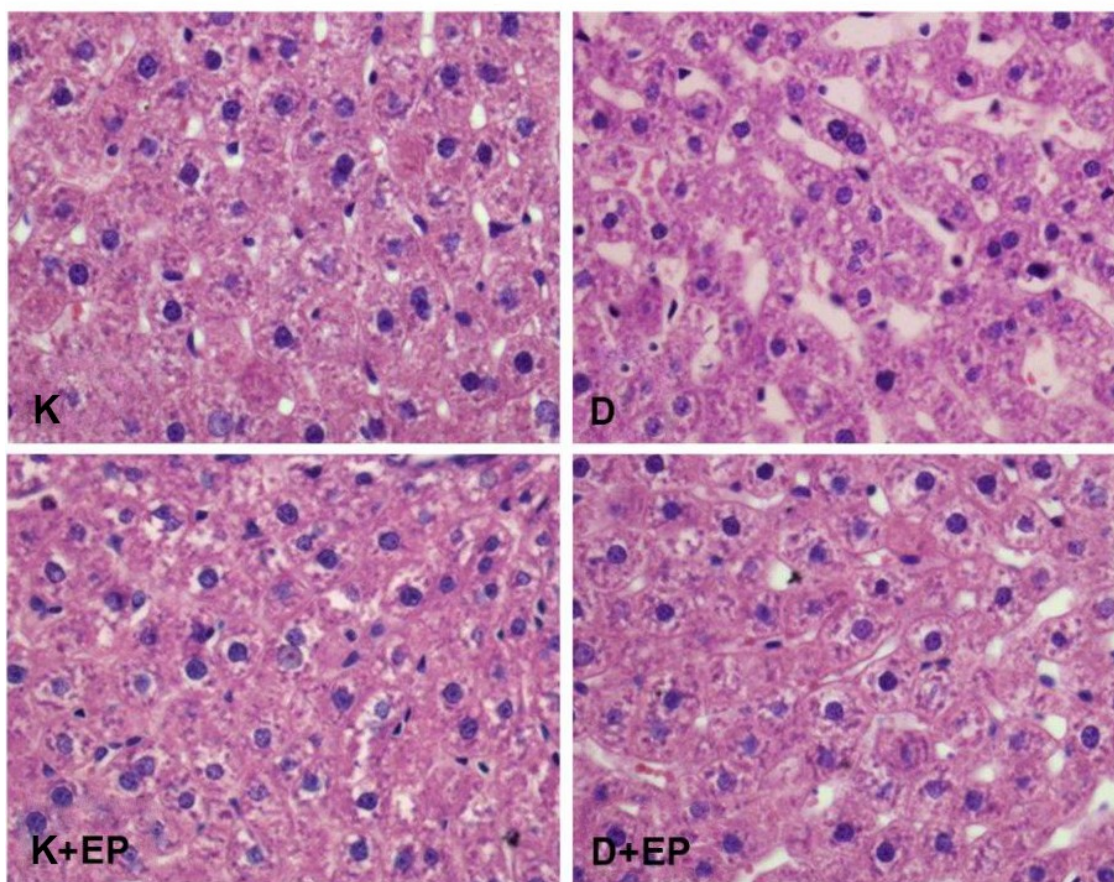
Слика 4.18. Пресеци ткива јетре пацова. Репрезентативне слике пресека ткива јетре пацова третираних мелатонином. К – контролна група, D – дијабетична група, К+М – контролна група третирана мелатонином, D+М – дијабетична група третирана мелатонином. Увећање x40.

Табела 3. Утицај третмана мелатонином на степен хидропсне дегенерације ћелија јетре пацова и некрозе током дијабетеса

	К	D	К+М	D+М
Дегенерација ћелија јетре	1	4	1	1
	<5%	>50%	<5%	<5%
Некроза	0	2	0	1
	0%	5-25%	0%	<5%

Промене су одређиване по методи Lobenhofe и сарадника (Lobenhofe и сар., 2006):1 – минималне промене (мање од 5% ћелија), 2 – умерене промене (5-25% ћелија), 3 – јаке промене (26-50% ћелија) и 4 – интензивне промене (преко 50% ћелија). К – контролна група, D – дијабетична група, К+М – контролна група третирана мелатонином, D+М – дијабетична група третирана мелатонином.

Хистолошка анализа јетре дијабетичних пацова (слика 4.19) третираних етил пируватом такође је довела до очувања структуре ткива јетре, цитоплазма ћелија је хомогена, присутна је минимална вакуолизација и значано је смањен број некротичних и Купферових ћелија.



Слика 4.19. Пресеци ткива јетре пацова. Репрезентативне слике пресека ткива јетре пацова третираних етил пируватом. К – контролна група, D – дијабетична група, К+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Увећање x40

Побољшање општег стања јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом и смањено присуство оштећења у њој потврђено је и анализом присуства маркера оштећења, ALT и AST, у серуму. Третмани дијабетичних пацова било мелатонином или етил пируватом довели су до значајног смањења активности обе трансминазе. Активност ALT код третираних дијабетичних пацова смањена је за око 46% ($p < 0,05$), а активност AST око 39% ($p < 0,05$) у поређењу са дијабетичном групом (табела 4). Активност ALT код дијабетичних пацова третираних етил пируватом смањена је око 43% ($p < 0,05$), а активност AST за око 54% ($p < 0,05$), у поређењу са дијабетичном групом (табела 4). Измерене вредности за ALT и AST указују на побољшање стања јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом.

Табела 4. Промене активности AST и ALT у серуму дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом

	K	D	K+M	D+M	K+EP	D+EP
ALT (U/l)	50,2±3,1	172,8±6,5 ^a	49,2±2,4	92,3±11,4 ^{a,b}	57,9±2,4	98,2±12,8 ^{a,b}
AST (U/l)	187,9±18,2	453,1±22,4 ^a	189,9±12,4	274,8±13,5 ^{a,b}	222,9±10,1	210,8±15,2 ^b

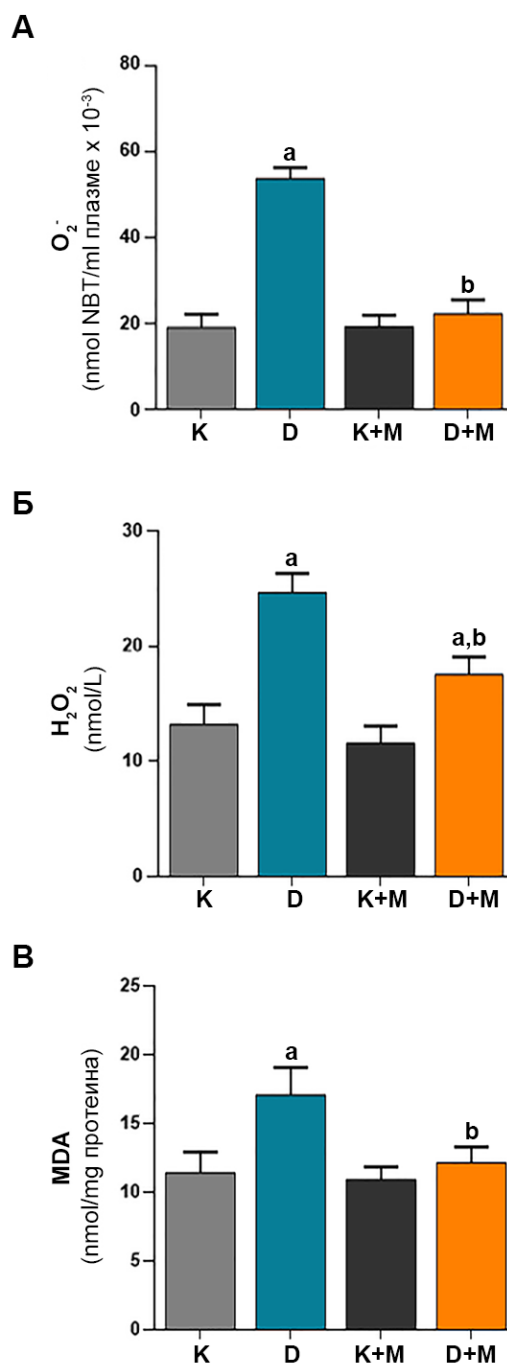
K – контролна група, D – дијабетична група, K+M – контролна група третирана мелатонином, D+M – дијабетична група третирана мелатонином, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

На основу приказаних резултата може се закључити да смањено ванћелијско присуство HMGB1 протеина, узроковано третманима мелатонином или етил пируватом, корелише са побољшањем општег стања јетре.

4.4.2.2. Оксидативни статус јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом

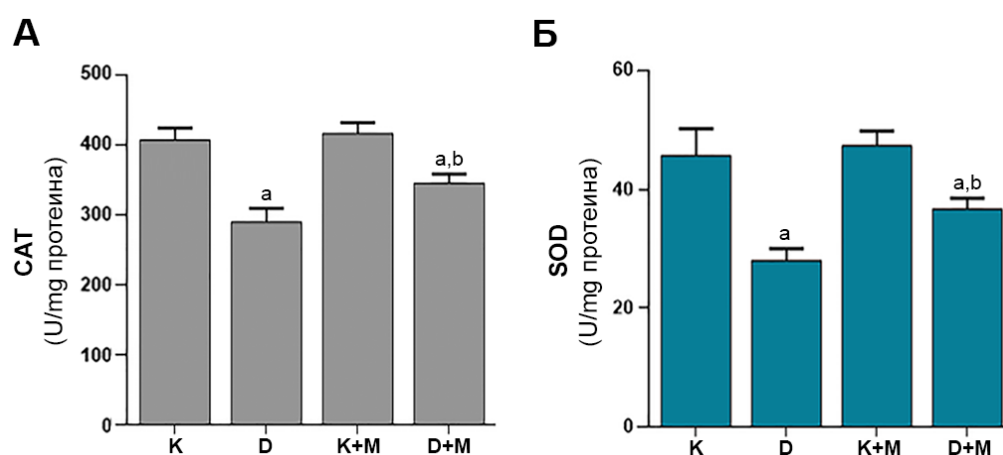
Како је мелатонин антиоксиданс, а етил пируват испољава антиоксидативне ефекте, оксидативни статус јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом анализиран је преко промена у концентрацији реактивних врста, липидне пероксидације и активности или експресије антиоксидативних ензима.

Концентрација супероксид анјон радикала и водоник пероксида у јетри дијабетичних пацова третираних мелатонином смањена је за 59% ($p < 0,05$), односно 27% ($p < 0,05$), у односу на вредност концентрације супероксид анјон радикала и водоник пероксида у јетри дијабетичних пацова (слика 4.20). Измерена концентрација липидних пероксида у јетри дијабетичних пацова третираних мелатонином смањена је такође за 30% ($p < 0,05$) у односу на вредност добијену за јетру дијабетичних пацова.



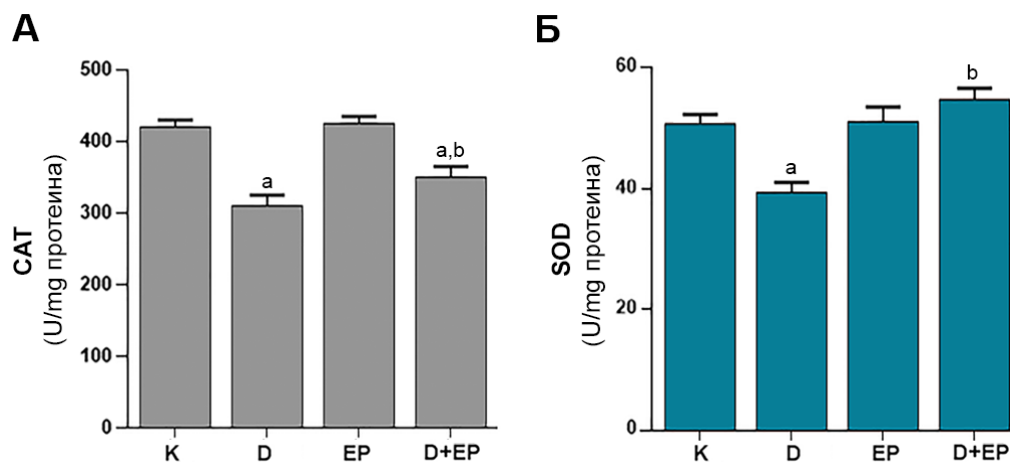
Слика 4.20. Оксидативни статус јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином. (А) Утицај третмана мелатонином на концентрацију O_2^- . (Б) Утицај третмана мелатонином на концентрацију H_2O_2 . (В) Утицај третмана мелатонином на концентрацију MDA. К – контролна група, D – дијабетична група, K+M – контролна група третирана мелатонином, D+M – дијабетична група третирана мелатонином. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

Будући да мелатонин може модификовати активност антиоксидативних ензима, испитивано је дејство мелатонина на систем антиоксидативне заштите јетре дијабетичних пацова, мерењем активности антиоксидативних ензима (CAT, SOD) у хомогенатима јетре пацова. На основу приказаних резултата на слици 4.21 уочава се да је третман дијабетичних пацова мелатонином довео до пораста активности CAT за 1,2 пута ($p < 0,05$) као и укупне SOD за 1,3 пута ($p < 0,05$), у односу на вредности измерених код дијабетичне групе.



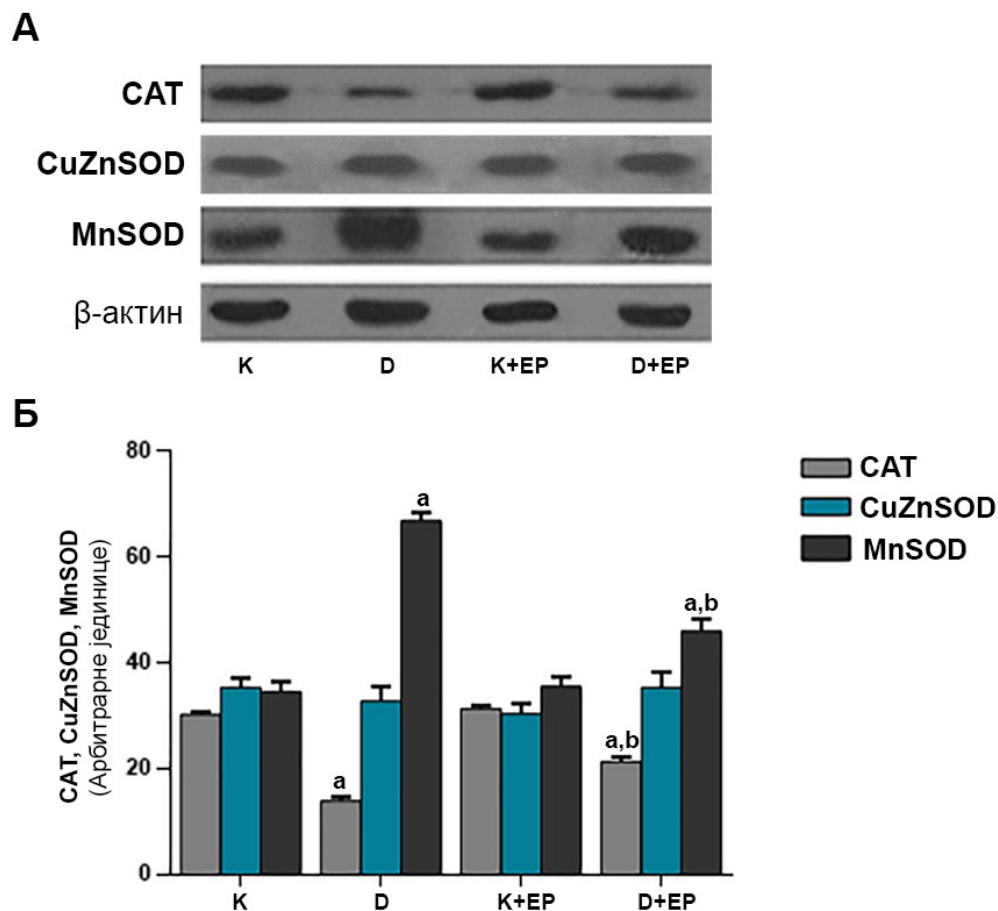
Слика 4.21. Утицај третмана мелатонином на активности антиоксидативних ензима у јетри пацова са STZ-индукованим дијабетесом. (А) Промена активности CAT у јетри пацова. (Б) Промена активности SOD у јетри пацова. К – контролна група, D – дијабетична група, K+M – контролна група третирана мелатонином, D+M – дијабетична група третирана мелатонином. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

Резултати мерења активности антиоксидативних ензима у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом такође показују да су активности CAT (слика 4.22А) и укупног SOD (слика 4.22Б), повећане за 17,3% ($p < 0,05$), односно 40,2% ($p < 0,05$) у поређењу са вредностима добијеним за дијабетичне пацове (слика 4.22).



Слика 4.22. Утицај третмана етил пируватом на промену активности антиоксидативних ензима у јетри пацова са STZ-индукованим дијабетесом. (А) Промена активности CAT у јетри пацова. (Б) Промена активности SOD у јетри пацова. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

За промене у активности CAT и SOD могу бити одговорне и промене у њиховој присутности (слика 4.23А). Имуноблот анализа укупних хомогената јетре дијабетичних пацова показала је готово двоструко смањење ($p < 0,05$) у експресији CAT (слика 4.23Б) и двоструко повећање ($p < 0,05$) у експресији MnSOD (слика 4.23Б), док је ниво експресије CuZnSOD био непромењен у односу на контролну групу. У поређењу са дијабетичним пацовима, дијабетични пацови третирани етил пируватом показали су повећање експресије протеина CAT за 1,5 пут ($p < 0,05$) и смањење експресије MnSOD за 30% ($p < 0,05$) (слика 4.23Б). Из ових резултата може се закључити да су активност и експресија CAT у корелацији док активност SOD поред експресије одређују и други догађаји.

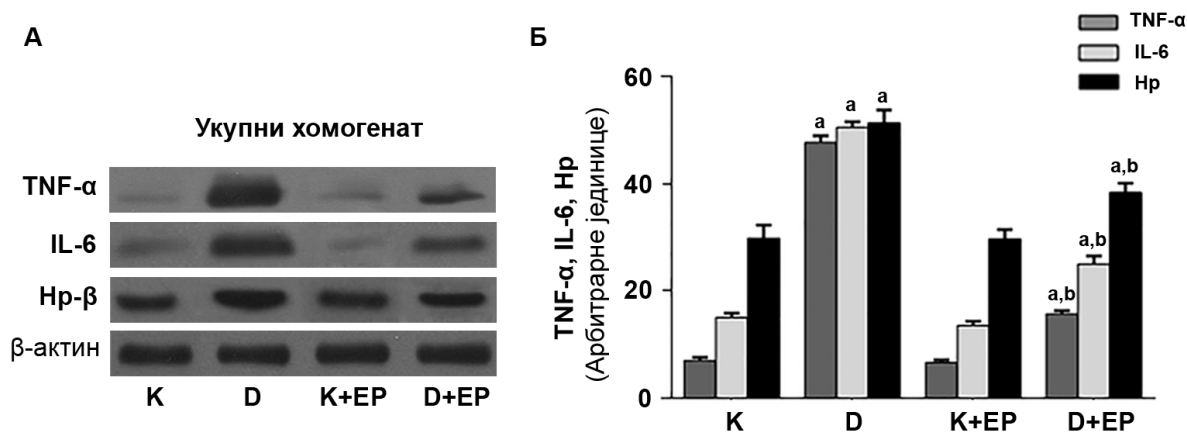


Слика 4.23. Утицај третмана етил пируватом на промену протеинског нивоа антиоксидативних ензима у јетри пацова са STZ-индукованим дијабетесом. (A) Имуноблот анализа укупних хомогената јетри пацова на присуство CAT, CuZnSOD и MnSOD. (Б) Графички приказ квантификације детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

На основу приказаних резултата може се закључити да смањено ванћелијско присуство HMGB1 протеина, узроковано третманима мелатонином или етил пируватом, корелише са смањењем оксидативног стреса што наводи на закључак да овај стрес лежи у основи увећања експресије HMGB1 протеина како у јетри тако и у циркулацији.

4.4.2.3. Инфламацијски статус јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом

Дијабетес је стање слабе, хроничне инфламације коју карактерише увећано присуство циркулишућих проинфламацијских цитокина и акутно фазних протеина чија је експресија регулисана овим цитокинима (Devaraj и сар., 2007). Будући да етил пируват примарно остварује антиинфламацијске ефекте, делом и преко смањења нивоа HMGB1 у ванћелијској средини (Ulloa и сар., 2002), испитивано је дејство третмана етил пируватом на ниво TNF- α и IL-6, као и на ниво акутно-фазног протеина хаптоглобина (H ρ). Имуноблот анализа хомогената јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом (слика 4.24) показала је смањење увећаног нивоа TNF- α за 68% ($p < 0,05$) и смањење увећаног нивоа IL-6 за 53% ($p < 0,05$), у поређењу са дијабетичном групом. Имуноблот анализа протеина укупних хомогената јетре пацова са одговарајућим антителом на H ρ (слика 4.24A) показала је значајно повећање нивоа H ρ - β субјединице у јетри дијабетичних пацова (1,7 пута, $p < 0,05$), у поређењу са контролном вредношћу (слика 4.24B). Након третмана дијабетичних пацова етил пируватом, ниво H ρ - β смањен је за 33% ($p < 0,05$), у односу на дијабетичну групу.



Слика 4.24. Инфламацијски статус јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом. (А) Имуноблот анализа укупних хомогената јетри пацова на присуство TNF- α , IL-6 и H ρ - β . (Б) Графички приказ квантификације детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

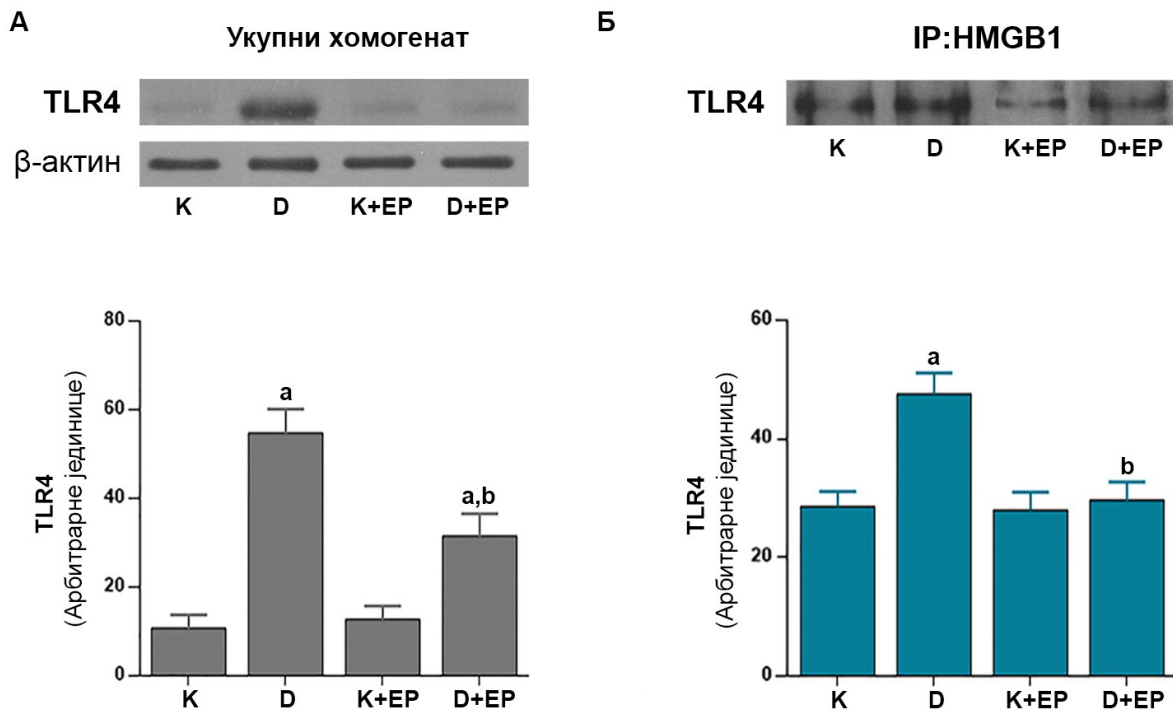
На основу ових резултата може се закључити да смањено ванћелијско присуство HMGB1 протеина, узроковано третманом са етил пируватом, корелише са смањењем инфламације јетре што наводи на закључак да увећана експресија и ванћелијско присуство HMGB1 протеина може да доприноси одржавању хроничне инфламације у дијабетесу.

4.4.3. Улога HMGB1 у инфламацији јетре пацова са ДТ1

4.4.3.1. Интеракције HMGB1 протеина са TLR4 рецептором

Ванћелијски HMGB1 интеракцијом са TLR4 рецептором може покретати инфламацијске путеве у ћелији (Yang и сар., 2015). Стога је најпре испитиван ниво TLR4 у укупним хомогенатима ткива јетре дијабетичних пацова и дијабетичних пацова код којих је ниво HMGB1 смањен третманом са етил пируватом. Имуноблот анализа са одговарајућим антителом на TLR4 показала је значајно повећање нивоа TLR4 у јетри дијабетичних пацова за 5,5 пута ($p < 0,05$), у поређењу са нивоом TLR4 у јетри контролних животиња (слика 4.25А). Након третмана дијабетичних пацова етил пируватом ниво TLR4 смањен је за 42% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.25А).

Методом ко-имунопреципитације даље је испитивана интеракција протеина HMGB1 и рецептора TLR4. Имунопреципитацију протеина HMGB1, вршену одговарајућим антителом на HMGB1 из укупних хомогената јетре, пратила је имуноблот анализа добијених преципитата са одговарајућим антителом на TLR4 (слика 4.25Б). Квантификацијом добијених трака уочено је повећање интеракције између ова два протеина код дијабетичних пацова, за 1,7 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролном групом (слика 4.25Б). Насупрот томе, интеракција HMGB1 и TLR4 смањена је готово на контролни ниво након третмана дијабетичних пацова етил пируватом (слика 4.25Б).

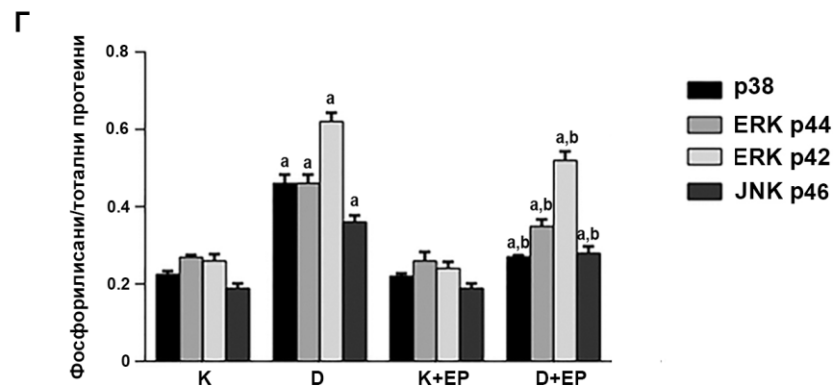
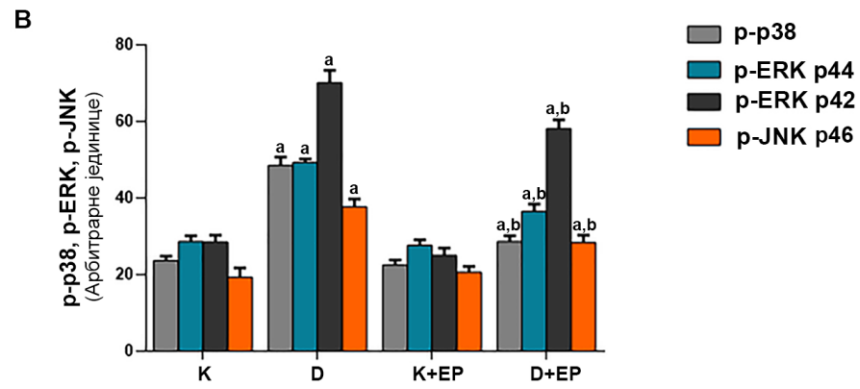
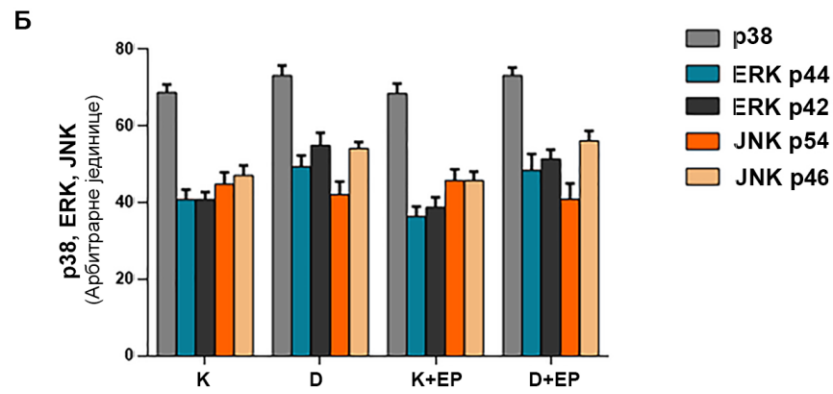
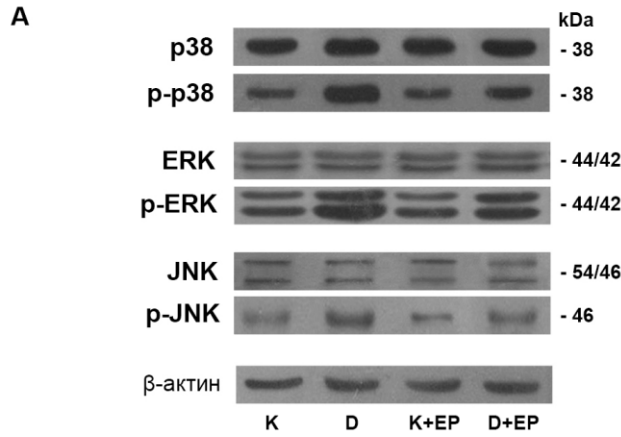


Слика 4.25. Интеракција протеина HMGB1 са TLR4 рецептором. (А) Имуноблот анализа протеина укупних хомогената јетри пацова на присуство TLR4 током дијабетеса са графичким приказом добијених промена. (Б) Имуноблот анализа имунопреципитата, добијених из укупних хомогената јетре уз коришћење анти-HMGB1 антитела, на присуство TLR4, са графичким приказом добијених промена. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

4.4.3.2. HMGB1-TLR4 посредована активација MAP киназа у јетри дијабетичних пацова

MAP киназе (p38, JNK, ERK1/2) играју кључне улоге у унутарћелијским догађајима посредованим TLR4 рецептором. Стога је испитивано да ли промене у нивоу интеракције између HMGB1 и TLR4 утичу на активацију p38, JNK и ERK1/2 у јетри дијабетичних пацова. Имуноблот анализа цитоплазматских екстраката ћелија

јетре није открила никакве промене у нивоу укупних форми ових протеина у јетри дијабетичних пацова, без обзира на то да ли јесу или нису били третирани етил пируватом (слика 4.26Б). Међутим, како се све три врсте киназа активирају фосфорилацијом, са циљем да се испита њихова активност у јетри пацова са дијабетесом и добијене промене разумеју у контексту HMGB1/TLR4 интеракције, вршена је имуноблот анализа на присуство фосфорилисаних форми p38, JNK и ERK1/2 (слика 4.26А). Показано је да је повећан ниво интеракције између HMGB1 и TLR4 праћен повећањем активације p38 и JNK за 2 ($p < 0,05$), односно 1,9 пута ($p < 0,05$), у дијабетичној јетри пацова (слика 4.26В) у поређењу са контролним вредностима. Такође је детектована повећана фосфорилација изоформи ERK од 42 kDa и 44 kDa, за око 2,4 пута ($p < 0,05$), односно 1,7 пута ($p < 0,05$). Смањење нивоа интеракције између HMGB1 и TLR4 након третмана етил пируватом довео је до статистички значајног ($p < 0,05$) смањења активације p38, JNK и обе ERK изоформе, од 42 kDa и 44 kDa, за 1,7-, 1,3-, 1,2-, односно 1,3 пута, у поређењу са дијабетичним пацовима (слика 4.26В). На слици 4.26Г дат је и графички приказ односа фосфорилисаних и тоталних форми p38, ERK1/2, JNK.



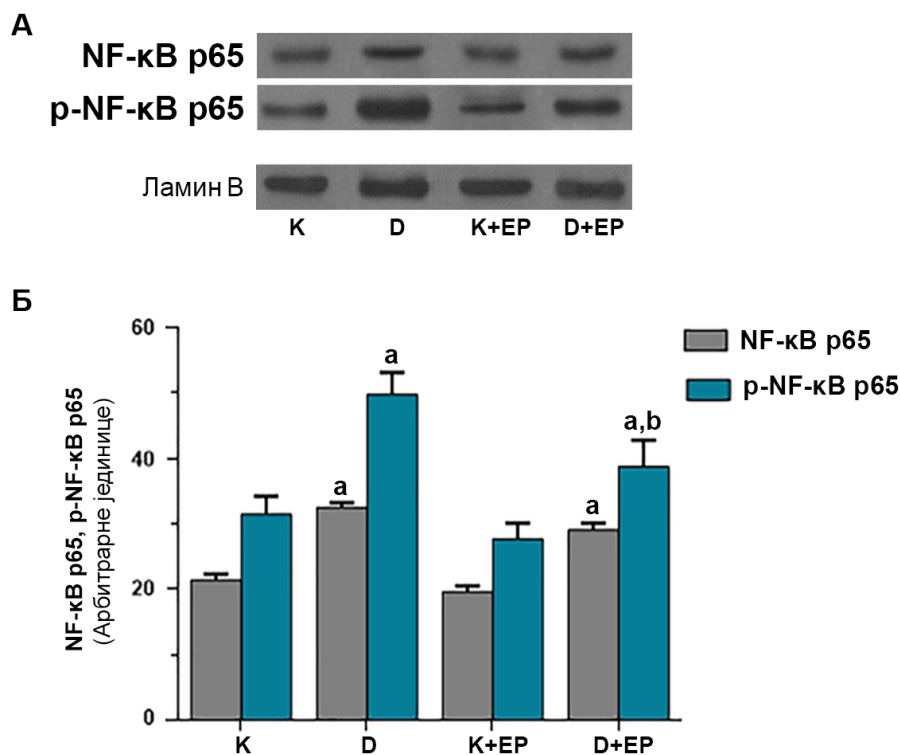
Слика 4.26. HMGB1-TLR4 посредована активација MAP киназа у јетри дијабетичних пацова. (А) Имуноблот анализа цитоплазматских екстраката ћелија јетри пацова на присуство укупних и фосфорилисаних форми p38, ERK1/2, JNK. (Б) Графички приказ квантификације детектованих p38, ERK1/2, JNK. (В) Графички приказ квантификације детектованих p-p38, p-ERK1/2, p-JNK1/2. (Г) Графички приказ односа фосфорилисаних и тоталних форми p38, ERK1/2, JNK. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; б, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

4.4.3.3. HMGB1-TLR4 посредована активација једарног NF- κ B p65 у јетри дијабетичних пацова

Активација свих MAP киназа посредована TLR4 рецептором завршава се активацијом транскрипционог фактора NF- κ B p65 и његовом транслокацијом у једро где учествује у регулацији експресије многих гена укључујући и оне који кодирају инфламацијске цитокине TNF- α и IL-6, акутно-фазни протеин Hp и антиоксидативни ензиме, CAT и CuZn/MnSOD (Bhatt и Ghosh, 2014). Стога је имуноблот анализом испитивано да ли промене у нивоу интеракције између HMGB1 и TLR4 утичу на активацију NF- κ B p65 у јетри дијабетичних пацова (слика 4.27А).

Имуноблот анализа једарних екстраката открила је повећан ниво укупног протеина NF- κ B p65 у једру дијабетичних пацова за 1,5 пута ($p < 0,05$) у односу на контролну вредност. Третман дијабетичних пацова етил пируватом није довео до статистички значајних промена нивоа NF- κ B p65 у односу на дијабетичну групу (слика 4.27Б).

Са циљем да се испита активност NF- κ B p65 у јетри пацова са дијабетесом вршена је имуноблот анализа на присуство фосфорилисане форме овог протеина. Показано је да је у ћелијама јетре дијабетичних пацова ниво фосфорилисане форме NF- κ B p65 повећан 1,6 пута ($p < 0,05$) на нивоу једра, у односу на контролни ниво. Насупрот томе, третман етил пируватом смањивао је ниво активне форме овог протеина у једру дијабетичних пацова за око 30% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.27Б).



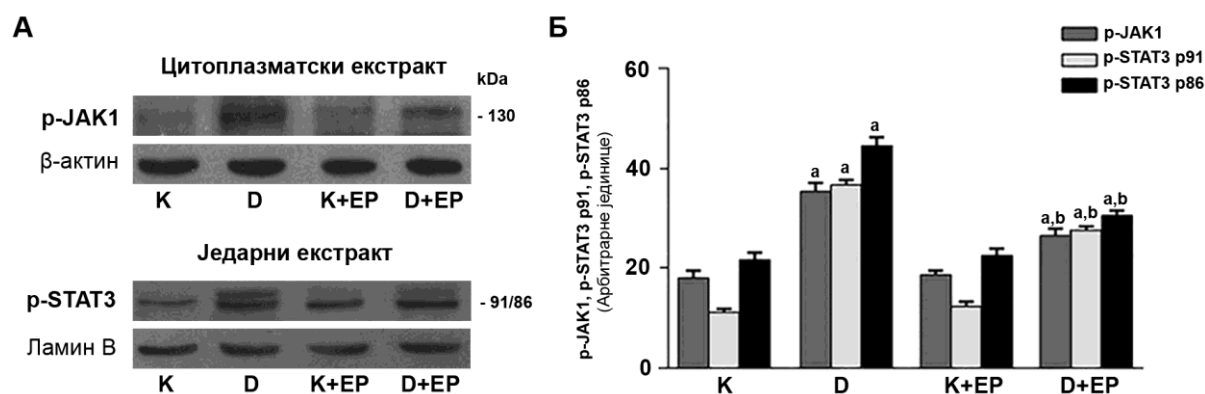
Слика 4.27. HMGB1-TLR4 посредована активација једарног NF-κB p65 у јетри дијабетичних пацова. (A) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетри пацова на присуство укупне и фосфорилисане форме NF-κB p65. (Б) Графички приказ квантификације детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

4.4.3.4. HMGB1-TLR4 посредована активација JAK1/STAT3 сигналног пута у јетри пацова са дијабетесом

STAT3 је један од главних транскрипционих фактора укључених у индуковану транскрипцију гена за Hp (Grigorenko и сар., 2000). Примарно се активира у одговор на IL-6 који везивањем за IL-6 покреће сигналну каскаду активације JAK киназа. У новијој литератури описана је и повезаност активације JAK1/STAT3 сигнализације посредством активације рецептора TLR4 са HMGB1 (Ying и сар., 2013). Стога је следећи корак истраживања био усмерен ка испитивању корелације

између промена у нивоу интеракција између HMGB1 и TLR4 и активације сигналног пута JAK1/STAT3 у јетри дијабетичних пацова.

Имуноблот анализа цитоплазматских екстраката ћелија јетре (слика 4.28А) показала је да код дијабетичних пацова долази до активације JAK1, с обзиром на 3,3 пута ($p < 0,05$) повећан ниво фосфорилисаности JAK1 у односу на контролни ниво (слика 4.28В). Активација JAK1 праћена је увећаним присуством фосфорилисаних STAT3 изоформи у једарним екстрактима, и то STAT3 од 91 kDa за 3,3 пута ($p < 0,05$) и STAT3 од 86 kDa за 2 пута ($p < 0,05$). Смањен ниво интеракција између HMGB1 и TLR4 у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом прати смањење активације JAK1 за 20% ($p < 0,05$) и смањено присуство фосфорилисане STAT3 изоформе од 91 kDa за 25% ($p < 0,05$) и фосфорилисане STAT3 изоформе од 86 kDa за 32% ($p < 0,05$), у поређењу са дијабетичним пацовима (слика 4.28Б).

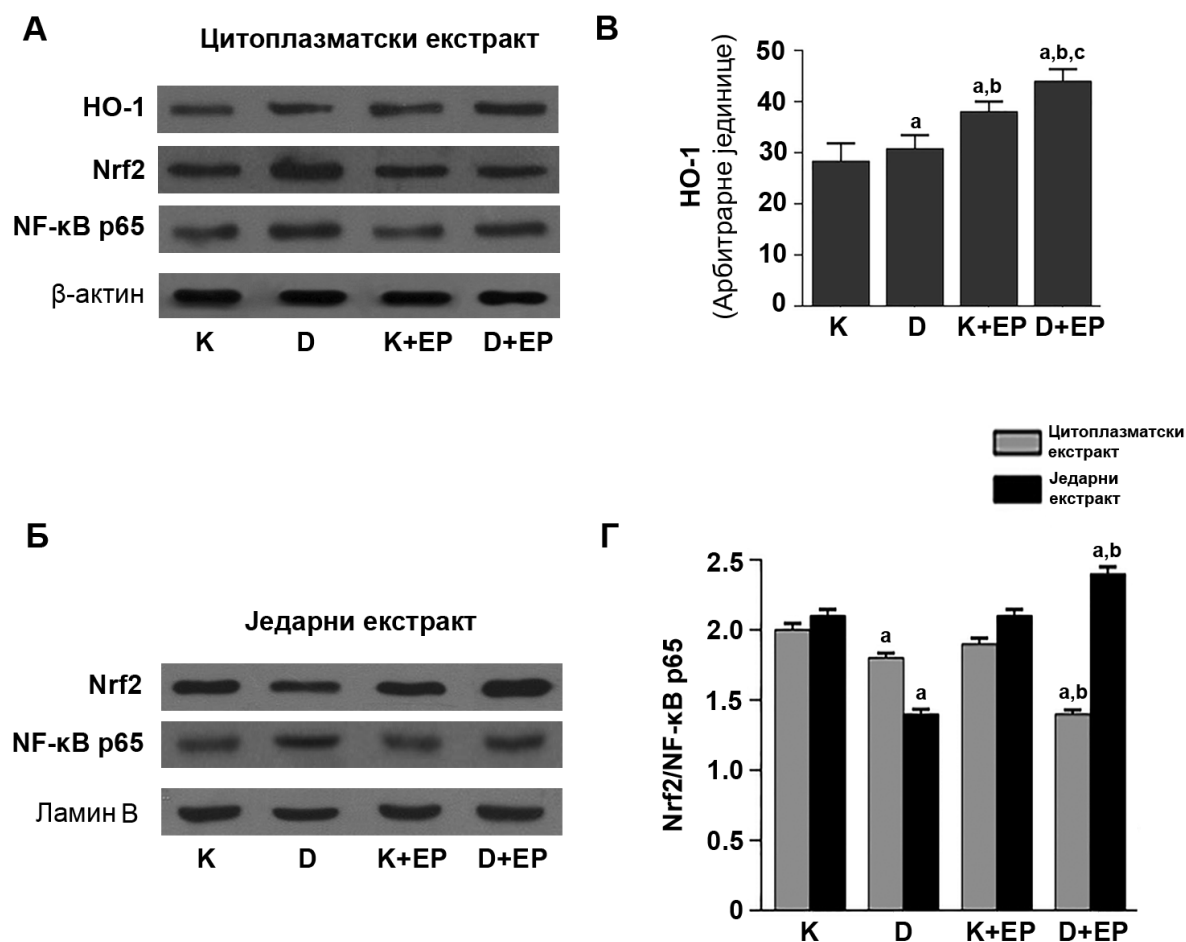


Слика 4.28. HMGB1-TLR4 посредована активација JAK1/STAT3 сигналног пута у јетри пацова са дијабетесом. (А) Имуноблот анализа цитоплазматских екстраката ћелија јетри пацова на присуство фосфорилисане форме JAK1 и једарних екстраката на присуство фосфорилисане форме STAT3 протеина. (Б) Графички приказ квантификације детектованих p-JAK1 и p-STAT3. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; б, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

4.4.3.5. HMGB1-TLR4 интеракције, Nrf2 сигнализација и експримираност HO-1 у јетри дијабетичних пацова

Стално присуство оксидативног стреса који подстиче инфламацијски одговор током дијабетеса, последица је смањења активности антиоксидативних ензима али и смањења транскрипције гена који их кодирају. Nrf2 је транскрипциони фактор који учествује у регулацији транскрипције антиоксидативних гена, као што су CAT и HO-1, али је познат и као инхибитор активности NF-κB p65 (Liu и сар., 2008). Бројни докази говоре у прилог томе да повећан ниво HO-1 доприноси смањењу оштећења ћелија и стишавању инфламације (Alcaraz и сар., 2004), као и да негативно регулише HMGB1 у стањима инфламације (Park и сар., 2013). Да би се испитало да ли повећан ниво протеина HMGB1 током дијабетеса делује негативно на цитопротективни одговор, подстицањем инфламацијског пута (NF-κB p65), имуноблот методом анализиран је ниво Nrf2 у једарним екстрактима ћелија јетре дијабетичних пацова, као и ниво HO-1 у цитоплазматским екстрактима и одређиван је однос између Nrf2 и NF-κB p65 у једру (слика 4.29). Имуноблот анализом је утврђено да је ниво Nrf2 у цитоплазматском екстракту јетре дијабетичних пацова повећан 1,25 пута ($p < 0,05$) у поређењу са контролном групом (слика 4.29A). Имајући у виду да NF-κB p65 негативно регулише Nrf2, одређен је однос Nrf2 и NF-κB p65 (Слика 4.29Г). Уочава се да њихов однос није значајно промењен на нивоу цитоплазматског екстракта дијабетичних пацова, упркос релативном повећању нивоа NF-κB p65 (1,4 пута, $p < 0,05$) у цитоплазматској фракцији. У једарном екстракту дијабетичне групе, експресија NF-κB p65 повећана је 1,23 пута ($p < 0,05$), што за резултат има смањење Nrf2/NF-κB p65 односа за 34% ($p < 0,05$), у поређењу са контролним вредностима. Ниво HO-1 у цитоплазматској фракцији дијабетичне групе је на нивоу контроле. Третман контролних животиња етил пируватом није довео до значајних промена Nrf2/NF-κB p65 односа, како у цитоплазматској, тако и у једарној фракцији, док се ниво HO-1 у цитоплазматској фракцији повећао 1,3 пута ($p < 0,05$) (слика 4.29B). Третман дијабетичних животиња етил пируватом довео је до смањења нивоа Nrf2 за 29% ($p < 0,05$) у цитоплазматском екстракту, у поређењу са контролном групом.

Насупрот томе, у једарном екстракту ниво Nrf2 се повећао за 50% ($p < 0,05$) у поређењу са контролом. Сходно томе, Nrf2/NF- κ B p65 однос се смањио за 23% ($p < 0,05$) у цитоплазматском екстракту, а повећао у једарном екстракту 1,7 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролом. Третман дијабетичних пацова етил пируватом довео је до повећања нивоа HO-1 у цитоплазматском екстракту јетре, 1,4 пута ($p < 0,05$), у односу на вредност контроле (слика 4.29В).



Слика 4.29. Nrf2 сигнализација и експримираност HO-1 у јетри дијабетичних пацова. (А) Имуноблот анализа цитоплазматских екстраката ћелија јетри пацова на присуство HO-1, Nrf2 и NF- κ B p65. (Б) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетри пацова на присуство Nrf2 и NF- κ B p65. (В) Графички приказ квантификације детектованих HO-1. (Г) Графички приказ односа Nrf2 и p-NF- κ B p65 у цитоплазми и једру. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; а, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; б, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

На основу приказаних резултата истраживања уочава се да увећано ванћелијско присуство HMGB1 протеина у дијабетесу и његове интеракције са TLR4 корелишу са увећаном активацијом MAPK и JAK1 киназа и њима посредованом активацијом NF- κ B p65 и STAT3 транскрипционих фактора, одговорних за увећану продукцију TNF- α , IL-6 и Ир. Истовремено он редукује активност Nrf2 транскрипционог фактора и доприноси смањењу продукције антиоксидативних ензима. Ови резултати сугеришу да ванћелијски HMGB1 доприноси одржавању оксидативног стреса и хроничног инфламацијског стања у јетри током дијабетеса, а тиме доприноси настанку и прогресији оштећења у њој.

4.4.4. Утицај HMGB1 на регенеративни капацитет јетре пацова са ДТ1

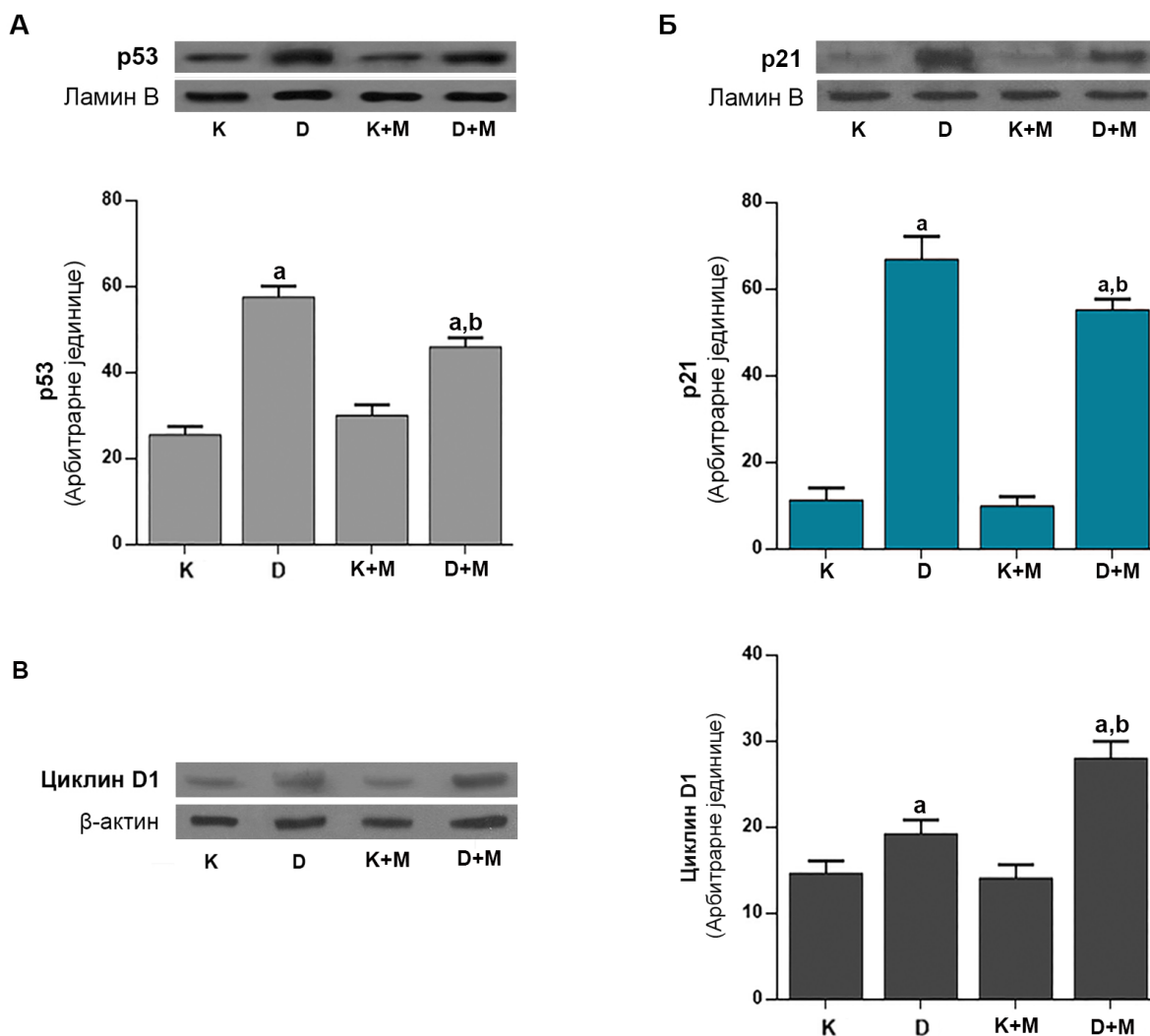
Ткиво јетре дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом одликује се бољим општим стањем у односу на дијабетичну групу. Хистопатолошка анализа ткивних пресека јетре показала је присуство двоједарних ћелија, како у јетри дијабетичних пацова, тако и у јетри дијабетичних пацова третираних мелатонином или етил пируватом (слика 4.18, слика 4.19), што говори о присуству регенерације ткива јетре. Како са хистолошких препарата није било могуће квантификовати разлике у регенеративном капацитету анализирани су сигнални путеви контролисани HMGB1/TLR4 осом. Из литературе је познато да MAP киназе (p38, ERK1/2 и JNK) у присуству оксидативног стреса могу деловати на активацију p53-p21 пута који утиче на заустављање ћелијског циклуса у G1 фази (Dequabin и сар., 2016; She и сар., 2000). Како приказани резултати у одељку 4.4.3.2 показују повећану активацију MAP киназа код дијабетичних пацова, испитивано је да ли смањење нивоа ванћелијског HMGB1 у јетри дијабетичних пацова делује на присуство протеина p53, p21, али и циклина D1, кључног за прелазак ћелије из G1 у S фазу ћелијског циклуса.

4.4.4.1. Ефекат третмана мелатонином или етил пируватом на ниво p53, p21 и циклина D1 у јетри пацова са дијабетесом

Са циљем да се испита деловање третмана мелатонином на ниво p53 у једарном екстракту ћелија јетре дијабетичних пацова, вршена је имуноблот анализа протеина са одговарајућим антителом на p53 (слика 4.30А). Добијени резултати указују на значајно повећање нивоа овог протеина у једарном екстракту ћелија јетри дијабетичних пацова, за 2,3 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролном вредношћу. Након третмана дијабетичних пацова мелатонином ниво p53 смањен је за 20% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.30А).

Будући да услед ДНК оштећења индукција протеина p21 од стране p53 доводи до заустављања ћелијског циклуса (He и сар., 2005), имуноблот анализом са одговарајућим антителом за p21 испитивано је деловање третмана мелатонином у једарном екстракту ћелија јетри дијабетичних пацова. Након квантификације добијених трака, вредности за p21, приказане на графику, указују на значајно повећање нивоа овог протеина у једарном екстракту ћелија јетри дијабетичних пацова, за 6,0 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролном вредношћу (слика 4.30Б). Након третмана дијабетичних пацова мелатонином ниво p21 смањен је за 17% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.30Б).

Како циклин D1 представља неопходни регулатор преласка ћелије из G1 у S фазу ћелијског циклуса, испитивано је деловање третмана мелатонином на ниво овог протеина у укупном хомогенату јетри дијабетичних пацова. Имуноблот анализа протеина са одговарајућим антителом на циклин D1 (слика 4.30В), указала је на значајно повећање нивоа овог протеина у хомогенату јетри дијабетичних пацова, за 1,3 пута ($p < 0,05$), у поређењу са контролном вредношћу. Након третмана дијабетичних пацова мелатонином ниво циклина D1 повећан је 1,7 пута ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.30В).



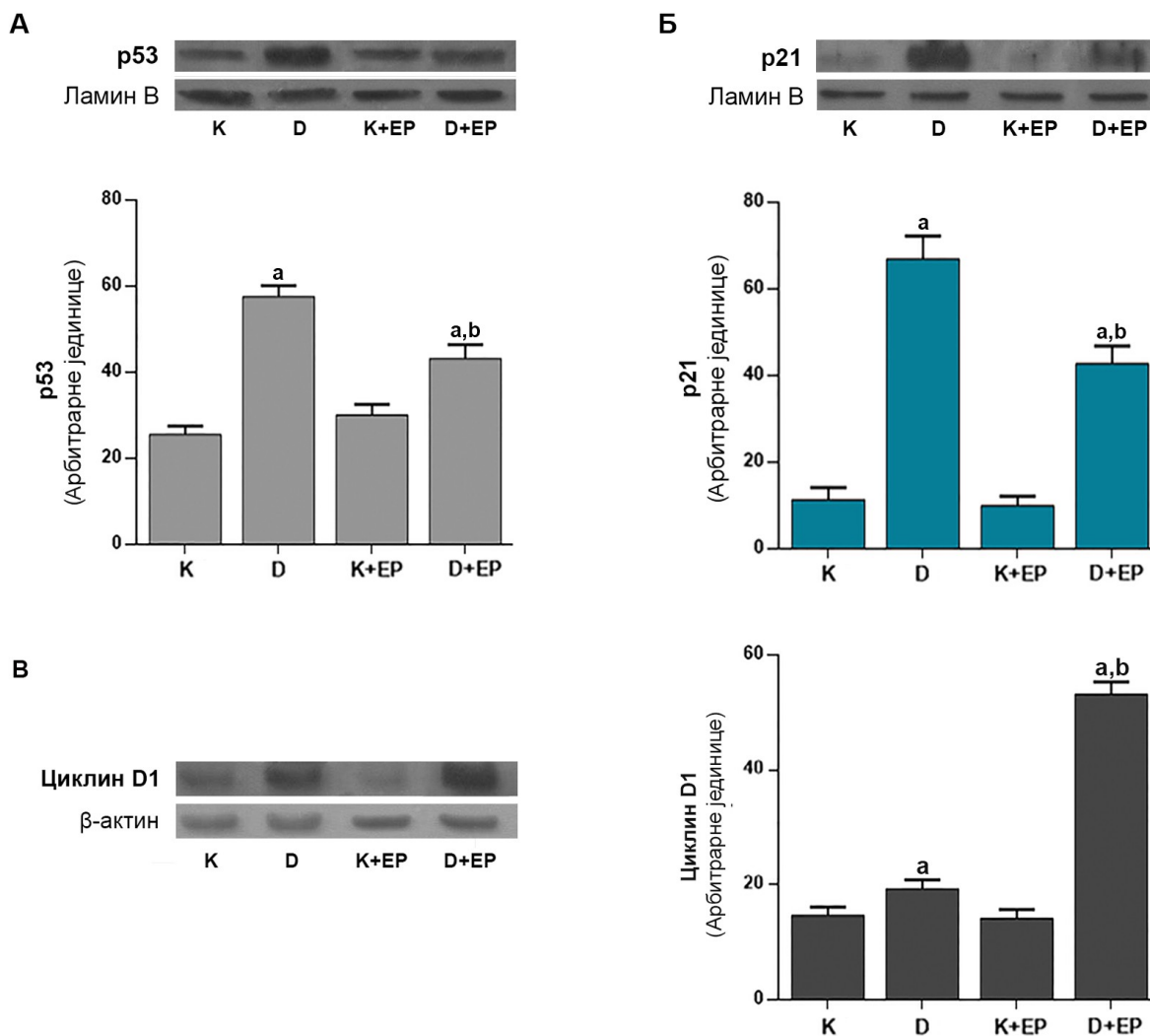
Слика 4.30. Утицај третмана мелатонином на пролиферативни капацитет ћелија јетре пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетре пацова на присуство p53 са графичким приказом детектованих трака. (Б) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетре пацова на присуство p21 са графичким приказом детектованих трака. (В) Имуноблот анализа укупних хомогената ћелија јетре пацова на присуство цикллина D1 са графичким приказом детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

Резултати добијени мерењем нивоа p53 у једарном екстракту ћелија јетре дијабетичних пацова након третмана етил пируватом указују на значајно смањење присуства овог протеина, за 25% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.31А).

Имуноблот анализа са одговарајућим антителом за p21 указује да након третмана дијабетичних пацова етил пируватом долази до смањења нивоа p21 за 33% ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.30Б).

Анализа промене нивоа циклина D1 (слика 4.31В), указује да је након третмана дијабетичних пацова етил пируватом ниво циклина D1 повећан чак 2,8 пута ($p < 0,05$) у односу на дијабетичну групу (слика 4.31В).

Увећано присуство протеина p53 и p21 у дијабетичној јетри указује на смањени регенеративни потенцијал ћелија јетре. Како је показано да и третман мелатонином, као и третман етил пируватом, којим је смањен излазак HMGB1 из ћелија, снижавају ниво ових протеина, а истовремено повећавају присуство циклина D1, може се закључити да висок ниво ванћелијског HMGB1 доприноси стишавању регенеративног капацитета јетре.



Слика 4.31. Утицај третмана етил пируватом на пролиферативни капацитет ћелија јетре пацова са ДТ1. (А) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетре пацова на присуство p53 са графичким приказом детектованих трака. (Б) Имуноблот анализа једарних екстраката ћелија јетре пацова на присуство p21 са графичким приказом детектованих трака. (В) Имуноблот анализа укупних хомогената ћелија јетре пацова на присуство циклина D1 са графичким приказом детектованих трака. Приказани резултати квантификације представљају средњу вредност добијену из најмање три независна експеримента. К – контролна група, D – дијабетична група, K+EP – контролна група третирана етил пируватом, D+EP – дијабетична група третирана етил пируватом. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка; a, $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; b, $p < 0,05$ у поређењу са дијабетичном групом.

5. ДИСКУСИЈА

Оксидативни стрес и њиме узрокована инфламација могу имати важну улогу у појави и прогресији дијабетичних компликација и болести јетре. С обзиром на своје метаболичке активности, јетра показује повећану осетљивост на слободне радикале и представља једно од главних места њиховог деловања (Sánchez-Valle и сар., 2012). Док слабије присуство слободних радикала промовише преживљавање ћелија и опоравак, њихова прекомерна или стална продукција ремети хомеостазу и доводи до повећања оксидативног стреса који може довести не само до деструкције макромолекула и оштећења ћелија већ и до поремећаја сигналних путева који воде инфламацији, регенерацији и ћелијској смрти. Познато је да HMGB1 протеин по свом изласку из оштећених или стресираних ћелија доприноси развоју инфламације преко стимулације имунских ћелија на ослобађање проинфламацијских цитокина. Мање је познато да ли и на који начин овај протеин делује као унутарћелијски посредник ћелијског одговора на стрес у неимунским ћелијама попут хепатоцита.

Досадашња истраживања биологије HMGB1 протеина, из угла његове експресије, унутарћелијске транслокације и ослобађања у ванћелијску средину, у различитим патолошким стањима организма, довела су до отварања нове области истраживања у транслационој медицини у којој HMGB1 представља потенцијалну терапеутску мету деловања, али и у молекуларној биологији где овај, од скора окарактерисан сигнални молекул, доприноси регулацији активности различитих сигналних путева и процеса. У дијабетесу биологија HMGB1 протеина је слабо изучавана. Стога, у овој докторској дисертацији анализована је повезаност параметара оксидативног стреса, инфламације и регенерације јетре дијабетичних пацова са понашањем HMGB1 протеина. Показано је да у ћелијама јетре пацова са DT1 HMGB1 протеин бива структурно модификован ацетилацијом, фосфорилацијом и O-GlcNAc гликозилацијом што корелише његовом преласку из једра у цитоплазму хепатоцита и повећањем његове присутности у серуму и укупним хомогенатима

јетре. Релативни губитак HMGB1 протеина из једра хепатоцита такође корелише са нивоом оксидативног стреса, ДНК оштећењем, присутном инфламацијом, и морфолошким и функционалним променама јетре. Резултати смањења присуства HMGB1 протеина у ванћелијској средини, постигнути третманом дијабетичних пацова антиоксидансом мелатонином или инхибицијом његове секреције, услед третмана етил пируватом, наводе на закључак да ванћелијски HMGB1 протеин доприноси оштећењу јетре у дијабетесу одржавањем стања хроничне инфламације, стишавањем антиоксидативне одбране и стишавањем регенерације.

Полазиште истраживања у овој докторској дисертацији засновано је на томе да током DT1 протеин HMGB1 може доспети у ванћелијску средину пасивно из некротских и оштећених ћелија изложених оксидативном стресу, али и активним ослобађањем из активираних имунских ћелија, али и неимунских ћелија. Претпостављено је да ослобођени HMGB1 може представљати важан паракрини медијатор појаве дисфункције јетре у дијабетесу која се јавља као последица успостављања зачараног круга хроничног отпуштања HMGB1 из Купферових ћелија и хепатоцита услед деловања екзогенних и ендогених стресогених сигнала у које спада и сам HMGB1.

Ослобађању HMGB1 из стресираних ћелија претходи његова транслокација из једра у цитоплазму, посредована структурним модификацијама овог протеина. Сматра се да кисели, карбокси-терминални крај HMGB1 у највећој мери доприноси промени тродимензионалне структуре овог протеина чинећи је доступнијом за интеракције са његовим лигандима (Stott и сар., 2010). Показало се да посттранслационе модификације попут ацетилације, метилације и фосфорилације управљају HMGB1 ћелијском локализацијом (Bonaldi и сар., 2003; Ito и сар., 2007; Youn и Shin, 2006). Тако је уочено да је након активације моноцита и макрофага HMGB1 хиперацетилисан у оквиру места одговорних за једарну транслокацију (NLS домена) и да је овај процес посредован активацијом JAK/STAT1 сигналног пута (Lu и сар., 2014). Показано је и да хиперацетилисане HMGB1 редокс изоформе, изоловане из зглобне течности пацијената са јувенилним идиопатским артритисом, значајно корелишу са присутном инфламацијом, указујући на то да се HMGB1 активно

излучује током ове болести и да поседује проинфламацијске особине (Lundbäck и сар., 2016). Хиперацетилација лизина унутар NLS домена помера равнотежу од тога да је HMGB1 претежно једарни протеин ка његовом нагомилавању унутар цитоплазме, спречавајући поновни улазак HMGB1 у једро (Yang и сар., 2013). Показано је да повишен ниво ацетилисаног HMGB1 у серуму пацијената са ацетаминофенским тровањем јетре представља специфични биомаркер за предвиђање клиничког исхода (Antoine и сар., 2012). Такође, познато је да је HMGB1, ослобођен након реперфузије код мишева, као и онај ослобођен *in vitro* из хепатоцита излаганих оксидативном стресу, хиперацетилисан (Lamkanfi и сар., 2010). Сматра се да је хиперацетилација последица смањене активности хистон деацетилаза, које не успевају да у довољној мери уклоне ацетил групе са лизинских резидуа. Резултати ове докторске дисертације показују да током дијабетеса значајно расте ниво ацетилисаног HMGB1 у ткиву јетре и да је овакав протеин претежно заступљен у цитоплазматској фракцији (слика 4.13).

Раније се сматрало да је само ацетилација протеина HMGB1 одговорна за његову транслокацију. Међутим, показано је да је фосфорилација такође важна за регулацију секреције и унутарћелијске локализације овог протеина и да је она посредована активношћу протеин киназе C (Oh и сар., 2009; Youn и Shin, 2006). *In vivo* је показано да је фосфорилација серина унутар NLS домена протеина HMGB1 повећана након третмана TNF- α и да утиче на прелазак HMGB1 у цитоплазму и на његово даље ослобађање из ћелије (Youn и Shin, 2006). Утврђено је да се експорт протеина HMGB1 из једра дешава посредством CRM1 зависног пута (Bonaldi и сар., 2003b). Стога би фосфорилација могла да утиче на интеракцију HMGB1 и CRM1 у смеру олакшавања експорта из једра. У нестимулисаним условима, протеин HMGB1 улази у једро уз помоћ KAP-1 импортина. Међутим, значајни удео HMGB1 није у стању да поново уђе у једро уколико је претходно био извезен у цитоплазму захваљујући фосфорилацији (Youn и Shin, 2006). Из приказаних резултата уочава се да је увећано присуство HMGB1 протеина у цитоплазми ћелија јетре пацова са ДТ1 праћено повећаним нивоом фосфорилисаности овог протеина, што говори у прилог

утицају ове врсте посттранслационе модификације на релокализацију HMGB1 протеина из једра у цитоплазму током дијабетеса.

Фосфорилација одређених аминокиселина може довести до промене локалне шарже протеина, и то у значајнијој мери од ацетилације. Овакав ефекат директно утиче на промену изоелектричне тачке протеина. Занимљиво је да се места фосфорилације налазе унутар НМГ домена који имају међусобно различите функције: домен А интерагује са транскрипционим факторима, понашајући се као шаперон, док домен В учествује у савијању молекула ДНК (Rowell и сар., 2012). Са друге стране, удружено дејство НМГ домена и киселог, карбокси-терминалног, краја протеина модулише афинитет везивања протеина HMGB1 за различите супstrate (Кнарр и сар., 2004). Откривено је да места модификација унутар НМГ домена могу ступати у интеракцију са киселим репом протеина (Не и сар., 2015).

Посттранслационе модификације протеина дају могућност ћелији да брзо одговори на унутрашње и спољашње сигнале кроз директну и динамичну контролу функције протеина. Модификације типа ацетилације и фосфорилације биле су у жижи интересовања многобројних истраживања претходних деценија. Међутим, поред ових добро проучених модификација, постоје и многе друге, чија функција и присуство у нормалним и патолошким стањима тек почиње да бива расветљавана. Међу њима је и O-GlcNAc гликозилација, неканонска гликозилација која подразумева додавање N-ацетилглюкозаминског остатка на O-гликозидну везу серина или треонина унутарћелијских протеина. Разликује се од свих других облика гликозилације по томе што се дешава искључиво унутар цитоплазме и једра и представља динамичан, брз процес, који се може поновити више пута у току живота полипептида, у различитом обиму и на различитим местима на молекулу (Yang и Qian, 2017). Испитивање O-GlcNAc модификације нарочито је важно јер је показана повезаност између ремећења O-GlcNAc хомеостазе и патогенезе хроничних болести, укључујући дијабетес, кардиоваскуларне поремећаје, неуродегенеративна обољења и канцер. Током протекле две деценије, постало је јасно да је O-GlcNAc једна од најчешћих посттранслационих модификација унутар цитоплазматског и једарног компартмана (Hart и Akimoto, 2009). Имајући у виду да је ниво O-GlcNAc

гликозилације повећан у различитим ткивима у присуству хипергликемије (Liu и сар., 2000), као и чињеницу да је овај вид модификације нарочито заступљен код протеина укључених у пренос сигнала, одговор на стрес и енергетски метаболизам, испитивано је присуство овог типа модификације код протеина HMGB1 у јетри дијабетичних пацова.

Слично као у случају фосфорилације, специфична функција O-GlcNAc модификације зависи не само од врсте протеина, већ и од позиције за коју се гликан везује. На основу бројних студија донет је општи закључак да су главне функције O-GlcNAc гликозилације спречавање фосфорилације, модулација преноса сигнала, сигналних путева и транскрипције у одговору на стрес (Hart и Akimoto, 2009). Ова врста модификације важна је и за регулисање формирања протеинских комплекса и протеин-протеин интеракција. Све је више доказа који говоре у прилог томе да је O-GlcNAc гликозилација важан фактор у одговору ћелије на ремећење протеинске хомеостазе у одговору на оксидативни стрес, спречавањем агрегације и деградације протеина и олакшавањем њиховог поновног правилног савијања (Yang и Qian, 2017). O-GlcNAc гликозилација протеина један је од најбржих одговора ћелије на стрес (Hart и Akimoto, 2009). На примеру неколико регулаторних протеина, попут NFκB-Rel и Sp1, показано је да O-GlcNAc модификација утиче на њихову транслокацију из цитоплазме у једру (Majumdar и сар., 2003). До сада није било података о томе да ли протеин HMGB1 подлеже O-GlcNAc модификацији, иако она показује сложону динамичку интеракцију са фосфорилацијом, с обзиром на то да се може дешавати на свим местима на којима је могућа и фосфорилација (Hart и Akimoto, 2009). У оквиру овог истраживања показано је да HMGB1 у дијабетесу подлеже O-GlcNAc гликозилацији и како је детектовано њено присуство на HMGB1 пореклом из цитоплазме али не и једра, претпоставља се да је овај протеин гликозилован по преласку у цитоплазму, као и да овај вид модификације доприноси његовом задржавању у цитоплазми.

Дводимензионалном полиакриламидном гел анализом присуства HMGB1 изоформи уочене су квалитативне и квантитативне промене. Пре свега уочено је значајно смањење и губитак присуства појединих HMGB1 изоформи, на одређеним

вредностима изоелектричне тачке, пореклом из једарних узорака јетре пацова са дијабетесом. Иако није било могуће утврдити врсту структурне модификације на уоченим изоформама, вођени литературним подацима, присуство одређених типова модификација је доказано применом техника имуноблот анализе (слика 4.12), и афинитетне хроматографије (слике 4.14 и 4.15).

У свим досадашњим истраживањима улоге поменутих структурних модификација НМGB1 протеина су вршена тако да је испитиван утицај сваке модификације појединачно. Због тога је било тешко закључити да ли ове модификације регулишу субћелијску локализацију НМGB1 истовремено или је он различито модификован на начин зависан од типа ћелије или врсте стресогеног стимулуса. С обзиром на то да једарна локализација НМGB1 вероватно делује као кључни регулаторни механизам у вези са ванћелијском функцијом НМGB1, неопходна је интегративнија студија НМGB1 пост-транслацијских модификација, која би допринела бољем разумевању регулације цитосолне транслокације НМGB1 пре његовог ослобађања из ћелије. Имајући у виду да посттранслационе модификације оркестрирају НМGB1 активности, од ћелијске локализације до ванћелијске функције, и стога делују као кључни функционални прекидач. Детектоване структурне модификације на НМGB1 у јетри пацова са ДТ1 указују на сложеност и разноврсност механизма којима је модулисана како функција и транслокација, тако вероватно и стабилност и интеракција протеина са различитим молекулима у одговору на стрес сигнале. У дијабетесу НМGB1 протеин је активно транслоциран из једра у цитоплазму и детектоване структурне промене су очигледно у функцији ћелијског одговора на присуство стресогених сигнала у дијабетесу и њима изазваним оштећењима јетре.

Оксидативни стрес је један од кључних фактора који утичу на транслокацију протеина НМGB1 и његово ослобађање из ћелија (Tang и сар., 2011b). Имунохистохемијском (слика 4.10) и имуноблот анализом (слика 4.11) показано је да у ћелијама јетре пацова са ДТ1 долази до редистрибуције једарног НМGB1 протеина. Добрим делом он прелази у цитоплазму али је уочено и значајно повећање његовог присуства у хроматинској фракцији. Присуство у хроматинској фракцији доводи се у

везу са ћелијама које су у апоптози, присутној у јетри пацова са дијабетесом изазваним стрептозотоцином (Petrović и сар., 2017). У ћелијама које умиру процесом апоптозе HMGB1 остаје чврсто везан за кондензовани хроматин услед опште деацетилације хистона и у ванћелијску средину може доспети тек по преласку ових ћелија у некротске. У случају ове, секундарне некрозе, HMGB1 се у ванћелијској средини налази везан за ДНК или нуклеозоме. И слободан и комплексован са ДНК или нуклеозомима, HMGB1 остварује своје улоге преко различитих TLR рецептора. Како је HMGB1 редокс-сензитиван протеин, присуство слободних радикала доводи до промене редокс стања HMGB1 услед оксидативних модификација цистеинских остатака на позицијама 23, 45 и 106 и тиме одређују његове ванћелијске функције. HMGB1 се може наћи у три различита редокс стања (редуковано, полу-оксидовано или дисулфидно и потпуно оксидовано) које одређују три главне улоге овог протеина: у инфламацији, хемотаксији и имунолошкој толеранцији (Yang и сар., 2012). У основи, формирање дисулфидног моста између Cys23 и Cys45 и присуство редукованог Cys106 је неопходно за продукцију цитокина која је посредована са HMGB1. Само овакав, полу-оксидован HMGB1 испољава улогу проинфламацијског цитокина и само у овом дисулфидном редокс стању, HMGB1 може да активира TLR4 (Gunasekaran и сар., 2016). У јетри пацова са дијабетесом детектована је већа присутност TLR4 као и његове интеракције са HMGB1 протеином. Раније је показано да смањење присуства ванћелијског HMGB1 протеина третманом са антиоксидансом мелатонином доводи до смањења нивоа експресије и интеракција између TLR4 и HMGB1 протеина и да је ово праћено смањеним присуством некрозе и апоптозе у јетри (Petrović и сар., 2017). Резултати ове докторске дисертације показују да третман дијабетичних пацова етил пируватом такође доводи до смањења не само експресије ванћелијског HMGB1 протеина, већ и експресије TLR4 у хомогенатима јетре, а тиме и до смањења нивоа њихове интеракције. Како етил пируват испољава антиоксидативне ефекте, као и мелатонин, добијени резултати сугеришу да се смањењем нивоа оксидативног стреса смањује секреција HMGB1 протеина, као и то да је везани HMGB1 протеин за TLR4 у дијабетичној јетри највероватније у

дисулфидном редокс стању, и да такав, преко TLR4, може допринети продукцији цитокина у имунским и неимунским ћелијама јетре.

Из литературе је познато да су нивои TNF- α и IL-6 у крви пацијената са инсулин зависним дијабетесом повећани (Devaraj и сар., 2007). Исто тако стање инфламације код пацијената са било ДТ1 или ДТ2 карактерише повећано присуство акутно-фазних протеина који се примарно синтетишу у јетри (Downs и Faulkner, 2015). TNF- α представља важан део имунског система, ослобађају га активирани имунске ћелије, моноцити, макрофаги и ћелије природне убице, а утиче на активност Т и В лимфоцита (Hotamisligil и сар., 1995). Делује и ван имунског система као инхибитор липопротеинске липазе, али подстиче и повећано нагомилавање глицерола у адипоцитима, утичући на појаву инсулинске резистенције (Makhatadze, 1998). Повећан ниво IL-6 сматра се фактором ризика за настанак инсулинске резистенције и дијабетеса (Wang и сар., 2013). Иако се имунске, ендотелне ћелије и адипоцити сматрају главним извором IL-6, показано је да хепатоцити такође имају способност производње цитокина TNF- α и IL-6 (Norris и сар., 2014; Takano и сар., 2012). С обзиром на то да јетра представља значајан извор циркулишућих цитокина, али и акутно-фазних протеина, сматра се битним конституентом имунског система који доприноси контроли системске инфламације (Bode и сар., 2012). У дијабетесу, хронична хипергликемија ствара услове који доводе до оштећења хепатоцита. Инфламација која се јавља у таквим условима може увећати ризик од развоја болести јетре током трајања дијабетеса (Loria и сар., 2013). Иако IL-6 има кључну улогу у нормализацији функционисања јетре након повреде ткива и представља први од фактора који подстичу хепатоците на продукцију акутно-фазних протеина (Gruys и сар., 2005; Taub, 2004), хронично излагање јетре IL-6 може водити ка повећавању повреде и појачавању процеса апоптозе (Jin и сар., 2006). Резултати приказани у овој докторској дисертацији потврђују да HMGB1 у значајној мери доприноси одржавању инфламацијског стања у дијабетичној јетри кроз утицај на повећање продукције проинфламацијских маркера - цитокина TNF- α , IL-6 (слика 4.24) и акутно-фазног протеина Hp (слика 4.24). Наиме, повећана интеракција HMGB1 са TLR4 (слика 4.25) у дијабетичној јетри води активацији MAPK (слика 4.26) и JAK1 сигналне каскаде

(слика 4.28), што има за последицу активацију и једарну транслокацију NF- κ B p65 (слика 4.27) и STAT3 који су кључни транскрипциони активатори гена за TNF- α , IL-6 и Нр- β . TNF- α и IL-6, ослобођени под утицајем HMGB1, механизмом позитивне повратне спреге, највероватније подстичу даље ослобађање HMGB1 из ћелија јетре, доводећи на тај начин до појачавања инфламацијског одговора (Lu и сар., 2008). Запажено је и да активација HMGB1/TLR4 осе води смањењу нивоа Nrf2 у једру (слика 4.29Б). Имајући у виду да Nrf2 учествује у регулацији експресије многих гена за антиоксидативне ензиме, као последица његовог сниженог присуства у једру јавља се смањење експресије неких од ових ензима, као на пример каталазе, што доприноси одржању или повећању нивоа оксидативног стреса. Присуство ROS одржава ослобађање HMGB1, доводећи до појачавања инфламацијског одговора и оштећења јетре. У прилог томе, резултати ове докторске дисертације показују да се у различитим веремнским тачкама током ДТ1, са осцилацијама, у јетри одржава повећано присуство супероксид анјон радикала (слика 4.3А), водоник пероксида (слика 4.3Б), липидне пероксидације, увећане продукције цитокина (нарочито IL-6), као и Нр, што све корелише са нивоом присутног HMGB1 и детектованим променама у јетри, попут присутне некрозе, оштећења ДНК и присуства регенерације. Evankovich и сарадници (Evankovich и сар., 2010) показали су да ослобађање HMGB1 може бити индуковано и од стране самог TLR4, с обзиром на то да је показано да је TLR4-зависно стварање ROS у исхемичној јетри, одговорно за ослобађање HMGB1 у ванћелијску средину. Смањење нивоа HMGB1 у серуму и јетри дијабетичних пацова након третмана етил пируватом, довело је до смањења цитокинске активности HMGB1 што је имало заштитни ефекат на дијабетичну јетру. Овакав закључак донесен је на основу анализе инфламацијског статуса јетре (слика 4.24), њене структуре (слика 4.19), биохемисјких параметара оштећења, ALT-а и AST-а (табела 4) и бољег антиоксидативног статуса (слика 4.22). Ови резултати говоре у прилог томе да степен оштећења јетре током дијабетеса корелише са нивоом присутности ванћелијског HMGB1 и његових, пре свега, проинфламацијских дејстава, што даље упућује на закључак да би се спречавање ослобађања овог протеина из ћелија могло разматрати у контексту смањења оштећења јетре током дијабетеса.

У фокусу ове докторске дисертације су били пре свега молекуларни механизми којим ванћелијски HMGB1 доприноси оштећењу јетре у дијабетесу. Све више доказа говори у прилог томе да је етил пируват вишефункционални заштитни агенс, способан да ублажи ткивна оштећења изазвана различитим стресорима (Lee и сар., 2017). Механизми који леже у основи његових антиинфламацијских и антиоксидативних ефеката су различити. Укључују спречавање ослобађања протеина HMGB1 (Shin и сар., 2015); смањење продукције проинфламацијских цитокина, преко инхибиције STAT сигналног пута зависног од присуства ROS (Kim и сар., 2008) или преко инхибиције везивања NF-κB p65 за ДНК (Han и сар., 2004); као и подстицање транслокације Nrf2 транскрипционог фактора из цитоплазме у једро ћелија, праћене увећаном експресијом гена за HO-1 (Kim и сар., 2013). Резултати ове докторске дисертације показују да су у сви ови механизми укључени у деловање етил пирувата на јетру дијабетичних пацова. Истовремено, добијени резултати сугеришу да је спречавање ослобађања протеина HMGB1 примарни догађај преко кога етил пируват снижава активност STAT3 и NF-κB p65 транскрипционих фактора, увећава једарну експресију Nrf2 у једру ћелија јетри и експресију HO-1.

Инфламација је сложен процес с обзиром на то да је регулисана сложеним интеракцијама између цитокина и фактора са проинфламацијским и антиинфламацијским деловањем. Сматра се да ванћелијски HMGB1 игра централну улогу у проинфламацијским реакцијама јер може утицати на повећано стварање бројних проинфламацијских медијатора од стране различитих ћелија, истовремено индукујући сопствено ослобађање из активираних моноцита и макрофага. Међутим, неки од проинфламацијских медијатора који се продукују у одговору на HMGB1, као што је нпр. IL-6, могу имати и антиинфламацијско дејство, указујући на могућу како проинфламацијску, тако и антиинфламацијску улогу HMGB1. Хаптоглобин је акутно-фазни протеин који се примарно синтетише у јетри. Концентрација овог протеина у циркулацији расте након успостављања инфламације и опште је прихваћено да он има примарно антиинфламацијско дејство (Bode и сар., 2012). Експресија гена за Hp је примарно регулисана цитокинима, типа IL-6, чији рецептори посредују у активацији транскрипционих регулаторних протеина STAT3 и C/EBP β

(Bode и сар., 2012; Shin и сар., 2015). Резултати истраживања ове докторске дисертације показују да повећан ниво протеина HMGB1 у дијабетичној јетри прати повећана продукција хаптоглобина, док смањење присуства ванћелијског HMGB1, након третмана дијабетичних пацова етил пируватом, корелише са смањењем нивоа хаптоглобина. Детектоване промене у нивоу хаптоглобина корелишу и са променом нивоа интеракције између HMGB1 и TLR4, са активношћу низводних MAPK и JAK киназа, као и са активношћу регулаторних протеина NF-κB p65 и STAT3. Yang и сарадници (Yang и сар., 2017) су показали да секреција хаптоглобина или његове β субјединице делује као активни HMGB1 антагонист, способан да се везује за HMGB1 и инхибира његова проинфламацијска дејства, посредована TLR4 рецептором. Они су показали да хаптоглобин може везивати како редуковану, тако и дисулфидну форму протеина HMGB1, која настаје под утицајем оксидативног стреса и учествује у даљој продукцији цитокина. Из овога проистиче да HMGB1, стимулисањем синтезе и секреције хаптоглобина у дијабетесу, може формирати негативну повратну спрегу и тиме потенцијално смањивати сопствену проинфламацијску активност. Међутим, резултати ове докторске дисертације сугеришу да је хаптоглобин највероватније недовољно ефикасан у дијабетичним условима. Објашњење може лежати у гликозилацији хаптоглобина, веома присутној у дијабетесу, која највероватније нарушава везујући капацитет хаптоглобина за друге молекуле, самим тим и његове функције. У прилог овоме говоре и резултати истраживања Spiller и сарадника (Spiller и сар., 2017) који су показали да је у крви дијабетичних пацијената хаптоглобин гликозилован на лизину 141. Такође, Asleh и сарадници (Asleh и сар., 2005) су утврдили да гликозилован хемоглобин није у стању да се веже за хаптоглобин чиме онемогућава његову заштитну функцију наспрам оксидативних оштећења узрокованих присуством слободног хемоглобина.

Активирани STAT3 такође поседује како проинфламацијске тако и антиинфламацијске активности. Он се примарно активира стимулацијом JAK/STAT пута, посредством IL-6 рецептора. Активација киназа JAK1 и JAK2 неопходна је за фосфорилацију тирозинских остатака на STAT3, његову димеризацију и транслокацију у једро (Wang и сар., 2013). Поред рецептора за IL-6, активација

STAT3 може бити посредована и TLR4 рецептором (Yasukawa и сар., 2003). Наиме, активирани TLR4 у стању је да изазове активацију ERK, JNK и p38 MAP киназа, које фосфорилишу STAT3 на серину 727, за који је познато да је неопходан за постизање максималног трансактивационог капацитета STAT3 (Decker и Kovarik, 2000). Истраживања у оквиру ове докторске дисертације показала су да увећане интеракције HMGB1 протеина са TLR4 у дијабетичној јетри прати повећана активација JAK1 и фосфорилација STAT3 на серинским остацима. Активација STAT3, фосфорилацијом, од кључног је значаја за нормално одвијање инфламацијског одговора. Ипак, продужена активност STAT3 могла би да доприноси хроничној инфламацији, подстицањем одржавања повишеног нивоа низа протеина који учествују у инфламацијском процесу, укључујући и сам STAT3 (Wang и сар., 2013). Такође, STAT3 може стимулисати експресију бројних ефекторских гена који заузврат стишавају експресију проинфламацијских гена. Међу њима је и Bcl3, који негативно утиче на везивање NF-κB p65 за ДНК и продукцију TNF-α (Kuwata и сар., 2003), али и супресор протеина цитокинског сигналинга 3 (SOCS3), који спречава инфламацијски одговор покретнут везивањем IL-6 за IL-6 рецептор (Yasukawa и сар., 2003). Према Wang и сар. (Wang и сар., 2013), продужена активација STAT3 захтева стално понављање фосфорилације која је посредована *de novo* синтезом и секрецијом IL-6. Резултати ове докторске дисертације указују да HMGB1 доприноси овом процесу кроз сигналне путеве активирани преко TLR4 рецептора. Показано је да су, у дијабетичној јетри, повећање нивоа HMGB1 и његова интеракција са рецептором TLR4 праћене повећаном фосфорилацијом JAK1, као и повећањем нивоа фосфорилисаних STAT3 изоформи у једру. Са друге стране, смањење нивоа HMGB1 у дијабетичној јетри пацова, након третмана етил пируватом, праћено је смањењем фосфорилације JAK1 и смањењем активности STAT3. Према Kim и сарадницима (Kim и сар., 2008), механизам инхибиције STAT3 етил пируватом јавља се као резултат инхибиције JAK2 киназе. Овај податак наводи на закључак да етил пируват, који је смањено ослобађање протеина HMGB1 у јетри дијабетичних пацова, као и ниво његових интеракција са TLR4, највероватније смањује ниво активације

JAK1, доводећи до смањења активности STAT3, а тиме и до снижавања експресије инфламацијских гена (IL-6, TNF- α , Nr) чију транскрипцију регулише STAT3.

Сви сигнални путеви који воде од TLR4 рецептора воде активацији MAP киназа и транскрипционо регулаторног протеина NF- κ B. Такође, TNF- α може преносити сигнале преко различитих рецептора на површини ћелијске мембране, активирајући све три врсте MAP киназа и NF- κ B p65 (Sabio и Davis, 2014). У оквиру ове докторске дисертације показано је да је повећана интеракција HMGB1 са TLR4 у јетри пацова са дијабетесом праћена повећаном активношћу NF- κ B p65 и његовим нагомилавањем унутар једра ћелија јетре. У једру, овај протеин учествује у контроли експресије низа инфламацијских гена који кодирају цитокине попут IL-6 и TNF- α , чија је експресија од значаја за акутно фазни одговор организма. Важну компоненту акутно фазног одговора чини и повећање нивоа хаптоглобина у одговору на оксидативни стрес и индукцију апоптозе (Lorenzo и сар., 2011). Неке студије су показале да NF- κ B p50/p65 хетеродимери имају и антиинфламацијску улогу која се огледа у директној инхибицији експресије проинфламацијских гена, али и дејству на експресију или активност антиинфламацијских цитокина (Greten и сар., 2007). У овој докторској дисертацији показано је да третман дијабетичних пацова етил пируватом и смањен ниво интеракција HMGB1 са TLR4, у значајној мери снижава активацију MAP киназа (слика 4.26), накупљање фосфорилисаног NF- κ B p65 у једру (слика 4.27), као и ниво хаптоглобина у јетри (слика 4.24), мада његов ниво остаје и даље значајно повишен у односу на ниво код контролне групе. Могуће објашњење за овакав резултат може бити у томе да етил пируват, смањујући ниво HMGB1/TLR4 интеракције, и њима посредовану активацију и активност NF- κ B p65, стимулише транслокацију транскрипционог регулаторног протеина Nrf2 у једру, где овај протеин подстиче експресију гена укључених у одговор на оксидативни стрес и инфламацију. Према Thimmulappa и сарадницима (Thimmulappa и сар., 2002), ген за хаптоглобин може бити један од гена у чијој транскрипционој регулацији учествује Nrf2. Међутим, још увек није разјашњено на који начин Nrf2 доприноси експресији Nr гена, иако су Zhao и сарадници (Zhao и сар., 2009) показали да код

експерименталних животиња које су након можданог крварења третиране сулфорафаном, познатим активатором Nrf2, долази до значајног пораста нивоа хаптоглобина на нивоу крвне плазме.

Данас је познато да је однос једарног Nrf2 и NF-кВ p65 кључни елемент који одређује ниво инфламацијског одговора и оксидативни статус ћелија и ткива. Претпоставља се да Nrf2 и NF-кВ путеви инхибирају једни друге на транскрипционом нивоу кроз протеин-протеин интеракције или деловањем преко секундарних преносиоца сигнала (Wardyn и сар., 2015). Сматра се да Nrf2 делује као антиинфламацијска компонента због свог инхибирајућег деловања на продукцију цитокина, која је посредован са NF-кВ p65. У јетри дијабетичних пацова запажен је значајан пад присуства Nrf2 у једру, али и повећање нивоа IL-6 и TNF- α , што говори у прилог томе да прекомерно ослобађање HMGB1 доводи до смањења Nrf2/NF-кВ p65 односа, утичући на стишавање антиинфламацијског потенцијала дијабетичне јетре.

Смањење Nrf2/NF-кВ p65 односа у јетри дијабетичних пацова корелише и са стишавањем антиоксидативног потенцијала, судећи по уоченом смањењу активности и експресији каталазе, чији ген је примарно регулисан са Nrf2 (Liu, Qu, и Shen, 2008). Могуће је да ово смањење, у некој мери, доприноси и смањењу нивоа експресије гена за HO-1, с обзиром на то да је увећање Nrf2/NF-кВ p65 односа у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом пратило и повећање нивоа каталазе, али и HO-1. Поред уоченог пада активности укупне SOD у јетри пацова са ДТ1, резултати приказани у овој докторској дисертацији показали су да у истим јетрама, релативни ниво експресије CuZnSOD остаје скоро непромењен, док је експресија MnSOD значајно увећана. Ген за CuZnSOD је често конститутивно експримиран и не тако лако подложен индукцији, за разлику од гена за MnSOD (Miao и St. Clair, 2009). Уочено увећање присуства MnSOD у јетри дијабетичних пацова могло би се објаснити увећаним присуством и активношћу NF-кВ p65 у једру ћелија јетри. Наиме, познато је да се транскрипција гена за MnSOD увећава у одговору на оксидативни стрес и присуство IL-6 и TNF- α (Miao и St. Clair, 2009). Такође, бројне студије су идентификовале NF-кВ p65 као кључни транскрипциони фактор у

активацији гена за MnSOD (Miao и St. Clair, 2009). Сходно томе, увећање Nrf2/NF- κ B p65 односа у јетри дијабетичних пацова након третмана етил пируватом прати и смањење нивоа MnSOD. Ови резултати наводе на закључак да ванћелијски HMGB1, активирањем MAPK сигналних путева посредством својих интеракција са TLR4, доприноси стишавању антиоксидативног потенцијала у условима дијабетеса.

Уочено неслагање између детектованих нивоа експресије SOD ензима и активности тоталне SOD, могло би, такође, бити последица присуства посттранслационих модификација на CuZn- и MnSOD. Према Динић и сар. (Dinić и сар., 2013) оба ова SOD ензима, као и каталаза, су O-GlcNAc гликозиловани у јетри пацова са дијабетесом изазваним стрептозотоцином. O-GlcNAc гликозилација је динамичан процес који може да наруши равнотежу са O-фосфорилацијом, негативно утичићи на функције циљних протеина (Zachara и Hart, 2004). O-фосфорилација је детектована код активних SOD ензима (Yamakura и Kawasaki, 2010). На основу литературних података, O-GlcNAc гликозилација мењајући локалну структуру протеина утиче и на ефекте фосфорилације и/или може делимично или комплетно блокирати каталитичке домене и активност антиоксидативних ензима.

Регенерација јетре је неопходан процес за опоравак и поновно успостављање нормалне функције ткива јетре након оштећења. Овај процес се заснива на сложеној интеракцији ћелија јетре (хепатоцита, Купферових, синусоидалних, ендотелијалних, стелатних и матичних ћелија) и других органа (тироидне жлезде, панкреаса, аутономног нервног система и др.). Регенерација ткива јетре зависи пре свега од пролиферације хепатоцита, укључујући фазу иницијације, пролиферације и терминације. Хепатоцити су стимулирани на пролиферацију и ћелијски раст од стране Купферових ћелија које ослобађају цитокине IL-6 и TNF- α , при чему једну од кључних улога у овим процесима игра IL-6/STAT3 али и TNF- α /JNK сигнални пут који регулишу пролиферацију хепатоцита преко циклин D1/p21 пута (Fujiyoshi и Ozaki, 2011). Студије указују да је регенерација јетре након токсичне повреде само делимично пропорционална повреди. Интензивније повреде инхибирају регенерацију и утичу на прогресију повреде, а као главни разлог наводи се блокада у кључним прорегенеративним сигналним путевима (Mehendale, 2005). Неки од њих су p38

MAPK и IL-6 сигнални putevi. Показано је да је инхибиција регенерације јетре у вези са смањењем експресије циклина D1 и активацијом IL-6/STAT3 сигналног пута. Стална активација овог пута корелише са индукцијом p21 и инхибицијом циклина D1. У дијабетесу јетра трпи оштећења, а на основу хистолошке анализа препарата јетре и присуства ћелија у деоби може се закључити да је регенерација присутна. Овакве ћелије уочене су и у препаратима јетре дијабетичних пацова третираних етил пируватом или мелатонином. Иако није било могуће разликовати капацитет регенерације у овим узорцима хистолошким анализом, имуноблот анализе експресије p21 и циклина D1 указале су да је присуство p21 веће у узорцима дијабетичне јетре у поређењу са јетром пацова третираних етил пируватом или мелатонином, док је ситуација са циклином D1 обрнута. Ови резултати такође корелишу са нивоом активације IL-6/STAT3 сигналног пута у испитиваним узорцима. Добијени резултати указују да је регенерација јетре дијабетичних пацова слабија у поређењу са оном након третмана дијабетичних пацова агенсима који смањују ванћелијску експресију HMGB1 протеина, сугеришући да овај протеин доприноси стишавању регенеративног капацитета у дијабетесу.

Регенерација јетре представља сложени процес и може бити покренута смањењем масе ткива услед хепатектомије, трансплантације, али и услед секундарног смањења масе јетре, настале као последица ћелијске смрти и оштећења услед болести јетре. У патолошким стањима регенеративни процеси у јетри дешавају се упоредо са настанком оштећења те је, с обзиром на детектоване промене структуре у јетри дијабетичних пацова и утврђене активације IL-6/STAT3 и TNF- α /JNK сигналног посредством HMGB1/TLR4 интеркција, било за очекивати да HMGB1 протеин, на неки начин доприноси регенеративном капацитету јетре у условима дијабетеса.

Ћелијски циклус строго је контролисан наизменичном експресијом одговарајућих циклина и циклин зависних киназа (CDK). Ћелијски циклус подељен је у четири фазе: G1 фаза, фаза синтезе (S), G2 фаза и фаза митозе (M). Хепатоцити током фазе иницијације прелазе из фазе мировања (G0) у фазу G1. Касну фазу G1

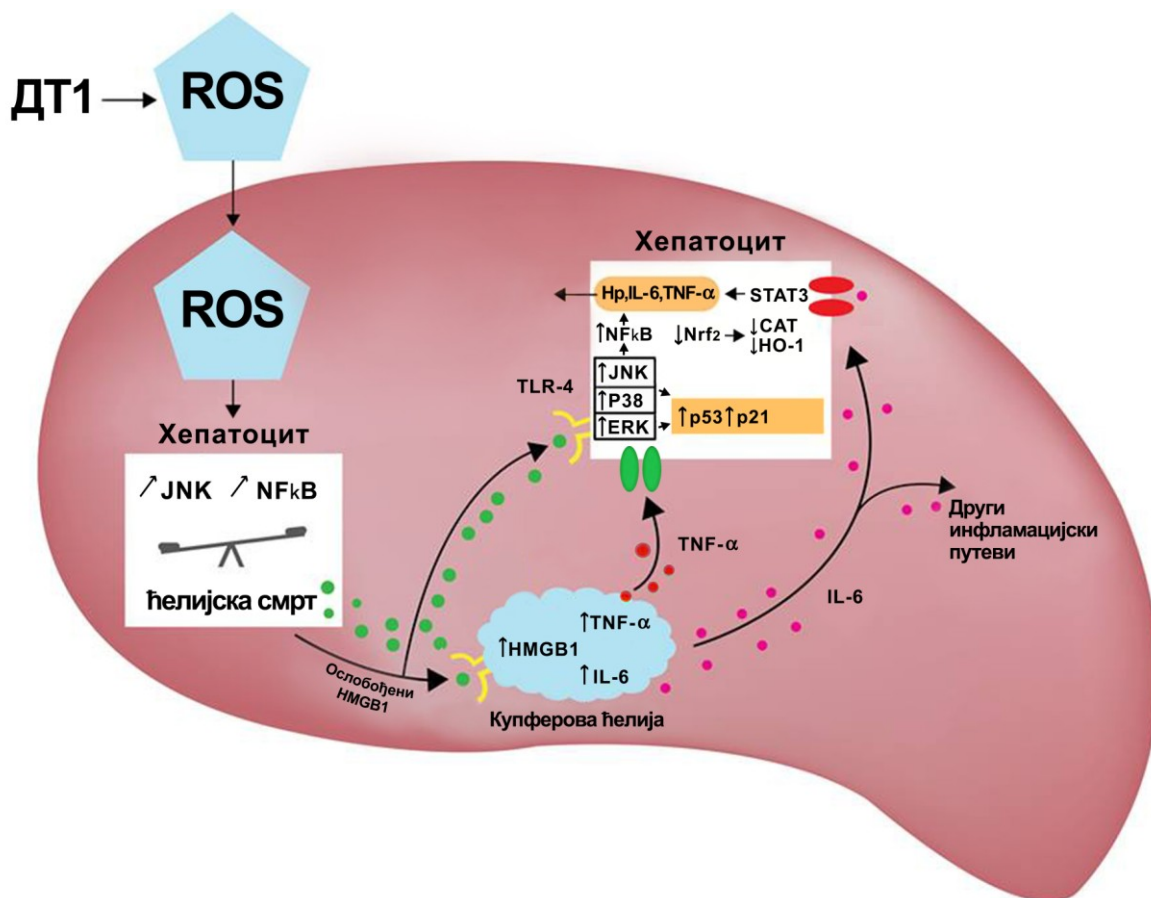
одликује постојање контролне тачке, током које ћелија одлучује о наставку ћелијског циклуса (Loyer и сар., 1996). Експресија циклина G1 фазе омогућава пролазак ћелије кроз контролну тачку и улажење у следећу, S фазу циклуса. Циклини G1 фазе укључују циклин D и E, али и експресију циклина D1 који је регулисан од стране STAT3 протеина (Li и сар., 2002). У овој докторској дисертацији показано је да смањење ослобађања протеина HMGB1 услед третмана етил пируватом или мелатонином (слика 4.17), доводи до значајног пораста нивоа циклина D1 (слике 4.30B и 4.31B) у ткиву јетре дијабетичних пацова. Индукција циклина D1 је најпоузданији показатељ напредовања ћелијског циклуса код хепатоцита (Fausto, 2000). Наиме, када хепатоцити експримирају циклин D1, може се закључити да су прошли контролну тачку фазе G1 и да се циклус наставља ка фази ДНК репликације (Fausto, 2000). Стога су детектоване промене у нивоу циклина D1, подржане бољим хистолошким налазом ткива и смањењем активности ALT и AST, показатеља побољшане регенерације јетре код дијабетичних пацова третираних етил пируватом. Како је измерени ниво циклина D1 у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом или мелатонином био вишеструко већи од нивоа циклина D1 измереног код дијабетичне групе, недвосмислено је показано да смањење ванћелијског HMGB1 има позитивно дејство на пропагацију ћелијског циклуса посредовану циклином D1. Односно, може се претпоставити да HMGB1 негативно утиче на пролиферативни потенцијал ћелија јетре.

Како бисмо испитали којим механизмом HMGB1 делује на процес регенерације, анализовани су протеини p53 и p21, главни актери у негативној контроли пролиферације ћелија. Из литературе је познато да тумор супресорни протеин p53, под утицајем генотоксичног стреса, регулише заустављање ћелијског циклуса (Menendez и сар., 2009). Са друге стране, протеин p21 функционише и као сензор и као ефектор различитих антипролиферативних сигнала, и посредник је у заустављању ћелијског циклуса посредованом протеином p53. Познато је да индукција p21 након ДНК оштећења повећава ниво присуства p21-D1/CDK4 комплекса. Као инхибитор циклин зависне киназе, p21 спречава прелазак G1 у S фазу

ћелијског циклуса везивањем за комплекс циклин D1/CDK4, инхибирајући њихову киназну активност у одговору на бројне стимулусе (Wu и сар., 1996).

Резултати ове докторске дисертације показују да током дијабетеса долази до значајног повећања нивоа p53 (слике 4.30А и 4.31А) и p21 (слике 4.30Б и 4.31Б) у једарној фракцији ткива јетре. Објашњење би могло лежати у томе да повећана интеракција HMGB1/TLR4, кроз повећање активности MAP киназа, посебно p38 (Xiao и сар., 2015), JNK (Lorin и сар., 2010) и ERK (Drosten и сар., 2014), може утицати на фосфорилацију тј. активацију p53 у условима стреса. С обзиром на то да p53 неповратно инхибира прогресију ћелијског циклуса преко p53/p21/Rb сигналног пута, доводећи до губитка пролиферативног потенцијала ћелија (Deryabin и сар., 2016), може се закључити да протеин HMGB1, активирањем сигналних путева низводно од рецептора TLR4, може утицати на активацију протеина p53, праћену активацијом протеина p21, што заједно има негативан ефекат на процес регенерације ткива јетре.

Резултати ове докторске дисертације недвосмислено наглашавају разноврсност деловања HMGB1 протеина током дијабетеса и сложеност његовог утицаја на размеру оштећења јетре. Ниво ослобођеног HMGB1, као и функционална интеракција између HMGB1/TLR4, IL-6 и TNF- α сигналних путева, највероватније одређују крајњи исход физиолошких одговора подстакнутих деловањем протеина HMGB1. Упркос описаним антиинфламацијским улогама HMGB1 и учесника HMGB1/TLR4 сигналних путева, у дијабетичној јетри присутно је стање хроничне инфламације. У стању за које је карактеристичан висок ниво ванћелијског HMGB1, антиинфламацијска дејства су очигледно надјачана проинфламацијским, која превладавају као последица стално активираних HMGB1/TLR4 осе. Истовремено, активност ове осе онемогућава ефикасну синтезу појединих антиоксидативних ензима чиме доприноси слабијој антиоксидативној одбрани, истовремено доприносићи слабијој регенерацији јетре. На основу овога могло би се закључити да би превенција ослобађања HMGB1 или блокирање HMGB1/TLR4 осе, могли бити ефикасан механизам у циљу стишавања инфламације узроковане дијабетесом и успоравања њоме посредоване прогресије оштећења јетре.



Слика 5.1. Потенцијални модел заједничке регулације путева инфламације, антиоксидативне одбране и регенерације од стране ванћелијског НМГВ1 протеина у ћелијама јетре током експериментално изазваног дијабетеса типа 1.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Стрептозотоцином изазван ДТ1 код пацова карактерише увећано присуство HMGB1 протеина у серуму и јетри. Ово увећање је у корелацији са оксидативним и инфламацијским статусом организма, као и оксидативним и инфламацијским статусом јетре, у њој присутним ДНК оштећењима и детектованим структурним и функционалним променама.
2. Ћелије јетре пацова са ДТ1 карактерише значајан губитак HMGB1 протеина из једра и његова акумулација у цитоплазми. Разлике добијене анализом присуства структурних модификација на једарном и цитоплазматском HMGB1 указују да су у дијабетесу ацетилација, фосфорилација и O-GlcNAc гликозилација највероватније одговорне за активну транслокацију HMGB1 протеина из једра, и/или његово задржавање у цитоплазми и потом излазак из ћелија.
3. На присуство ванћелијског HMGB1 у јетри пацова са ДТ1 указује повећан ниво интеракција овог протеина са мембранским рецептором TLR4.
4. Смањење нивоа ванћелијског HMGB1 у јетри, индиректно – третманом дијабетичних пацова антиоксидансом мелатонином или директно – третманом инхибитором његове секреције – етил приватом, корелише са смањењем нивоа оксидативног стреса у јетри, са смањењем нивоа ДНК оштећења, са стишавањем инфламације и са нормализацијом структуре и функције јетре, што указује да HMGB1 протеин доприноси настанку и/или прогресији оштећења јетре у дијабетесу.

5. Изучавања молекуларних механизма деловања HMGB1 протеина у јетри пацова, указују да у дијабетесу, HMGB1 доприноси одржавању стања хроничне инфламације кроз утицај на увећање продукције проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6 и синтезе акутно-фазног протеина хаптоглобина. Повећан ниво интеракција између HMGB1 и TLR4 у дијабетичној јетри води активацији MAPK/NF- κ B p65 и JAK1/STAT3 сигналних путева, што има за последицу увећање једарног присуства NF- κ B p65 и STAT3 који су кључни транскрипциони активатори гена за TNF- α , IL-6 и хаптоглобин. Смањење ванћелијског присуства HMGB1 доводи до смањене активације MAPK/NF- κ B p65 и JAK1/STAT3 сигналних каскада, и мање продукције TNF- α , IL-6 и хаптоглобина.
6. Подстицањем NF- κ B p65 инфламацијског пута, HMGB1 делује негативно на цитопротективни одговор у јетри пацова са ДТ1 онемогућавањем активности Nrf2 протеина, одговорног за стишавање инфламације и продукцију антиоксидативних ензима.
7. Смањење једарног присуства Nrf2, посредством активације HMGB1/TLR4/MAPK сигналног пута, има за последицу смањење нивоа и активности CAT, а вероватно и измењену активност гена за HO-1. На ово указују резултати где, смањење ванћелијског присуства HMGB1 доводи до увећања једарног присуства Nrf2, а тиме и увећања нивоа не само CAT, већ и HO-1.
8. Онемогућавањем одговарајуће продукције и активности антиоксидативних ензима CAT и HO-1 у дијабетесу, HMGB1 доприноси смањеној антиоксидативној одбрани и одржавању стања оксидативног стреса.
9. Присуство двоједарних ћелија на хистолошким препаратима јетре и повишен ниво циклина D1 у њој указују да је у јетри пацова са ДТ1 присутна регенерација. Ипак, како је ниво циклина D1 у дијабетичној јетри значајно

нижи у поређењу са оним у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом или мелатонином, може се претпоставити да је регенеративни капацитет јетре у дијабетесу смањен.

- 10.** Како активирана HMGB1/TLR4 оса води активацији STAT3 и JNK сигналних путева, одговорних за пролиферацију ћелија јетре преко циклин D1/p21 пута, смањење ванћелијског присуства HMGB1 протеина у јетри дијабетичних пацова третираних етил пируватом или мелатонином, има за последицу смањење активације поменутих путева, смањење увећаног присуства негативних регулатора ћелијског циклуса, протеина p53 и p21, и додатно увећање присуства циклина D1. Може се закључити да увећано присуство ванћелијског HMGB1 у дијабетесу посредством рецептора TLR4, негативно утиче на пролиферативни потенцијал ћелија јетре и стишава процес регенерације.
- 11.** Добијени резултати истраживања указују на разноврсност и сложеност утицаја HMGB1 протеина на размеру оштећења јетре. Ниво ослобођеног HMGB1, као и функционална интеракција између HMGB1/TLR4, IL-6 и TNF- α сигналних путева, највероватније одређују крајњи исход физиолошких одговора подстакнутих деловањем HMGB1. Стога би, превенција ослобађања HMGB1 или блокирање HMGB1/TLR4 осе, могли бити ефикасан механизам у циљу стишавања инфламације узроковане дијабетесом, увећања капацитета антиоксидативне одбране и регенерације, као и успоравања прогресије оштећења јетре.

Литература

- Abraham, E., Arcaroli, J., Carmody, A., Wang, H., and Tracey, K.J. (2000). HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J. Immunol.* *165*, 2950–2954.
- Agnello, D., Wang, H., Yang, H., Tracey, K.J., and Ghezzi, P. (2002). HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine* *18*, 231–236.
- Ahmed, N., Thornalley, P.J., Lüthen, R., Häussinger, D., Sebekova, K., Schinzel, R., Voelker, W., and Heidland, A. (2004). Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J. Hepatol.* *41*, 913–919.
- Ahsan, H., Ali, A., and Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* *131*, 398–404.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.
- Albayrak, A., Uyanik, M.H., Cerrah, S., Altas, S., Dursun, H., Demir, M., and Uslu, H. (2010). Is HMGB1 a new indirect marker for revealing fibrosis in chronic hepatitis and a new therapeutic target in treatment? *Viral Immunol.* *23*, 633–638.
- Alcaraz, M.J., Vicente, A.M., Araico, A., Dominguez, J.N., Terencio, M.C., and Ferrándiz, M.L. (2004). Role of nuclear factor-kappaB and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 cells. *Br. J. Pharmacol.* *142*, 1191–1199.
- American Diabetes Association, A.D. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* *33 Suppl 1*, S62-9.
- Andersson, U., and Tracey, K.J. (2011). HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 139–162.
- Andersson, U., Antoine, D.J., and Tracey, K.J. (2014). The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *J. Intern. Med.* *276*, 420–424.
- Andrassy, M., Volz, H.C., Igwe, J.C., Funke, B., Eichberger, S.N., Kaya, Z., Buss, S., Autschbach, F., Pleger, S.T., Lukic, I.K., et al. (2008). High-Mobility Group Box-1 in Ischemia-Reperfusion Injury of the Heart. *Circulation* *117*, 3216–3226.
- Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* *369*, 840–851.

- Antoine, D.J., Jenkins, R.E., Dear, J.W., Williams, D.P., McGill, M.R., Sharpe, M.R., Craig, D.G., Simpson, K.J., Jaeschke, H., and Park, B.K. (2012). Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J. Hepatol.* *56*, 1070–1079.
- Anwar, M.M., and Meki, A.-R.M.A. (2003). Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *135*, 539–547.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007). Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* *13*, 1050–1059.
- Aronson, D., and Rayfield, E.J. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc. Diabetol.* *1*, 1.
- Asleh, R., and Levy, A.P. (2005). In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc. Health Risk Manag.* *1*, 19–28.
- Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm. J.* *24*, 547–553.
- Auclair C, V.E. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press. Boca Raton, Pp 123–132.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2014*, 360438.
- Baker, C., Isenberg, I., Goodwin, G.H., and Johns, E.W. (1976). Physical studies of the nonhistone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2. *Biochemistry* *15*, 1645–1649.
- Bamboate, Z.M., Balachandran, V.P., Ocuin, L.M., Obaid, H., Plitas, G., and DeMatteo, R.P. (2010). Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* *51*, 621–632.
- Barlan, A.U., Griffin, T.M., Mcguire, K.A., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus Membrane Penetration Activates the NLRP3 Inflammasome. *J. Virol.* *85*, 146–155.
- Bauer, E.M., Shapiro, R., Billiar, T.R., and Bauer, P.M. (2013). High Mobility Group Box 1 Inhibits Human Pulmonary Artery Endothelial Cell Migration via a Toll-like Receptor 4- and Interferon Response Factor 3-dependent Mechanism(s). *J. Biol. Chem.* *288*, 1365–1373.

- Beutler, E. (1982). Catalase. In: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, Inc.
- Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Timeline: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 169–176.
- Bhatt, D., and Ghosh, S. (2014). Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front. Immunol.* *5*, 71.
- Bhatt, H.B., and Smith, R.J. (2015). Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* *4*, 101–108.
- Bianchi, M.E. (2004). Significant (re)location: How to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death. *Trends Cell Biol.* *14*, 287–293.
- Bianchi, M.E., Falciola, L., Ferrari, S., and Lilley, D.M. (1992). The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J.* *11*, 1055–1063.
- Bianchi, M.E., Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., and Ferrari, S. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.* *22*, 276–280.
- Biscetti, F., Straface, G., De Cristofaro, R., Lancellotti, S., Rizzo, P., Arena, V., Stigliano, E., Pecorini, G., Egashira, K., De Angelis, G., et al. (2010). High-Mobility Group Box-1 Protein Promotes Angiogenesis After Peripheral Ischemia in Diabetic Mice Through a VEGF-Dependent Mechanism. *Diabetes* *59*, 1496–1505.
- Bode, J.G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P.C., and Schaper, F. (2012). Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. *Eur. J. Cell Biol.* *91*, 496–505.
- Boffa, L.C., and Bolognesi, C. (1985). Methylating agents: their target amino acids in nuclear proteins. *Carcinogenesis* *6*, 1399–1401.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003a). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* *22*, 5551–5560.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003b). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* *22*, 5551–5560.

- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003c). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003d). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560.
- Brezniceanu, M.-L., Völp, K., Bösser, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., and Zörnig, M. (2003). HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J.* 17, 1295–1297.
- Buetler, T.M., and Eaton, D.L. (1992). Glutathione S-transferases: Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* 10, 181–203.
- Burnette, W.N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 152–153.
- Ceriello, A., Quatraro, A., and Giugliano, D. (1992). New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet. Med.* 9, 297–299.
- Chao, Y.B., Scovell, W.M., and Yan, S.B. (1994). High mobility group protein, HMG-1, contains insignificant glycosyl modification. *Protein Sci.* 3, 2452–2454.
- Chen, G., Li, J., Ochani, M., Rendon-Mitchell, B., Qiang, X., Susarla, S., Ulloa, L., Yang, H., Fan, S., Goyert, S.M., et al. (2004). Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 76, 994–1001.
- Chen, H.-G., Xie, K.-L., Han, H.-Z., Wang, W.-N., Liu, D.-Q., Wang, G.-L., and Yu, Y.-H. (2013a). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Surg.* 11, 1060–1066.
- Chen, J., John, R., Richardson, J.A., Shelton, J.M., Zhou, X.J., Wang, Y., Wu, Q.Q., Hartono, J.R., Winterberg, P.D., and Lu, C.Y. (2011). Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 79, 288–299.

- Chen, R., Hou, W., Zhang, Q., Kang, R., Fan, X.-G., and Tang, D. (2013b). Emerging role of high-mobility group box 1 (HMGB1) in liver diseases. *Mol. Med.* *19*, 357–366.
- Chiang, H.-S., and Maric, M. (2011). Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 688–699.
- Chikezie, P.C., Ojiako, O.A., and Ogbuji, A.C. (2015). Oxidative stress in diabetes mellitus. *Integr. Obes. Diabetes I.*
- Choi, H.K., and Waxman, D.J. (1999). Growth Hormone, but Not Prolactin, Maintains Low-Level Activation of STAT5a and STAT5b in Female Rat Liver. *Endocrinology* *140*, 5126–5135.
- Chorny, A., and Delgado, M. (2008). Neuropeptides Rescue Mice from Lethal Sepsis by Down-regulating Secretion of the Late-Acting Inflammatory Mediator High Mobility Group Box 1. *Am. J. Pathol.* *172*, 1297–1302.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science (80-.)*. *332*, 1519–1523.
- Conti, L., Lanzardo, S., Arigoni, M., Antonazzo, R., Radaelli, E., Cantarella, D., Calogero, R.A., and Cavallo, F. (2013). The noninflammatory role of high mobility group box 1/toll-like receptor 2 axis in the self-renewal of mammary cancer stem cells. *FASEB J.* *27*, 4731–4744.
- Dasu, M.R., and Jialal, I. (2011). Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *AJP Endocrinol. Metab.* *300*, E145–E154.
- Day, C.P., and James, O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* *114*, 842–845.
- Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* *19*, 2628–2637.
- Degryse, B., and de Virgilio, M. (2003). The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Lett.* *553*, 11–17.
- Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Müller, S., Resnati, M., Sanvito, F., Arrighi, G., and Bianchi, M.E. (2001). The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMGB1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* *152*, 1197–1206.
- Dejean, E., Foisseau, M., Lagarrigue, F., Lamant, L., Prade, N., Marfak, A., Delsol, G., Giuriato, S., Gaits-Iacovoni, F., and Meggetto, F. (2012). ALK+ALCLs induce cutaneous, HMGB-1-dependent IL-8/CXCL8 production by keratinocytes through NF- κ B activation. *Blood* *119*, 4698–4707.

- Deryabin, P.I., Borodkina, A. V., Nikolsky, N.N., and Burova, E.B. (2016). The relationship between p53/p21/Rb and MAPK signaling pathways in human endometrium-derived stem cells under oxidative stress. *Cell Tissue Biol.* *10*, 185–193.
- Devaraj, S., Cheung, A.T., Jialal, I., Griffen, S.C., Nguyen, D., Glaser, N., and Aoki, T. (2007). Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes* *56*, 2790–2796.
- Dhupar, R., Klune, J.R., Evankovich, J., Cardinal, J., Zhang, M., Ross, M., Murase, N., Geller, D.A., Billiar, T.R., and Tsung, A. (2011). Interferon Regulatory Factor 1 Mediates Acetylation and Release of High Mobility Group Box 1 from Hepatocytes During Murine Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Shock* *35*, 293–301.
- Dinić, S., Arambašić, J., Mihailović, M., Uskoković, A., Grdović, N., Marković, J., Karadžić, B., Poznanović, G., and Vidaković, M. (2013). Decreased O-GlcNAcylation of the key proteins in kinase and redox signalling pathways is a novel mechanism of the beneficial effect of α -lipoic acid in diabetic liver. *Br. J. Nutr.* *110*, 401–412.
- Dintilhac, A., and Bernu?s, J. (2002). HMGB1 Interacts with Many Apparently Unrelated Proteins by Recognizing Short Amino Acid Sequences. *J. Biol. Chem.* *277*, 7021–7028.
- Ditsworth, D., Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2007). Activation of Poly(ADP)-ribose Polymerase (PARP-1) Induces Release of the Pro-inflammatory Mediator HMGB1 from the Nucleus. *J. Biol. Chem.* *282*, 17845–17854.
- Dong, Y., Gu, Y., Huan, Y., Wang, Y., Liu, Y., Liu, M., Ding, F., Gu, X., and Wang, Y. (2013). HMGB1 protein does not mediate the inflammatory response in spontaneous spinal cord regeneration: a hint for CNS regeneration. *J. Biol. Chem.* *288*, 18204–18218.
- Dong, Y., Liu, Y., Kou, X., Jing, Y., Sun, K., Sheng, D., Yu, G., Yu, D., Zhao, Q., Zhao, X., et al. (2016). The protective or damaging effect of Tumor necrosis factor- α in acute liver injury is concentration-dependent. *Cell Biosci.* *6*, 8.
- Downs, C.A., and Faulkner, M.S. (2015a). Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. *World J. Diabetes* *6*, 554.
- Downs, C.A., and Faulkner, M.S. (2015b). Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. *World J. Diabetes* *6*, 554.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., and Düfer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *460*, 703–718.

- Drosten, M., Sum, E.Y.M., Lechuga, C.G., Simón-Carrasco, L., Jacob, H.K.C., García-Medina, R., Huang, S., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., and Barbacid, M. (2014). Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 15155–15160.
- Dumitriu, I.E., Bianchi, M.E., Bacci, M., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2006). The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 81, 84–91.
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* 30, 4701–4711.
- Erlandsson Harris, H., and Andersson, U. (2004). Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J. Immunol.* 34, 1503–1512.
- Evankovich, J., Billiar, T., and Tsung, A. (2010). Toll-Like Receptors in Hepatic Ischemia/Reperfusion and Transplantation. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010, 1–8.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1–8.
- Fages, C., Nolo, R., Huttunen, H.J., Eskelinen, E., and Rauvala, H. (2000). Regulation of cell migration by amphotericin. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 611–620.
- Fakhrudin, S., Alanazi, W., and Jackson, K.E. (2017). Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury. *J. Diabetes Res.* 2017, 1–30.
- Fang, W.-H., Yao, Y.-M., Shi, Z.-G., Yu, Y., Wu, Y., Lu, L.-R., and Sheng, Z.-Y. (2002). The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury. *Shock* 17, 329–333.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32, 19–31.
- Ferrari S, Ronfani L, Calogero S, B.M. (1994). The mouse gene coding for high mobility group 1 protein (HMG1). *J Biol Chem.* 269, 28803–28808.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Friedman, S.L. (2008). Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655–1669.

- Fujita, H., Fujishima, H., Chida, S., Takahashi, K., Qi, Z., Kanetsuna, Y., Breyer, M.D., Harris, R.C., Yamada, Y., and Takahashi, T. (2009). Reduction of Renal Superoxide Dismutase in Progressive Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 1303–1313.
- Fujiyoshi, M., and Ozaki, M. (2011). Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* *18*, 13–22.
- Furlani, D., Donndorf, P., Westien, I., Ugurlucan, M., Pittermann, E., Wang, W., Li, W., Vollmar, B., Steinhoff, G., Kaminski, A., et al. (2012). HMGB-1 induces c-kit⁺ cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 1094–1105.
- Gabay, C., and Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N. Engl. J. Med.* *340*, 448–454.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Garcia-Compean, D., Jaquez-Quintana, J.O., Gonzalez-Gonzalez, J.A., and Maldonado-Garza, H. (2009). Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J. Gastroenterol.* *15*, 280–288.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E., and Rubartelli, A. (2002a). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* *3*, 995–1001.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E., and Rubartelli, A. (2002b). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* *3*, 995–1001.
- Gariboldi, M., De Gregorio, L., Ferrari, S., Manenti, G., Pierotti, M.A., Bianchi, M.E., and Dragani, T.A. (1995). Mapping of the Hmg1 gene and of seven related sequences in the mouse. *Mamm. Genome* *6*, 581–585.
- Gavin N. Levinthal, MD, and Anthony S. Tavill, MD, FRCP, F. (1999). Liver Disease and Diabetes Mellitus. *Clin. DIABETES* *17*.
- El Gazzar, M. (2007). HMGB1 modulates inflammatory responses in LPS-activated macrophages. *Inflamm. Res.* *56*, 162–167.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* *107*, 1058–1070.

- Giavara, S., Kosmidou, E., Hande, M.P., Bianchi, M.E., Morgan, A., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2005). Yeast Nhp6A/B and Mammalian Hmgb1 Facilitate the Maintenance of Genome Stability. *Curr. Biol.* *15*, 68–72.
- Gomes, E.C., Silva, A.N., and Oliveira, M.R. de (2012). Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2012*, 1–12.
- Gong, G., Yuan, L., Hu, L., Wu, W., Yin, L., Hou, J., Liu, Y., and Zhou, L. (2012). cyrrhizin attenuates rat ischemic spinal cord injury by suppressing inflammatory cytokines and HMGB1. *Acta Pharmacol. Sin.* *33*, 11–18.
- Goodwin, G.H., Sanders, C., and Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* *38*, 14–19.
- Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* *47*, 767–776.
- Greten, F.R., Arkan, M.C., Bollrath, J., Hsu, L.-C., Goode, J., Miething, C., Göktuna, S.I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., et al. (2007). NF- κ B Is a Negative Regulator of IL-1 β Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK β . *Cell* *130*, 918–931.
- Grigorov I, Lazic T, Cvetkovic I, Milosavljevic T, P.M. (2000). STAT3 involvement in the acute phase-related expression of the rat haptoglobin gene. *Mol Biol Rep.* *27*, 81–86.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., and Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* *6*, 1045–1056.
- Guerin, R., Arseneault, G., Dumont, S., and Rokeach, L.A. (2008). Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4404–4420.
- Gunasekaran, M.K., Virama-Latchoumy, A.-L., Girard, A.-C., Planesse, C., Guérin-Dubourg, A., Ottosson, L., Andersson, U., Césari, M., Roche, R., and Hoareau, L. (2016). TLR4-dependant pro-inflammatory effects of HMGB1 on human adipocyte. *Adipocyte* *5*, 384–388.
- Guo, J., and Friedman, S.L. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* *3*, 21.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* *249*, 7130–7139.

- Hagiwara, S., Iwasaka, H., Hasegawa, A., Koga, H., and Noguchi, T. (2008). Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box 1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model. *Crit. Care Med.* *36*, 2407–2413.
- Halliwell, B., and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* *57*, 715S–724S; discussion 724S–725S.
- Han, J., Zhong, J., Wei, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, P., Purohit, S., Dong, Z., Wang, M.-H., She, J.-X., et al. (2008). Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes* *57*, 2118–2127.
- Han, Y., Englert, J.A., Yang, R., Delude, R.L., and Fink, M.P. (2004). Ethyl Pyruvate Inhibits Nuclear Factor- κ B-Dependent Signaling by Directly Targeting p65. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *312*, 1097–1105.
- Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, S.S. (1999). Elevated O-linked Nacetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys* *362*, 38–45.
- Hao, J., Zhang, Y. -j., Lv, X., Xu, N., Liu, Q. -j., Zhao, S., Feng, X. -j., Xing, L. -l., Kang, P. -p., Li, G. -y., et al. (2013). IFN- γ induces lipogenesis in mouse mesangial cells via the JAK2/STAT1 pathway. *AJP Cell Physiol.* *304*, C760–C767.
- Harris, H.E., Andersson, U., and Pisetsky, D.S. (2012). HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *8*, 195–202.
- Hart, G.W., and Akimoto, Y. (2009). *The O-GlcNAc Modification* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hataji, K., Watanabe, T., Oowada, S., Nagaya, M., Kamibayashi, M., Murakami, E., Kawakami, H., Ishiuchi, A., Kumai, T., Nakano, H., et al. (2010). Effects of a calcium-channel blocker (CV159) on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: evaluation with selective NO/pO₂ electrodes and an electron paramagnetic resonance spin-trapping method. *Biol. Pharm. Bull.* *33*, 77–83.
- He, G., Siddik, Z.H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* *24*, 2929–2943.
- He, M., Kubo, H., Morimoto, K., Fujino, N., Suzuki, T., Takahashi, T., Yamada, M., Yamaya, M., Maekawa, T., Yamamoto, Y., et al. (2011). Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* *12*, 358–364.

- He, Y., Ding, Y., Wang, D., Zhang, W., Chen, W., Liu, X., Qin, W., Qian, X., Chen, H., and Guo, Z. (2015). HMGB1 bound to cisplatin–DNA adducts undergoes extensive acetylation and phosphorylation in vivo. *Chem. Sci.* *6*, 2074–2078.
- Herzog, C., Lorenz, A., Gillmann, H.-J., Chowdhury, A., Larmann, J., Harendza, T., Echtermeyer, F., Müller, M., Schmitz, M., Stypmann, J., et al. (2014). Thrombomodulin's lectin-like domain reduces myocardial damage by interfering with HMGB1-mediated TLR2 signalling. *Cardiovasc. Res.* *101*, 400–410.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* *6*, 103–112.
- Hirata, Y., Kurobe, H., Higashida, M., Fukuda, D., Shimabukuro, M., Tanaka, K., Higashikuni, Y., Kitagawa, T., and Sata, M. (2013). HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. *Atherosclerosis* *231*, 227–233.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *95*, 2409–2415.
- Hreggvidsdottir, H.S., Ostberg, T., Wahamaa, H., Schierbeck, H., Aveberger, A.-C., Klevenvall, L., Palmblad, K., Ottosson, L., Andersson, U., and Harris, H.E. (2009). The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 655–662.
- Huang, H., Nace, G.W., McDonald, K.-A., Tai, S., Klune, J.R., Rosborough, B.R., Ding, Q., Loughran, P., Zhu, X., Beer-Stolz, D., et al. (2014). Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: A role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection. *Hepatology* *59*, 1984–1997.
- Huang, J., Ni, J., Liu, K., Yu, Y., Xie, M., Kang, R., Vernon, P., Cao, L., and Tang, D. (2012). HMGB1 Promotes Drug Resistance in Osteosarcoma. *Cancer Res.* *72*, 230–238.
- Huang, J., Liu, B., Yang, C., Chen, H., Eunice, D., and Yuan, Z. (2013). Acute hyperglycemia worsens ischemic stroke-induced brain damage via high mobility group box-1 in rats. *Brain Res.* *1535*, 148–155.
- Hunt, J. V., Dean, R.T., and Wolff, S.P. (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* *256*, 205–212.

- Hutten, S., and Kehlenbach, R.H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* *17*, 193–201.
- Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J., and Rauvala, H. (2002). Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.* *62*, 4805–4811.
- Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 3203–3208.
- Ilmakunnas, M., Tukiainen, E.M., Rouhiainen, A., Rauvala, H., Arola, J., Nordin, A., Mäkisalo, H., Höckerstedt, K., and Isoniemi, H. (2008). High mobility group box 1 protein as a marker of hepatocellular injury in human liver transplantation. *Liver Transplant.* *14*, 1517–1525.
- Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., et al. (2003). Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, S227-32.
- Isackson, P.J., Bidney, D.L., Reeck, G.R., Neihart, N.K., and Bustin, M. (1980). High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar. *Biochemistry* *19*, 4466–4471.
- Issad, T. (2010). O-GlcNAc glycosylation et régulation de la signalisation cellulaire. *Médecine/sciences* *26*, 753–759.
- Ito, I., Fukazawa, J., and Yoshida, M. (2007a). Post-translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* *282*, 16336–16344.
- Ito, I., Fukazawa, J., and Yoshida, M. (2007b). Post-translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* *282*, 16336–16344.
- Itoh, T., Takita, M., Sorelle, J.A., Shimoda, M., Sugimoto, K., Chujo, D., Qin, H., Naziruddin, B., Levy, M.F., and Matsumoto, S. (2012). Correlation of Released HMGB1 Levels with the Degree of Islet Damage in Mice and Humans and with the Outcomes of Islet Transplantation in Mice. *Cell Transplant.* *21*, 1371–1381.
- Jaganjac, M., Tirosh, O., Cohen, G., Sasson, S., and Zarkovic, N. (2013). Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radic. Res.* *47*, 39–48.
- Jin, X., Zimmers, T.A., Perez, E.A., Pierce, R.H., Zhang, Z., and Koniaris, L.G. (2006). Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* *43*, 474–484.

- Kamo, N., Ke, B., Ghaffari, A.A., Shen, X., Busuttill, R.W., Cheng, G., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2013). ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 58, 351–362.
- Kang, H., Lee, S.Y., Ju, M.K., Kim, C.H., Park, H.G., and Kang, H.S. (2012a). Early growth response 1 regulates glucose deprivation-induced necrosis. *Oncol. Rep.* 29, 669–675.
- Kang, H.J., Lee, H., Choi, H.-J., Youn, J.H., Shin, J.-S., Ahn, Y.H., Yoo, J.S., Paik, Y.-K., and Kim, H. (2009). Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Lab. Investig.* 89, 948–959.
- Kang, R., Tang, D., Schapiro, N.E., Livesey, K.M., Farkas, A., Loughran, P., Bierhaus, A., Lotze, M.T., and Zeh, H.J. (2010). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ.* 17, 666–676.
- Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. *Autophagy* 7, 904–906.
- Kang, R., Loux, T., Tang, D., Schapiro, N.E., Vernon, P., Livesey, K.M., Krasinskas, A., Lotze, M.T., and Zeh, H.J. (2012b). The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7031–7036.
- Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X., Yan, Z., et al. (2014a). HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 40, 1–116.
- Kang, R., Zhang, Q., Hou, W., Yan, Z., Chen, R., Bonaroti, J., Bansal, P., Billiar, T.R., Tsung, A., Wang, Q., et al. (2014b). Intracellular Hmgb1 Inhibits Inflammatory Nucleosome Release and Limits Acute Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 146, 1097–1107.e8.
- Kao, Y.-H., Jawan, B., Goto, S., Hung, C.-T., Lin, Y.-C., Nakano, T., Hsu, L.-W., Lai, C.-Y., Tai, M.-H., and Chen, C.-L. (2008). High-Mobility Group Box 1 Protein Activates Hepatic Stellate Cells In Vitro. *Transplant. Proc.* 40, 2704–2705.
- Kazama, H., Ricci, J.-E., Herndon, J.M., Hoppe, G., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (2008). Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein. *Immunity* 29, 21–32.
- Kim, H.S., Cho, I.H., Kim, J.E., Shin, Y.J., Jeon, J.-H., Kim, Y., Yang, Y.M., Lee, K.-H., Lee, J.W., Lee, W.-J., et al. (2008). Ethyl pyruvate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 950–963.

- Kim, S., Kim, S.Y., Pribis, J.P., Lotze, M., Mollen, K.P., Shapiro, R., Loughran, P., Scott, M.J., and Billiar, T.R. (2013a). Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol. Med.* *19*, 88–98.
- Kim, S.-W., Lee, H.-K., Shin, J.-H., and Lee, J.-K. (2013b). Up-down Regulation of HO-1 and iNOS Gene Expressions by Ethyl Pyruvate via Recruiting p300 to Nrf2 and Depriving It from p65. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 468–476.
- Kim, Y.H., Kwak, M.S., Park, J.B., Lee, S.-A., Choi, J.E., Cho, H.-S., and Shin, J.-S. (2016a). N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1. *J. Cell Sci.* *129*, 29–38.
- Kim, Y.M., Park, E.J., Kim, J.H., Park, S.W., Kim, H.J., and Chang, K.C. (2016b). Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol.* *41*, 98–105.
- Knapp, S., Müller, S., Digilio, G., Bonaldi, T., Bianchi, M.E., and Musco, G. (2004). The Long Acidic Tail of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein Forms an Extended and Flexible Structure That Interacts with Specific Residues within and between the HMG Boxes[†]. *Biochemistry* *43*, 11992–11997.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 1004–1010.
- Kruger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S.M., Ames, S., Bromberg, J.S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischereeder, M., et al. (2009). Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3390–3395.
- Kuehl, L., Rechsteiner, M., and Wu, L. (1985). Relationship between the structure of chromosomal protein HMG1 and its accumulation in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* *260*, 10361–10368.
- Kuwata, H., Watanabe, Y., Miyoshi, H., Yamamoto, M., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-production in macrophages. *Blood* *102*, 4123–4129.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Laird, M.D., Shields, J.S., Sukumari-Ramesh, S., Kimbler, D.E., Fessler, R.D., Shakir, B., Youssef, P., Yanasak, N., Vender, J.R., and Dhandapani, K.M. (2014). High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia* *62*, 26–38.

- Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A.C., Amer, A.O., Wewers, M.D., Tracey, K.J., Kanneganti, T.-D., and Dixit, V.M. (2010). Inflammasome-Dependent Release of the Alarmin HMGB1 in Endotoxemia. *J. Immunol.* *185*, 4385–4392.
- Lang, C.H., Silvis, C., Deshpande, N., Nystrom, G., and Frost, R.A. (2003). Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* *19*, 538–546.
- LeBlanc, P.M., Doggett, T.A., Choi, J., Hancock, M.A., Durocher, Y., Frank, F., Nagar, B., Ferguson, T.A., and Saleh, M. (2014). An Immunogenic Peptide in the A-box of HMGB1 Protein Reverses Apoptosis-induced Tolerance through RAGE Receptor. *J. Biol. Chem.* *289*, 7777–7786.
- Lee, H., Park, M., Shin, N., Kim, G., Kim, Y.G., Shin, J.-S., and Kim, H. (2012). High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *424*, 321–326.
- Lee, H.-K., Kim, I.-D., Kim, S.-W., Lee, H., Park, J.-Y., Yoon, S.-H., and Lee, J.-K. (2017). Anti-inflammatory and anti-excitotoxic effects of diethyl oxopropanamide, an ethyl pyruvate bioisoster, exert robust neuroprotective effects in the postischemic brain. *Sci. Rep.* *7*, 42891.
- Lee, S.Y., Jeon, H.M., Kim, C.H., Jeong, E.K., Ju, M.K., Park, S.Y., Jung, S.Y., Kim, Y.J., Lim, S.-C., Han, S.I., et al. (2010). CuZnSOD and MnSOD inhibit metabolic stress-induced necrosis and multicellular tumour spheroid growth. *Int. J. Oncol.* *37*, 195–202.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* *51*, 216–226.
- Leung, T.-M., and Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *58*, 395–398.
- Li, J., Qu, X., and Schmidt, A.M. (1998). Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphotericin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 30870–30878.
- Li, L., Chen, L., Hu, L., Liu, Y., Sun, H.-Y., Tang, J., Hou, Y.-J., Chang, Y.-X., Tu, Q.-Q., Feng, G.-S., et al. (2011). Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* *54*, 1620–1630.
- Li, M., Song, L., Gao, X., Chang, W., and Qin, X. (2012). Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp. Mol. Med.* *44*, 260–267.

- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., and Taub, R. (2002). STAT3 Contributes to the Mitogenic Response of Hepatocytes during Liver Regeneration. *J. Biol. Chem.* *277*, 28411–28417.
- Liliensiek, B., Weigand, M.A., Bierhaus, A., Nicklas, W., Kasper, M., Hofer, S., Plachky, J., Gröne, H.-J., Kurschus, F.C., Schmidt, A.M., et al. (2004). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J. Clin. Invest.* *113*, 1641–1650.
- Lin, Q., Yang, X.P., Fang, D., Ren, X., Zhou, H., Fang, J., Liu, X., Zhou, S., Wen, F., Yao, X., et al. (2011). High-Mobility Group Box-1 Mediates Toll-Like Receptor 4-Dependent Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1024–1032.
- Liu, G.-H., Qu, J., and Shen, X. (2008). NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1783*, 713–727.
- Liu, K., Paterson, A.J., Chin, E., and Kudlow, J.E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2820–2825.
- Lobenhofer, E.K., Boorman, G.A., Phillips, K.L., Heinloth, A.N., Malarkey, D.E., Blackshear, P.E., Houle, C., and Hurban, P. (2006). Application of Visualization Tools to the Analysis of Histopathological Data Enhances Biological Insight and Interpretation. *Toxicol. Pathol.* *34*, 921–928.
- Loomba, R., Abraham, M., Unalp, A., Wilson, L., Lavine, J., Doo, E., Bass, N.M., Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, N.M., and Network, T.N.C.R. (2012). Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology* *56*, 943–951.
- Lorenzo, O., Picatoste, B., Ares-Carrasco, S., Ramírez, E., Egido, J., and Tuñón, J. (2011). Potential Role of Nuclear Factor κ B in Diabetic Cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* *2011*, 1–9.
- Loria, P., Lonardo, A., and Anania, F. (2013). Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol. Res.* *43*, 51–64.
- Lorin, S., Pierron, G., Ryan, K.M., Codogno, P., and Djavaheri-Mergny, M. (2010). Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy* *6*, 153–154.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.

- Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., and Guguen-Guillouzo, C. (1996). Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *J. Biol. Chem.* *271*, 11484–11492.
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., Valdes-Ferrer, S.I., Olofsson, P.S., Kalb, T., Roth, J., et al. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* *488*, 670–674.
- Lu, B., Antoine, D.J., Kwan, K., Lundback, P., Wahamaa, H., Schierbeck, H., Robinson, M., Van Zoelen, M.A.D., Yang, H., Li, J., et al. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 3068–3073.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* *42*, 145–151.
- Lundbäck, P., Stridh, P., Klevenvall, L., Jenkins, R.E., Fischer, M., Sundberg, E., Andersson, U., Antoine, D.J., and Harris, H.E. (2016). Characterization of the Inflammatory Properties of Actively Released HMGB1 in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Antioxid. Redox Signal.* *24*, 605–619.
- Lv, B., Wang, H., Tang, Y., Fan, Z., Xiao, X., and Chen, F. (2009). High-mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of NF- κ B and Egr-1. *Thromb. Haemost.* *102*, 352–359.
- Ma, L., Kim, S.-J., and Oh, K.I. (2012). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase is Involved in the Release of High Mobility Group Box 1 Via the Interferon- β Signaling Pathway. *Immune Netw.* *12*, 148–154.
- Magna, M., and Pisetsky, D.S. (2014). The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol. Med.* *20*, 138–146.
- Majumdar, G., Harmon, A., Candelaria, R., Martinez-Hernandez, A., Raghov, R., and Solomon, S.S. (2003). O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *Am. J. Physiol. Metab.* *285*, E584–E591.
- Makhatadze, N.J. (1998). Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum. Immunol.* *59*, 571–579.
- Manigrasso, M.B., Juranek, J., Ramasamy, R., and Schmidt, A.M. (2014). Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 15–22.

- Manna, P., Das, J., Ghosh, J., and Sil, P.C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I κ B α /NF- κ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 1465–1484.
- Maritim, A.C., Moore, B.H., Sanders, R.A., and Watkins, J.B. (1999). Maritim, A. C., Moore, B. H., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. (1999). Effects of Melatonin on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Toxicology*, *18*(3), 161–166. <https://doi.org/10.1080/109158199225440> Effects of. *Int. J. Toxicol.* *18*, 161–166.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., and Watkins, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *17*, 24–38.
- Matsuoka, N., Itoh, T., Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Nagata, N., Okamoto, K., Mera, T., Yamamoto, H., Yamada, S., Maruyama, I., et al. (2010). High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 735–743.
- Mavrogiannaki, A.N., and Migdalis, I.N. (2013). Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Newer Data. *Int. J. Endocrinol.* *2013*, 1–8.
- McGettrick, A.F., and O'Neill, L.A. (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 20–27.
- Mehendale, H.M. (2005). Tissue Repair: An Important Determinant of Final Outcome of Toxicant-Induced Injury. *Toxicol. Pathol.* *33*, 41–51.
- Mehers, K.L., and Gillespie, K.M. (2008). The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* *88*, 115–129.
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 724–737.
- Miao, L., and St. Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* *47*, 344–356.
- Miller, J.M., Thompson, J.K., MacPherson, M.B., Beuschel, S.L., Westbom, C.M., Sayan, M., and Shukla, A. (2014). Curcumin: A Double Hit on Malignant Mesothelioma. *Cancer Prev. Res.* *7*, 330–340.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* *247*, 3170–3175.
- Miyake, K. (2004). Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin. Immunol.* *16*, 11–16.

- Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A.H., Zariyantey, A.H., and Budin, S.B. (2016). Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* *16*, e132-41.
- Montilla, P.L., Vargas, J.F., Túnez, I.F., Muñoz de Agueda, M.C., Valdelvira, M.E., and Cabrera, E.S. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* *25*, 94–100.
- Moreira, R.K. (2007). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *131*, 1728–1734.
- De Mori, R., Straino, S., Di Carlo, A., Mangoni, A., Pompilio, G., Palumbo, R., Bianchi, M.E., Capogrossi, M.C., and Germani, A. (2007). Multiple Effects of High Mobility Group Box Protein 1 in Skeletal Muscle Regeneration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 2377–2383.
- Müller, S., Ronfani, L., and Bianchi, M.E. (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J. Intern. Med.* *255*, 332–343.
- Mylonas, C., and Kouretas, D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* *13*, 295–309.
- Nannipieri, M., Gonzales, C., Baldi, S., Posadas, R., Williams, K., Haffner, S.M., Stern, M.P., Ferrannini, E., and Mexico City diabetes study (2005). Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* *28*, 1757–1762.
- Nishigaki, I., Hagihara, M., Tsunekawa, H., Maseki, M., and Yagi, K. (1981). Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem. Med.* *25*, 373–378.
- Nishikawa, T., and Araki, E. (2006). Impact of Mitochondrial ROS Production in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Antioxid. Redox Signal.* *0*, 61221112325010.
- Norris, C.A., He, M., Kang, L.-I., Ding, M.Q., Radder, J.E., Haynes, M.M., Yang, Y., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Orr, A., et al. (2014). Synthesis of IL-6 by Hepatocytes Is a Normal Response to Common Hepatic Stimuli. *PLoS One* *9*, e96053.
- Nowak, J.Z. (2013). Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol. Rep.* *65*, 288–304.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* *250*, 4007–4021.

- Ogiku, M., Kono, H., Hara, M., Tsuchiya, M., and Fujii, H. (2011). Glycyrrhizin Prevents Liver Injury by Inhibition of High-Mobility Group Box 1 Production by Kupffer Cells after Ischemia-Reperfusion in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *339*, 93–98.
- Oh, Y.J., Youn, J.H., Ji, Y., Lee, S.E., Lim, K.J., Choi, J.E., and Shin, J.-S. (2009). HMGB1 Is Phosphorylated by Classical Protein Kinase C and Is Secreted by a Calcium-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* *182*, 5800–5809.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* *95*, 351–358.
- Orlova, V. V., Choi, E.Y., Xie, C., Chavakis, E., Bierhaus, A., Ihanus, E., Ballantyne, C.M., Gahmberg, C.G., Bianchi, M.E., Nawroth, P.P., et al. (2007). A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J.* *26*, 1129–1139.
- Paik, Y., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., and Brenner, D.A. (2003). Toll-Like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* *37*, 1043–1055.
- Palsamy, P., Sivakumar, S., and Subramanian, S. (2010). Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* *186*, 200–210.
- Palumbo, R., and Bianchi, M.E. (2004). High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem. Pharmacol.* *68*, 1165–1170.
- Palumbo, R., Sampaolesi, M., De Marchis, F., Tonlorenzi, R., Colombetti, S., Mondino, A., Cossu, G., and Bianchi, M.E. (2004). Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J. Cell Biol.* *164*, 441–449.
- Park, S., and Lippard, S.J. (2011). Redox State-Dependent Interaction of HMGB1 and Cisplatin-Modified DNA. *Biochemistry* *50*, 2567–2574.
- Park, E.J., Kim, Y.M., Park, S.W., Kim, H.J., Lee, J.H., Lee, D.-U., and Chang, K.C. (2013). Induction of HO-1 through p38 MAPK/Nrf2 signaling pathway by ethanol extract of *Inula helenium* L. reduces inflammation in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice. *Food Chem. Toxicol.* *55*, 386–395.
- Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Sohn, J.-W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., et al. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *290*.

- Pedrazzi, M., Patrone, M., Passalacqua, M., Ranzato, E., Colamassaro, D., Sparatore, B., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2007). Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling. *J. Immunol.* *179*, 8525–8532.
- Petrović, A., Bogojević, D., Korać, A., Golić, I., Jovanović-Stojanov, S., Martinović, V., Ivanović-Matić, S., Stevanović, J., Poznanović, G., and Grigorov, I. (2017). Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver. *J. Physiol. Biochem.*
- Pisetsky, D.S., Gauley, J., and Ullal, A.J. (2011). HMGB1 and Microparticles as Mediators of the Immune Response to Cell Death. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2209–2219.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., and Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*, 1–13.
- Prasad, S., and Thakur, M.K. (1990). Distribution of high mobility group proteins in different tissues of rats during aging. *Biochem. Int.* *20*, 687–695.
- Ranzato, E., Patrone, M., Pedrazzi, M., and Burlando, B. (2009). HMGB1 promotes scratch wound closure of HaCaT keratinocytes via ERK1/2 activation. *Mol. Cell. Biochem.* *332*, 199–205.
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., and Simonsen, A. (2012). Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. *Int. J. Cell Biol.* *2012*, 1–18.
- Ren, D., Sun, R., and Wang, S. (2006). Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in High Mobility Group Box 1- induced acute lung injury. *Inflamm. Res.* *55*, 207–215.
- Robbins, S.L. (Stanley L., Kumar, V., and Cotran, R.S. (2010). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. (Saunders/Elsevier).
- Rolo, A.P., and Palmeira, C.M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *212*, 167–178.
- Romani, M., Rodman, T.C., Vidali, G., and Bustin, M. (1979). Serological analysis of species specificity in the high mobility group chromosomal proteins. *J. Biol. Chem.* *254*, 2918–2922.
- Rouhiainen, A., Tumova, S., Valmu, L., Kalkkinen, N., and Rauvala, H. (2006). Analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J. Leukoc. Biol.* *81*, 49–58.
- Rowell, J.P., Simpson, K.L., Stott, K., Watson, M., and Thomas, J.O. (2012). HMGB1-Facilitated p53 DNA Binding Occurs via HMG-Box/p53 Transactivation Domain Interaction, Regulated by the Acidic Tail. *Structure* *20*, 2014–2024.

- Sabio, G., and Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* *26*, 237–245.
- Sahu, D., Debnath, P., Takayama, Y., and Iwahara, J. (2008). Redox properties of the A-domain of the HMGB1 protein. *FEBS Lett.* *582*, 3973–3978.
- Sánchez-Valle, V., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M., and Méndez-Sánchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.* *19*, 4850–4860.
- Sappington, P.L., Yang, R., Yang, H., Tracey, K.J., Delude, R.L., and Fink, M.P. (2002). HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* *123*, 790–802.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* *140*, 821–832.
- Schwabe, R.F., Seki, E., and Brenner, D.A. (2006). Toll-Like Receptor Signaling in the Liver. *Gastroenterology* *130*, 1886–1900.
- Sebeková, K., Kupcová, V., Schinzel, R., and Heidland, A. (2002). Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis - amelioration by liver transplantation. *J. Hepatol.* *36*, 66–71.
- Shacter, E. (2000). Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples. *Drug Metab. Rev.* *32*, 307–326.
- Shao, B., and Heinecke, J.W. (2009). HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* *50*, 599–601.
- She, Q.B., Chen, N., and Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J. Biol. Chem.* *275*, 20444–20449.
- Shen, M., Lu, J., Dai, W., Wang, F., Xu, L., Chen, K., He, L., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C., et al. (2013). Ethyl pyruvate ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting intrinsic pathway of apoptosis and autophagy. *Mediators Inflamm.* *2013*, 461536.
- Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., et al. (2012). Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat. Med.* *18*, 911–917.
- Shin, J.-H., Kim, I.-D., Kim, S.-W., Lee, H.-K., Jin, Y., Park, J.-H., Kim, T.-K., Suh, C.-K., Kwak, J., Lee, K.-H., et al. (2015). Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium. *Mol. Med.* *20*, 649–657.

- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (2001). Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 21129–21135.
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 367–388.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* *175*, 184–191.
- Škrha Jr, J., Kalousová, M., Švarcová, J., Muravská, A., Kvasnička, J., Landová, L., Zima, T., and Škrha, J. (2012). Relationship of Soluble RAGE and RAGE Ligands HMGB1 and EN-RAGE to Endothelial Dysfunction in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* *120*, 277–281.
- Spiller, S., Li, Y., Blüher, M., Welch, L., and Hoffmann, R. (2017). Glycated lysine-141 in haptoglobin improves the diagnostic accuracy for type 2 diabetes mellitus in combination with glycated hemoglobin HbA1c and fasting plasma glucose. *Clin. Proteomics* *14*, 10.
- Srikrishna, G., and Freeze, H.H. (2009). Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* *11*, 615–628.
- Sterner, R., Vidali, G., and Allfrey, V.G. (1979). Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in HMG-1. *J. Biol. Chem.* *254*, 11577–11583.
- Stirban, A.O., and Tschoepe, D. (2008). Cardiovascular complications in diabetes: targets and interventions. *Diabetes Care* *31 Suppl 2*, S215-21.
- Stone, B., and Van Thiel, D. (1985). Diabetes Mellitus and the Liver. *Semin. Liver Dis.* *5*, 8–28.
- Stott, K., Watson, M., Howe, F.S., Grossmann, J.G., and Thomas, J.O. (2010). Tail-Mediated Collapse of HMGB1 Is Dynamic and Occurs via Differential Binding of the Acidic Tail to the A and B Domains. *J. Mol. Biol.* *403*, 706–722.
- Stumbo, A., Cortez, E., Rodrigues, C., Henriques, M., Porto, L., Barbosa, H., and Carvalho, L. (2008). Mitochondrial localization of non-histone protein HMGB1 during human endothelial cell? *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Biol. Int.* *32*, 235–238.
- Takano, M., Sugano, N., Mochizuki, S., Koshi, R.N., Narukawa, T.S., Sawamoto, Y., and Ito, K. (2012). Hepatocytes produce tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* *47*, 89–94.

- Tamai, K., Yamazaki, T., Chino, T., Ishii, M., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Inuma, S., Saga, K., Nimura, K., Shimbo, T., et al. (2011). PDGFR -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 6609–6614.
- Tang, D., Shi, Y., Kang, R., Li, T., Xiao, W., Wang, H., and Xiao, X. (2006). Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 741–747.
- Tang, D., Kang, R., Xiao, W., Zhang, H., Lotze, M.T., Wang, H., and Xiao, X. (2009). Quercetin Prevents LPS-Induced High-Mobility Group Box 1 Release and Proinflammatory Function. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *41*, 651–660.
- Tang, D., Kang, R., Cheh, C.-W., Livesey, K.M., Liang, X., Schapiro, N.E., Benschop, R., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Tracey, K.J., et al. (2010). HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* *29*, 5299–5310.
- Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011a). High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1315–1335.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011b). High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Activates an Autophagic Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2185–2195.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Kroemer, G., Billiar, T.R., Van Houten, B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011c). High-Mobility Group Box 1 Is Essential for Mitochondrial Quality Control. *Cell Metab.* *13*, 701–711.
- Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011d). High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1315–1335.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 836–847.
- Tetteh, H.A., Chen, G., Wyburn, K.R., and al., et (2013). The role of HMGB1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J. Surg. Res.* *183*, 96–97.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., and Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* *62*, 5196–5203.
- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* *8*, 487–496.

- Toborek, M., Wasik, T., Drózd, M., Klin, M., Magner-Wróbel, K., and Kopiczna-Grzebieniak, E. (1992). Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism*. *41*, 1229–1232.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4350–4354.
- Tracey, K.J., and Cerami, A. (1993). Tumor Necrosis Factor, Other Cytokines and Disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 317–343.
- Tsoyi, K., Nizamutdinova, I.T., Jang, H.J., Mun, L., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., and Chang, K.C. (2010). Carbon Monoxide From CORM-2 Reduces HMGB1 Release Through Regulation of IFN- β /JAK2/STAT-1/INOS/NO Signaling But Not COX-2 in TLR-Activated Macrophages. *Shock* *34*, 608–614.
- Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M.P., Lotze, M.T., Yang, H., Li, J., Tracey, K.J., Geller, D.A., et al. (2005). The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* *201*, 1135–1143.
- Tsung, A., Klune, J.R., Zhang, X., Jeyabalan, G., Cao, Z., Peng, X., Stolz, D.B., Geller, D.A., Rosengart, M.R., and Billiar, T.R. (2007). HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4-dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J. Exp. Med.* *204*, 2913–2923.
- Ugrinova, I., Pashev, I.G., and Pasheva, E.A. (2011). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates mammalian HMGB1 protein only if acetylated. *J. Biochem.* *149*, 563–568.
- Ugrinova, I., Zlateva, S., and Pasheva, E. (2012). The effect of PKC phosphorylation on the “architectural” properties of HMGB1 protein. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 9947–9953.
- Ullah, M.A., Loh, Z., Gan, W.J., Zhang, V., Yang, H., Li, J.H., Yamamoto, Y., Schmidt, A.M., Armour, C.L., Hughes, J.M., et al. (2014). Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 440–450.e3.
- Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C.J., Fink, M.P., and Tracey, K.J. (2002a). Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12351–12356.
- Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C.J., Fink, M.P., and Tracey, K.J. (2002b). Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12351–12356.

- Uskoković, A., Dinić, S., Mihailović, M., Grdović, N., Arambašić, J., Vidaković, M., Bogojević, D., Ivanović-Matić, S., Martinović, V., Petrović, M., et al. (2012). STAT3/NF- κ B interactions determine the level of haptoglobin expression in male rats exposed to dietary restriction and/or acute phase stimuli. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 167–176.
- Vaccari, T., Beltrame, M., Ferrari, S., and Bianchi, M.E. (1998). Hmg4, a New Member of the Hmg1/2 Gene Family. *Genomics* *49*, 247–252.
- Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., et al. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* *209*.
- Vezzoli, M., Castellani, P., Corna, G., Castiglioni, A., Bosurgi, L., Monno, A., Brunelli, S., Manfredi, A.A., Rubartelli, A., and Rovere-Querini, P. (2011). High-Mobility Group Box 1 Release and Redox Regulation Accompany Regeneration and Remodeling of Skeletal Muscle. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2161–2174.
- Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., et al. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* *302*, 2323.
- Vind, B.F., Birk, J.B., Vienberg, S.G., Andersen, B., Beck-Nielsen, H., Wojtaszewski, J.F.P., and Højlund, K. (2012). Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* *55*, 1435–1445.
- Vogel, S.N., and Fenton, M. (2003). Toll-like receptor 4 signalling: new perspectives on a complex signal-transduction problem. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 664–668.
- Wang, F., Li, L., Li, J., Wang, J., Wang, L., and Jiang, W. (2013a). High Mobility Group Box-1 Promotes the Proliferation and Migration of Hepatic Stellate Cells via TLR4-Dependent Signal Pathways of PI3K/Akt and JNK. *PLoS One* *8*, e64373.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., et al. (1999). HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* (80-.). 285.
- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Al-Abed, Y., Wang, H., Metz, C., Miller, E.J., et al. (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat. Med.* *10*, 1216–1221.
- Wang, X., Bao, W., Liu, J., OuYang, Y.-Y., Wang, D., Rong, S., Xiao, X., Shan, Z.-L., Zhang, Y., Yao, P., et al. (2013b). Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* *36*, 166–175.

- Wang, Y., van Boxel-Dezaire, A.H.H., Cheon, H., Yang, J., and Stark, G.R. (2013c). STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 16975–16980.
- Wang, H., Yang, H., Czura, C.J., Sama, A.E., and Tracey, K.J. (2001). HMGB1 as a Late Mediator of Lethal Systemic Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 1768–1773.
- Wardyn, J.D., Ponsford, A.H., and Sanderson, C.M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 621–626.
- Waris, G., and Alam, K. (1998). Attenuated antigenicity of ribonucleoproteins modified by reactive oxygen species. *Biochem. Mol. Biol. Int.* *45*, 33–45.
- Watanabe, J., Grijalva, V., Hama, S., Barbour, K., Berger, F.G., Navab, M., Fogelman, A.M., and Reddy, S.T. (2009). Hemoglobin and Its Scavenger Protein Haptoglobin Associate with ApoA-1-containing Particles and Influence the Inflammatory Properties and Function of High Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* *284*, 18292–18301.
- Wei, Y., Chen, P., de Bruyn, M., Zhang, W., Bremer, E., and Helfrich, W. (2010). Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol.* *10*, 42.
- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R.G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* *42*, 801–813.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., and Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.* *161*, 2524–2532.
- Wolf, M., Lossdörfer, S., Abuduwali, N., and Jäger, A. (2013). Potential role of high mobility group box protein 1 and intermittent PTH (1–34) in periodontal tissue repair following orthodontic tooth movement in rats. *Clin. Oral Investig.* *17*, 989–997.
- Wolff, S.P., Jiang, Z.Y., and Hunt, J. V (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic. Biol. Med.* *10*, 339–352.
- Wolfson, R.K., Chiang, E.T., and Garcia, J.G.N. (2011). HMGB1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption. *Microvasc. Res.* *81*, 189–197.

- Wright, E., Scism-Bacon, J.L., Glass, L.C., and Glass, L. (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.* *60*, 308–314.
- Wu, F., Zhao, Z.-H., Ding, S.-T., Wu, H.-H., and Lu, J.-J. (2013). High mobility group box 1 protein is methylated and transported to cytoplasm in clear cell renal cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *14*, 5789–5795.
- Wu, H., Wade, M., Krall, L., Grisham, J., Xiong, Y., and Van Dyke, T. (1996). Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell-cycle progression, postnatal liver development and regeneration. *Genes Dev.* *10*, 245–260.
- Wu, Q., Zhang, W., Pwee, K.-H., and Kumar, P.P. (2003). Cloning and characterization of rice HMGB1 gene. *Gene* *312*, 103–109.
- Xiao, Y., Yan, W., Lu, L., Wang, Y., Lu, W., Cao, Y., and Cai, W. (2015). p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death. *Cell Cycle* *14*, 1548–1558.
- Yamada, Y., Fujii, T., Ishijima, R., Tachibana, H., Yokoue, N., Takasawa, R., and Tanuma, S. (2011). DR396, an apoptotic DNase γ inhibitor, attenuates high mobility group box 1 release from apoptotic cells. *Bioorg. Med. Chem.* *19*, 168–171.
- Yamakura, F., and Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1804*, 318–325.
- Yanai, H., Matsuda, A., An, J., Koshiba, R., Nishio, J., Negishi, H., Ikushima, H., Onoe, T., Ohdan, H., Yoshida, N., et al. (2013). Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20699–20704.
- Yang, X., and Qian, K. (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 452–465.
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., et al. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11942–11947.
- Yang, H., Lundbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., and Antoine, D.J. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol. Med.* *18*, 250–259.

- Yang, H., Antoine, D.J., Andersson, U., and Tracey, K.J. (2013a). The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 865–873.
- Yang, H., Antoine, D.J., Andersson, U., and Tracey, K.J. (2013b). The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 865–873.
- Yang, H., Wang, H., Chavan, S.S., and Andersson, U. (2015a). High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol. Med.* *21 Suppl 1*, S6–S12.
- Yang, H., Wang, H., Ju, Z., Ragab, A.A., Lundbäck, P., Long, W., Valdes-Ferrer, S.I., He, M., Pribis, J.P., Li, J., et al. (2015b). MD-2 is required for disulfide HMGB1–dependent TLR4 signaling. *J. Exp. Med.* *212*, 5–14.
- Yang, H., Wang, H., Wang, Y., Addorisio, M., Li, J., Postiglione, M.J., Chavan, S.S., Al-Abed, Y., Antoine, D.J., Andersson, U., et al. (2017). The haptoglobin beta subunit sequesters HMGB1 toxicity in sterile and infectious inflammation. *J. Intern. Med.* *282*, 76–93.
- Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., et al. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* *4*, 551–556.
- Ying, H., Da, L., Yu-xiu, S., Yu, X., Li-xia, L., Li-mei, X., and Wei-dong, R. (2013). TLR4 Mediates MAPK–STAT3 Axis Activation in Bladder Epithelial Cells. *Inflammation* *36*, 1064–1074.
- Youn, J.H., and Shin, J.-S. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.* *177*, 7889–7897.
- Zachara, N., and Hart, G.W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1673*, 13–28.
- Zeng, S., Dun, H., Ippagunta, N., Rosario, R., Zhang, Q.Y., Lefkowitz, J., Yan, S.F., Schmidt, A.M., and Emond, J.C. (2009). Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J. Hepatol.* *50*, 929–936.
- Zhan, Z., Li, Q., Wu, P., Ye, Y., Tseng, H.-Y., Zhang, L., and Zhang, X.D. (2012). Autophagy-mediated HMGB1 release antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1. *Autophagy* *8*, 109–121.

- Zhang, X., Wheeler, D., Tang, Y., Guo, L., Shapiro, R.A., Ribar, T.J., Means, A.R., Billiar, T.R., Angus, D.C., and Rosengart, M.R. (2008). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IV mediates nucleocytoplasmic shuttling and release of HMGB1 during lipopolysaccharide stimulation of macrophages. *J. Immunol.* *181*, 5015–5023.
- Zhang, X., Guo, L., Collage, R.D., Stripay, J.L., Tsung, A., Lee, J.S., and Rosengart, M.R. (2011). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) I mediates the macrophage inflammatory response to sepsis. *J. Leukoc. Biol.* *90*, 249–261.
- Zhao, X., Song, S., Sun, G., Strong, R., Zhang, J., Grotta, J.C., and Aronowski, J. (2009). Neuroprotective Role of Haptoglobin after Intracerebral Hemorrhage. *J. Neurosci.* *29*, 15819–15827.
- Zhou, J.-R., Zhang, L.-D., Wei, H.-F., Wang, X., Ni, H.-L., Yang, F., Zhang, T., and Jiang, C.-L. (2013). Neuropeptide Y induces secretion of high-mobility group box 1 protein in mouse macrophage via PKC/ERK dependent pathway. *J. Neuroimmunol.* *260*, 55–59.
- Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* *20*, 1–15.
- Zuwała-Jagiello, J., Pazgan-Simon, M., Simon, K., and Warwas, M. (2009). Elevated advanced oxidation protein products levels in patients with liver cirrhosis. *Acta Biochim. Pol.* *56*, 679–685.

Биографија

Софија Јовановић Стојанов рођена је 17.12.1985. год. у Јагодини. Основну школу и Гимназију „Светозар Марковић“ завршила је у Јагодини. Основне студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, смер молекуларна биологија и физиологија, уписала је 2004. год. Дипломски рад, под насловом „Утицај естрадиола на миграторне способности синциотиотрофобласта“, урађен у лабораторији Одсека за ћелијску биологију Института Кири (UMR 144 Centre National de la Recherche Scientifique, Department of Cell Biology, Institut Curie, Paris, France) и у лабораторији Центра за предклиничка тестирања активних супстанци, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, одбранила је 2011. год. са оценом 10, чиме је завршила основне студије са просечном оценом 9,06 и стекла звање Дипломирани молекуларни биолог и физиолог. Исте године уписала је докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, смер молекуларна биологија еукариота. Од 2012. год. запослена је као истраживач приправник, а од 2013. год као истраживач сарадник на Одељењу за молекуларну биологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, у оквиру пројекта „Сигнални молекули у дијабетесу: идентификација потенцијалних биолошких маркера укључених у модификацију и интеграцију сигналних путева у циљу предикције и интервенције у дијабетесу“, потпројекат „Експресија и сигналне улоге протеина HMGB1 у дијабетичној јетри“ (бр. 173020) финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

До данас је објавила 7 радова у часописима међународног значаја и има 3 саопштења на међународним скуповима.

Изјава о ауторству

Потписани-а Софија Јовановић Стојанов

број индекса М3013/2011

Изјављујем

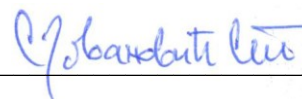
да је докторска дисертација под насловом

**Карактеризација структуре и функције НМGB1 протеина у јетри пацова
током експериментално изазваног дијабетеса типа 1**

- 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, 7.5.2018.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Софија Јовановић Стојанов

Број индекса М3013/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Карактеризација структуре и функције HMGB1 протеина у јетри пацова током експериментално изазваног дијабетеса типа 1

Ментор др Весна Мартиновић и др Гордана Матић

Потписани/а _____

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, 7.5.2018.



Изјава о коришћењу

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

**Карактеризација структуре и функције HMGB1 протеина у јетри пацова
током експериментално изазваног дијабетеса типа 1**

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, 7.5.2018.



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

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

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

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

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

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