



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Душан А. Михајловић

ИМУНОМОДУЛАТОРНА И
АНТИОКСИДАТИВНА СВОЈСТВА
10-ХИДРОКСИ-2-ДЕКАНОИЧНЕ КИСЕЛИНЕ

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015. год.

МЕНТОР:

Академик Миодраг Чолић

Редовни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Миодраг Лукић

Професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

2. Проф. др Иванка Зелен

Ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан

3. Проф. др Драгана Вучевић

Редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

САДРЖАЈ

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА	I
САЖЕТАК	IV
ABSTRACT	VI
УВОД	1
МАТИЧНИ МЛЕЧ	3
НЕУТРОФИЛИ	15
ДЕНДРИТСКЕ ЂЕЛИЈЕ	21
ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	28
ХИПОТЕЗЕ	29
ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	30
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
МЕДИЈУМИ, ПУФЕРИ И РЕАГЕНСИ	32
ИЗОЛАЦИЈА И КУЛТИВАЦИЈА ЂЕЛИЈА	40
ПРОЦЕНА ЂЕЛИЈСКЕ АПОПТОЗЕ И ВИЈАБИЛНОСТИ	42
ФЕНОТИПСКА АНАЛИЗА ЂЕЛИЈА	43
ПРОЦЕНА ФУНКЦИОНАЛНИХ КАРАКТЕРИСТИКА ЂЕЛИЈА	44
ПРОЦЕЊИВАЊЕ СПОСОБНОСТИ „САКУПЉАЊА“ РЕАКТИВНИХ КИСЕОНИЧНИХ ВРСТА	49
СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАКА	51
РЕЗУЛТАТИ	53
УТИЦАЈ 10-NDA НА ФУНКЦИЈУ ХУМАНИХ НЕУТРОФИЛА ПЕРИФЕРНЕ КРВИ	54
АНТИОКСИДАТИВНА СВОЈСТВА 10-NDA	82
ЕФЕКАТ 10-NDA НА ФУНКЦИЈУ ХУМАНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЂЕЛИЈА ПЕРИФЕРНЕ КРВИ	87
ЕФЕКАТ 10-NDA НА ХУМАНЕ ДЕНДРИТСКЕ ЂЕЛИЈЕ МОНОЦИТНОГ ПОРЕКЛА	93
ДИСКУСИЈА	101
АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ 10-NDA	102
ИМУНОМОДУЛАТОРНА АКТИВНОСТ 10-NDA	113
ЗАКЉУЧАК	121

ЛИТЕРАТУРА **123**

ПРИЛОЗИ **150**

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

10-HDA	10-хидрокси-2-деcanoична киселина
2-ME	2-меркаптоетанол
5-ASA	5-аминосалицилна киселина
cDC	мијелоидне или конвенционалне дендритске ћелије
CG	катепсин G
CGD	хронична грануломатозна болест
Con A	конканавалин A
cpm	број откуцаја у минути
DC	дендритске ћелије
DCFH-DA	2',7'-дихлородихидро-флуоресцеин диацетат
DHR	дихидрородамин 123
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
DNKaza	дезоксирибонуклеаза
DPI	дифенилен-јодонијум
DTNB	5,5-дитио-бис (2-нитробензоева киселина)
FCS	фетални телећи серум
FITC	флуоресцеин изотиоцијанат
fMLP	N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин
G-CSF	фактор стимулације колонија гранулоцита
GM-CSF	фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага
GSH	глутатион
H ₂ O ₂	водоник-пероксид
HBSS	Хенксов пуферисани физиолошки раствор
HO•	хидроксилни радикал
HOCl	хипохлорна киселина
HUVEC	хумане ендотелне ћелије умбиликалне вене
IFN- γ	интерферон γ
Ig	имуноглобулин
IKK α	IkB киназа алфа
IL	интерлеукин

IRF-8	регулаторни фактор интерферона 8
KPE	калијум-фосфатни пуфер са EDTA
LPS	липополисахарид
MFI	средња вредност интензитета флуоресценце
MLR	реакција мешаних леукоцита
MoDC	дендритске ћелије моноцитног порекла
MPO	мијелопероксидаза
MRJP	главни протеин матичног млеча
NADH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид
NADPH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NBT	p-нитроблутетразолиум хлорид
NE	неутрофилна еластаза
NET	неутрофилне екстраћелијске замке
NF-κB	нуклеарни фактор κB
opZy	опсонизовани зимозан
OVA	овалбумин
PBMNC	мононуклеарне ћелије периферне крви
PBS	пуферисани физиолошки раствор
pDC	лимфоидне или плазмацитоидне дендритске ћелије
PE	фикоеритрин
PG	простагландин
PHA	фитохемаглутинин
PI	пропидијум јодид
PI3K	фосфатидилинозитол 3-киназа
PMA	форбол-12-миристан-13-ацетат
PMS	феназин метосулфат
PR3	протеиназа 3
rpm	број обртаја у минути
SD	стандардна девијација
SDS	натријум-додецил-сулфат
SLE	системски еритемски лупус
SOD	супероксид дигмутаза
TCR	T ћелијски рецептор

TGF- β	фактор трансформације раста β
Th	T „helper” лимфоцити
TLR	рецептори слични Toll-у
TNF- α	фактор некрозе тумора
VEGF	фактор раста васкуларног ендотела
O ₂ ^{•-}	супероксид анјон радикал
Treg	регулаторни T лимфоцити

САЖЕТАК

10-хидрокси-2-деканоична киселина (10-HDA) је јединствена и најзаступљенија незасићена масна киселина матичног млека. Иако први научни радови о овој масној киселини датирају још од педесетих година прошлог века, досадашња истраживања, углавном на *in vitro* анималним моделима, су показала њено анти-инфламаторно својство. Међутим, веома мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози. Стога смо ми у овој студији испитивали ефекат 10-HDA на функције хуманих ћелија имунског система *in vitro*, као и њено потенцијално антиоксидативно својство.

Добијени резултати су показали да је 10-HDA у милимоларним концентрацијама (1mM и 2mM) инхибирала оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA), N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланином (fMLP) или опсонизованим зимозаном (opZy) у култури. Осим тога, ова масна киселина је у истим концентрацијама инхибирала како спонтану, тако и PMA, fMLP и opZy индуковану апоптозу, али и интензитет PMA узроковане NEToze (енгл. Neutrophil Extracellular Traps) хуманих неутрофила.

У културама хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMNC) стимулираним фитохемаглутинином (PHA) 10-HDA је у концентрацији од 500 μ M испољила претежно супресивни ефекат на пролиферацију PBMNC. Овај процес је био праћен смањеном продукцијом интерлеукина (IL)-2. У истој концентрацији, 10-HDA је инхибирала секрецију IL-1 β и фактора некрозе тумора (TNF)- α . Анализирајући цитокински Т „helper“ (Th) профил у овим културама показано је да је 10-HDA, у концентрацији од 500 μ M, инхибирала Th1 и Th2 поларизацију имунског одговора, а није значајније модулисала Th17 имунски одговор.

Такође, у овој студији је испитиван утицај 10-HDA на матурацију и функцију хуманих дендритских ћелија моноцитног порекла (MoDC). 10-HDA је, у концентрацији од 500 μ M, инхибирала матурацију MoDC стимулираних липополисахаридом (LPS). Овако стимулисане MoDC су продуковале мање количине IL-12, IL-18 и TNF- α , и инхибирале Th1 и Th2 поларизацију имунског одговора, што је закључено на основу смањења концентрације интерферона (IFN)- γ

и IL-4 у супернатантима ко-култура 10-HDA-третираних MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита периферне крви. Насупрот овим резултатима, 10-HDA је, у ниској концентрацији (50 μ M), стимулисала Th1, а инхибирала Th2 имунски одговор.

Испитујући антиоксидативно својство 10-HDA, на експерименталним моделима без ћелија, у којима се реактивне кисеоничне врсте продукују чисто хемијским путем, показано је да ова масна киселина, у милимоларним концентрацијама (1mM-4mM), има способност да „сакупља“, односно реагује са супероксид анјон радикалом и хипохлорном киселином и тако смањује њихово реактивно деловање.

На основу добијених резултата може се закључити да 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на одговор хуманих имунских ћелија *in vitro*, при чему у високим концентрацијама (0,5mM-2mM) делује инхибиторно, а у ниским концентрацијама (50 μ M) благо стимулаторно. Такође, показано је да 10-HDA у милимоларним концентрацијама (1mM-4mM) испољава директно антиоксидативно својство.

Кључне речи: 10-хидрокси-2-деканонична киселина, неутрофили, мононуклеарне ћелије периферне крви, дендритске ћелије моноцитног порекла, имуномодулаторна активност, антиоксидативна активност

ABSTRACT

10-hydroxy-2-decanoic acid (10-HDA) is unique and the most common fatty acid of royal jelly. Although the first scientific papers about this fatty acid originate from fifties of the last century, very little is known about its immunomodulatory and antioxidative activity. Therefore, we examined the effects of 10-HDA on the function of human immune cells *in vitro*, as well as its potential antioxidative properties.

The obtained results showed that 10-HDA at millimolar concentrations (1mM and 2mM) inhibited oxidative burst of human peripheral blood neutrophils stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) or opsonized zymosan (opZy) and neutrophil extracellular traps formation induced by PMA. In addition, 10-HDA at the same concentrations inhibited spontaneous apoptosis, as well as PMA-, fMLP- and opZy-induced apoptosis of neutrophils.

10-HDA, at concentration of 500 μ M, inhibited the proliferation of phytohaemagglutinin-activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs), and the process was followed by a decrease in the production of interleukin 2 (IL-2). At the same concentration, 10-HDA inhibited the production of IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by stimulated PBMNCs. Regarding T helper (Th) cytokine profile, higher concentration of 10-HDA (500 μ M), in contrast to the lower one (50 μ M), inhibited both Th1 and Th2 responses, whereas the Th17 response was not significantly modulated, as judged by the levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-5 and IL-17A in culture supernatants, respectively.

The effect of 10-HDA on maturation and functions of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) was also investigated. A lower dose (50 μ M) stimulated T helper (Th)1 and down-regulated Th2 immune responses, as judged by the levels of IFN- γ and IL-4, respectively, in supernatants of 10-HDA-treated MoDCs cultivated with allogeneic CD4⁺ T cells. In contrast, a higher dose of 10-HDA (500 μ M) inhibited maturation of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated MoDCs. Such treated MoDCs produced lower levels of IL-12, IL-18 and TNF- α and down-regulated both Th1 and Th2 immune responses.

Examining the antioxidant properties by using cell-free systems, we demonstrated that 10-HDA at millimolar concentrations is a scavenger of superoxide anion radical and HOCl.

In conclusion, our results suggest that 10-HDA exerts different activity on human immune cells, depending on applied concentrations, which is important when considering its therapeutic immunomodulatory property. In addition, it was shown that 10-HDA, at millimolar concentrations, exerts direct antioxidant properties.

Key words: 10-hydroxy-2-decenoic acid, neutrophils, peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived dendritic cells, immunomodulatory activities, antioxidant properties

Увод

Сведоци смо изразитог пораста броја истраживача и научних часописа који се баве проучавањем хране и начина њеног утицаја на одржавање здравља људи и лечење болести. Стога је досадашњи класични концепт „адекватне исхране“ (исхрана која задовољава енергетске потребе организма) замењен новим концептом „оптималне исхране“ који подразумева, поред адекватне исхране и коришћење хране која делује благотворно на здравље и смањује ризик од развоја болести. Таква храна се назива „функционална храна“ (енгл. *functional foods*) (Nagai и сар., 2006, Viuda-Martos и сар., 2008)

Концепт „функционалне хране“ је први пут уведен у Јапану средином 1980-их, а односи се на храну која делује благотворно на здравље и смањује ризик од болести, док се сам термин "функционална храна" први пут појавио у раду Swinbanks и O'brien (1993). Међутим, сазнања о постојању везе између хране и болести нису нова, већ потичу из старих времена када је у древним ведским текстовима из Индије и традиционалне кинеске медицине наведено оријентално филозофско схватање да "лек и храна имају заједничко порекло" (Henry, 2010, Serafini и сар., 2012).

Термин „функционална храна“ је у суштини маркетиншки и на глобалном нивоу није регулисан законом (осим у појединим земљама као што је Јапан), па и дефинисање самог појма није усаглашено у свету. Међу различитим дефиницијама, може се издвојити она коју је дао европски део Интернационалног института природних наука (енгл. *International Life Science Institute – ILSI, Europe*), а која дефинише „функционалну храну“ као „прехрамбени производ који заједно са основним хранљивим особинама има благотворно дејство на једну или више функција људског организма, доприносећи било побољшању општег и физичког стања и/или смањењу ризика од развоја болести“ (1999, Henry, 2010, Ballali и Lanciari, 2012).

„Функционална храна“, са својим специфичним здравственим ефектима, представља нови начин размишљања о односима између хране и здравља у свакодневном животу (Ballali и Lanciari, 2012). Она може бити: 1) природна храна; 2) храна којој је нека компонента додата како би постала „функционална“, на пример омега-3 масне киселине, витамини, пробиотици, влакна, биоактивни пептиди и

фитостероли; 3) храна из које је нека компонента уклоњена, на пример масти; 4) храна где је једна или више компоненти модификовано или 5) било која од ових комбинација (Henry, 2010).

Матични млеч је храна, која неоспорно поседује елементе функционалности што је документовано у бројним научним часописима и део је вишевековне традиционалне медицине.

Матични млеч

Матични млеч је вискозна, желатиозна супстанца млечно-беле боје коју пчеле радилице (лат. *Apis mellifera*) продукују у хипофарингеалним и мандибуларним жлездама и користе за храњење матице и њених ларви. Матица се храни матичним млечом током целог живота, док пчеле радилице користе матични млеч само прва три дана у току периода ларве. С обзиром да не постоји генетска разлика између матице и пчела радилица, матични млеч је главни фактор који узрокује диференцијацију ларве у матицу, а не у пчелу радилицу (Kucharski и сар., 2008, Bogdanov, 2011, Pavel и сар., 2011, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012, Orsolic, 2013). Kamakura (2011) је јасно показао да диференцијацију ларви пчела у матицу узрокује протеин ројалактин (молекулске масе 57 kDa), присутан у матичном млечу. Ројалактин повећава величину тела и подстиче развој јајника код пчела механизмима који укључују повећану активност MAP киназа (енгл. *mitogen-activated protein kinase*).

Хемијске особине матичног млеча

Матични млеч је делимично растворљив у води густине 1,1g/ml и киселе рН вредности (рН 3,4-4,5). Хемијски састав матичног млеча је веома сложен (Табела 1) и однос супстанци које улазе у његов састав умногоме зависи од регионалних и сезонских услова. Свеж матични млеч чине вода (60-70%), протеини (10-18%), угљени хидрати (9-15%), липиди (3-8%), соли К, Р, S, Na, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn (0,7-1,5%) и мале количине витамина као што су рибофлавин, тиамин, ниацин, пиридоксин, фолна киселина, пантотенска киселина и витамин С (Bogdanov, 2011, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012, Orsolic, 2013). Поред тога у матичном млечу су

пронађени неки ензими (каталаза, амилаза, инвертаза, кисела фосфатаза), неуротрансмитери (ацетилхолин, холин) и полни хормони (естрадиол, тестостерон, прогестерон) (Orsolic, 2013). Лиофилизовани матични млеч садржи мање од 5% воде, 27-41% протеина, 22-31% угљених хидрата и 15-30% масти (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

Табела 1. Хемијски састав матичног млеча

Вода	60-70%
Протеини	10-18%
Угљени хидрати	9-15%
фруктоза	3-13%
глукоза	4-8%
сахароза	0,5-2%
Липиди	3-8%
10-хидрокси-2-деcanoична киселина	>1.4%
Витамини	mg/100g
ниацин	4,5-19
пиридоксин	0,2-5,5
тиамин	0,1-1,7
рибофлавин	0,5-2,5
пантотенска киселина	3,6-23
фолна киселина	0,01-0,06
биотин	0,15-0,55
Минерали	mg/100g
калијум	200-1000
калцијум	25-85
магнезијум	20-100
цинк	0,7-8
гвожђе	1-11
бакар	0,33-1,6
pH	3.4-4.5

Модификовано према Bogdanov (2011)

Протеини представљају једну од најзначајнијих компоненти матичног млеча (Schmitzova и сар., 1998). Више од 80% протеина матичног млеча су солубилни протеини (Rosmilah и сар., 2008, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012). Протеин матичног млеча који је први откривен, уједно и најзаступљенији, назван је главни протеин матичног млеча 1 (енгл. *major royal jelly protein 1* - MRJP1). Ова терминологија се

примењивала за сваки новооткривени протеин матичног млека, тако да је до сада идентификовано девет протеина (MRJP1-9) (Scarselli и сар., 2005, Buttstedt и сар., 2014). Поред ових “главних“ протеина, у матичном млеку су откривени бројни други протеини (укупно 37) који углавном имају улогу у транспорту липида и у метаболизму угљених хидрата, као што су глукозо-оксидаза, глукозо-дехидрогеназа, прекурсор α -глукозидазе итд. (Han и сар., 2011). MRJP1-5 чине око 90% протеина матичног млека и имају углавном нутритивну улогу. Приликом синтезе ови протеини подлежу различитим посттранслационим модификацијама (фосфорилација, метилација, гликозилација) што им одређује функцију. Због тога, постоје различите изоформе протеина који се разликују по молекулској маси, што је довело до тога да исти протеин има већи број назива у литератури (Табела 2). MRJP1 је најзаступљенији (око 48% укупних растворљивих протеина матичног млека), слабо кисели гликопротеин који ствара олигомере од 350 kDa или 420 kDa, док су MRJP 2, 3, 4 и 5 гликопротеини од 49 kDa, 60 kDa до 70 kDa, 60 kDa и 80 kDa (Okamoto и сар., 2003, Albert и Kludiny, 2004, Bogdanov, 2011, Pavel и сар., 2011, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012, Orsolich, 2013, Buttstedt и сар., 2014).

У липидној фракцији матичног млека највећи удео имају масне киселине, углавном у слободној форми, а ређе у облику естера (Li и сар., 2013). Масне киселине матичног млека се могу класификовати према молекулској структури на шест поткласа: 1) праволанчане масне киселине, као што је валеријанска; 2) незасићене масне киселине, као што је 2- деканоична киселина; 3) хидрокси масне киселине, као што је 10-хидрокси-2-деканоична киселина; 4) оксо-масне киселине, као што је 11-оксо додеканоична киселина; 5) дикарбоксилне масне киселине, као што је октан(-1,8-)-диоична киселина; 6) масне киселина са метил гранањем, као што је 2-метилбутанска киселина (Li и сар., 2013). До сада је детектовано око 94 слободних масних киселина у матичном млеку, а најзаступљенија је 10-хидрокси-2-деканоична киселина (10-HDA) са уделом од око 70% у укупној липидној фракцији матичног млека (Antinelli и сар., 2003, Li и сар., 2013). Поред 10-HDA, још шест масних киселина су у већем проценту заступљене и то: 8-хидрокси октаноична киселина (~4.9% од липидног екстракта матичног млека), 3-хидроксидеканоична киселина (1.2%), 3,10-дихидроксидеканоична киселина (5.9%), 9-хидрокси-2-деканоична (1.7%), 1,10-декандиоична киселина (3.3%), и 2-децен(-1,10-)диоична

киселина (4.1%). Већина масних киселина у матичном млечу су средње-ланчане масне киселине, које могу имати хидроксилну групу на крају или у средини ланца, могу да буду са моно- или дикарбоксилном групом и засићене или мононезасићене у позицији 2 (Li и сар., 2013).

Табела 2. Различита имена главних протеина матичног млеча

MRJP1	56 kDa протеин
	57 kDa протеин
	Апалбумин 1
	D III протеин
	p56kP-4
	RJP-1
	RJP-3
	RJPX
	Ројалактин
MRJP2	50 kDa протеин
	55 kDa глико-протеин матичног млеча (RJGP)
	Апалбумин 2
MRJP3	64 kDa протеин
	Апалбумин 3
	RJP-1
	RJP57-1
MRJP4	RJP-2
	RJP57-2

Модификовано према Buttstedt и сар. (2014)

Поред слободних масних киселина из матичног млеча је изоловано и једанаест естара масних киселина и то: два циклична естра, D-окталактон и D-декалактон; један естар фосфорне киселина, 10-HDA фосфат; два глукозидна естра; и шест хетеродимера и хетерополимера (Li и сар., 2013).

Матични млеч садржи и мале количине стерола. Укупно је у матичном млечу детектовано 22 слободна и естерификована стерола. Стероли из матичног млеча могу се класификовати у три поткласе: (1) холестерол и деривати; (2) холестерил естри као што је 24-метилен холестерол; (3) фитостероли и деривати, као што је изофукастерол (Li и сар., 2013).

Угљени хидрати чине око 30% суве материје матичног млеча. Као и у меду, моносахариди, фруктоза и глукоза су главни шећери и у зависности од старости и пчелиње хране заједно чине 90 % укупних шећера. Сахароза је увек присутна, али често у веома променљивим концентрацијама (Lercker и сар., 1986). Такође, могуће је присуство олигосахарида као што су трехалоза, малтоза, гентибиоза, изомалтоза, рафиноза, ерлоса и мелезитоза (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

Имуномодулаторни ефекти матичног млеча и његових компоненти

Имуномодулаторни ефекти матичног млеча су показани у бројним студијама, како у *in vitro* системима на хуманим и анималним ћелијским линијама, тако и *in vivo*, на животињама. Liu и сар. (1984) су показали да матични млеч појачава ћелијски имунски одговор код озрачених мишева. Сличан имуностимулаторни ефекат је показан и на мишевима имунизованим овчијим еритроцитима (Sveg и сар., 1996). Матични млеч је стимулисао продукцију антитела и пролиферацију имунокомпетентних ћелија код имунизованих мишева. Међутим, ови аутори су показали и имуносупресиван ефекат матичног млеча на продукцију антитела од стране Т-зависних В лимфоцита. Kohno и сар. (2004) су проучавајући утицај матичног млеча на мишје макрофаге стимулисане липополисахаридом (LPS) и интерфероном (IFN)- γ закључили да матични млеч инхибира продукцију проинфламаторних цитокина (фактор некрозе тумора (TNF)- α , интерлеукин (IL)-6 и IL-1) не утичући на вијабилност ових ћелија. Други аутори су, такође, показали да матични млеч не утиче на продукцију IL-10, главног цитокина са супресорским деловањем (Sabat и сар., 2010). Гашић и сар. (2007) су испитивали имуномодулаторни ефекат различитих компоненти матичног млеча користећи *in vitro* модел конканавалином А (Con A) индуковане пролиферације пацовских Т лимфоцита. Ови аутори су показали да водени екстракт матичног млеча у ниским концентрацијама од 5 μ g/ml - 25 μ g/ml стимулише пролиферацију Т лимфоцита

слезине. Ова стимулација је корелирала са повећаном продукцијом IL-2, једног од најважнијих фактора раста Т лимфоцита (Boyman и Sprent, 2012). Насупрот овим резултатима, веће концентрације воденог екстракта матичног млеча (75µg/ml и 100µg/ml) су инхибирале пролиферацију Т лимфоцита индуковану Con A. Овај инхибиторни ефекат је био праћен смањењем секреције IL-2, као и смањењем продукције азот оксида.

Да би сагледали ефекте матичног млеча на аутоимуност, Manooch и сар. (2009) су испитивали његов утицај на (NZB x NZV)F1 мишевима, који спонтано развијају многе манифестације болести које се појављују код особа са системским еритемским лупусом (SLE). Орална примена матичног млеча код ових мишева одложила је појаву болести, што је закључено на основу степена оштећења бубрега, али и значајно продужила њихов животни век. Такође, код ових мишева детектована је смањена концентрација IL-10 у серуму, смањен број аутореактивних В лимфоцита у слезини као и нижа концентрација аутоантитела усмерених на једноланчану и дволанчану дезоксирибонуклеинску киселину (DNK). Ови резултати указују да матични млеч може бити од користи за особе у ризику за развој SLE, као и за пацијенте у раним фазама болести. Karaca и сар. (2010) су показали, користећи експериментални модел за акутни улцерозни колитис где се запаљење изазива сирћетном киселином, да матични млеч може да спречи настанак колитиса код пацова. У овој студији, орално давање матичног млеча је смањило број мастоцита и површину ерозије колона. Поред анималних *in vivo* модела, анти-инфламаторни ефекти матичног млеча су показани и *in vitro*, на ћелијама као што је ћелијска линија периодонталног лигаментa (MPDL22 ћелије) (Yanagita и сар., 2011). Матични млеч је инхибирао продукцију IL-6 и хемокинског лиганда CXCL10 од стране MPDL22 стимулираних LPS порекла *Porphiromonas gingivalis*. У истој студији је показано да матични млеч смањује експресију CD54 молекула на овим ћелијама. Ефекти матичног млеча на аутоимуност у Грејвсовој (енгл. *Graves*) болести, орган специфичној аутоимунској болести, испитивани су на лимфоцитима периферне крви шест пацијената са Грејвсовом болешћу (Erem и сар., 2006). Матични млеч је узроковао повећање концентрације IFN-γ и смањење концентрације TNF-α у супернатантима ћелијских култура лимфоцита. Такође, наглашено је да је матични

млеч смањио продукцију антитела усмерених на рецептор за тиростимулишући хормон у овим супернатантима.

Дејство матичног млеча је до сада испитивано на неколико модела тумора као што су Ерлихов тумор, леукемија АКР мишева, 6С₃НЕД лимфосарком, сарком 180, ТА₃ карцином дојке, L1210 и Р388 лимфатичне леукемије (Tamura и сар., 1987, Orsolic и сар., 2003, Oršolić и сар., 2005, Nakaya и сар., 2007, Orsolic и сар., 2007). Grad и сар. (1961) су показали да свакодневно парентерално давање 0,1 ml матичног млеча значајно смањује животни век мишева са Ерлиховим тумором или са трансплантираном лимфном леукемијом из АКР мишева. Насупрот томе, иста доза убризгавана једном недељно је значајно продужавала живот леукемичних АКР мишева. Истраживања која су спровели Оршолић и сар. (2003, 2005, 2007) су показала да матични млеч није утицао на формирање метастаза карцинома дојке и фибросаркома индукованог метилхолантrenom код СВА мишева, када се даје интраперитонеално или субкутано. Међутим, истовремено интравенско давање матичног млеча и туморских ћелија је инхибирало формирање метастаза. Такође, матични млеч је ефикасно инхибрирао раст два мишја тумора: Ерлиховог солидног тумора и саркома 180 (Tamura и сар., 1987), као и стимулаторни ефекат бисфенола А на раст MCF-7 ћелија (ћелијска линија хуманог карцинома дојке) (Nakaya и сар., 2007).

Најчешћи нежељени ефекти при конзумирању матичног млеча су алергијске реакције (Pavel и сар., 2011). Срећом, тешке алергијске реакције на матични млеч су ретке. До сада је објављено само око 20 случајева у свету (Katayama и сар., 2008). Након оралне примене матичног млеча, алергијске реакције могу да варирају од мањих поремећаја (лакше гастроинтестиналне тегобе, уртикарија) до тешких реакција, укључујући акутни астматични напад, анафилактички шок (Leung и сар., 1995, Peacock и сар., 1995, Thien и сар., 1996, Leung и сар., 1997, Lombardi и сар., 1998, Takahama и Shimazu, 2006, Katayama и сар., 2008), интестинално крварење па и смрт (Bullock и сар., 1994). Висока преваленца позитивних кожных тестова на матични млеч је присутна међу особама које су атопијске конституције (Leung и сар., 1997). Истражујући главне алергене матичног млеча, користећи серуме преосетљивих пацијената, Rosmilah и сар. (2008) су показали да су главни

имуноглобулин (Ig) Е везујући протеини млека MRJP1 и MRJP2. Такође, они су показали да су испитаници са клиничком сликом алергије на матични млећ имали у серуму IgE антитела на 15 протеина матичног млека.

Упркос томе што може код предиспонираних особа да изазове алергијске реакције, показано је да матични млећ испољава антиалергијски ефекат на животињским моделима алергијских болести (Ока и сар., 2001, Taniguchi и сар., 2003). Ока и сар. (2001) су проучавали антиалергијски ефекат оралне примене матичног млека на DNP-KLH имунизованим мишевима (Dinitrophenol-Keyhole Limpet Hemocyanin). Матични млећ је смањивао продукцију антиген-специфичних IgE и инхибирао ослобађање хистамина из мастоцита, што је довело да изостанка реакција I типа преосетљивости на кожи ува третираних животиња. Осим тога, ова студија је показала да је матични млећ усмерио имунски одговор са Т “helper” (Th) 2 на Th1. Наиме, у CD4⁺ Т лимфоцитима добијеним из DNP-KLH мишева детектована је повећана продукција IFN- γ и смањена продукција IL-4. Поред тога, матични млећ је смањивао експресију информационе рибонуклеинске киселине (iRNK) за IL-12p40 и инхибирао продукцију простагландина (PG) E2 у макрофагима DNP-KLH мишева. Орална примена матичног млека код NC/Nga мишева третираних пикрил хлоридом је спречила развој кожних лезија сличних атопијском дерматитису и инхибирала TNP-специфичну продукцију IFN- γ од стране спленоцита (Taniguchi и сар., 2003). Интраперитонеална апликација матичног млека је смањила продукцију овалбумин (OVA) специфичних IgG1 и IgE антитела и инхибирала продукцију IL-4, IL-5, IL-10 и IFN- γ од стране OVA стимулираних спленоцита изолованих из OVA/Alum-имунизованих BALB/c мишева (Kataoka и сар., 2001).

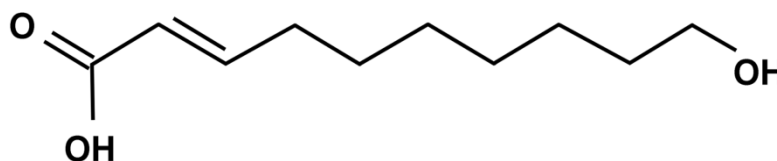
Имуномодулаторно дејство протеина матичног млека, као најзаступљеније компоненте матичног млека је изучавано у бројним студијама. Неке од њих, у којима су коришћени укупни протеини матичног млека, су показале њихов стимулаторни ефекат на пролиферацију ћелија јетре пацова и ћелија хумане мијелоидне ћелијске линије (U-937) (Watanabe и сар., 1996, Watanabe и сар., 1998, Kamakura и сар., 2001, Kamakura, 2002). У другим студијама су испитивани ефекти појединачних протеина матичног млека. Показано је да MRJP1 и MRJP2 стимулишу продукцију TNF- α од стране мишићних перитонеалних макрофага (Simuth и сар., 2004,

Мајтан и сар., 2006). Такође, MRJP1 повећава експресију iRNK за TNF- α у хуманим кератиноцитима (Мајтан и сар., 2010). Насупрот овим имуностимулаторним ефектима MRJP1 и MRJP2, Kohno и сар. (2004) су показали да MRJP3 супримира продукцију TNF- α од стране мишјих перитонеалних макрофага стимулираних LPS и IFN- γ . Исти аутори су показали и анти-алергијски ефекат овог протеина *in vitro* и *in vivo* (Okamoto и сар., 2003). *In vitro* експерименти су показали да MRJP3 инхибира продукцију IL-2, IL-4 и IFN- γ од стране Т лимфоцита слезине OVA/alum-имунизованих мишева стимулираних анти-CD3 антителом. Смањена продукција цитокина је била праћена и инхибицијом пролиферације ових ћелија. *In vivo* је показано да интраперитонеално давање MRJP3 OVA/alum имунизованим мишевима смањује концентрацију анти-OVA алерген специфичних IgE и IgG1 антитела у серуму и повећава концентрацију анти-MRJP3 IgG1 антитела. Такође, третирање овог протеина повишеном температуром смањује његову антигеност, али задржава његову способност да инхибира продукцију OVA специфичних антитела. Може се рећи да је MRJP3 доминантан имуномодулаторни протеин матичног млека са имуносупресивним и антиинфламаторним ефектима.

Поред имуномодулаторне, у неколико студија је описана и антиоксидативна активност матичног млека. Матични млек утиче на апоптозу и степен оксидативног стреса у ћелијама јетре и бубрага пацова третираних хемотерапеутиком цисплатином (Karadeniz и сар., 2011). Профилактичко давање матичног млека значајно смањује количину малондиалдехида у ћелијама јетре и бубрага третираних пацова. Позитивни ефекат матичног млека на антиоксидативни заштиту видљив је и у повећању количине глутатиона, као и већој активности глутатион пероксидазе, глутатион-S-трансферазе и супероксид дизмутазе (SOD) у јетри и бубрезима ових животиња (Karadeniz и сар., 2011). Орално давање матичног млека, смањује токсичност угљентетрахлорида код Sprague-Dawley пацова тако што редукује липидну пероксидацију у ткивима и крви, снижава повећане активности ензима јетре у серуму и појачава ендогени антиоксидативни капацитет (Семек и сар., 2010). Осим тога, матични млек спречава штетно дејство парацетамола и кадмијума на ћелије јетре мишева инхибирајући липидну пероксидацију и деплецију глутатиона, као и пермеабилност ћелијске мембране и мутагеност кадмијума (Çavuşoğlu и сар., 2009, Kanbur и сар., 2009, Семек и сар., 2010).

Биолошка активност 10-HDA

10-HDA је мононезасићена, хидроксилна, средњеланчана масна киселина са уделом од око 70% у укупној липидној фракцији матичног млеча (Li i sar) (слика 1). Ова масна киселина је у природи присутна само у матичном млечу; нема је чак ни у другим пчелињим производима (Melliou и Chinou, 2014). Због своје јединствености 10-HDA је проучавана кроз велики број студија које су показале њене различите биолошке функције.



Слика 1. Хемијска структура 10-HDA

Естрогена активност. Матични млеч се традиционално користи за побољшање постменопаузалних симптома (Cherniack, 2010). Наиме, клиничке студије су потврдиле корисне ефекте матичног млеча на хормонски дисбаланс код жена у менопаузи [47 , 48]. Mishima и сар. (2005) су показали да матични млеч испољава естрогену активност *in vitro* и *in vivo* тако што стимулише пролиферацију естроген-сензитивних MCF-7 ћелија (хумана ћелијска линија тумора дојке). Аутори су такође установили да поједине компоненте матичног млеча могу да се вежу за рецепторе за естроген и показали су да је 10-HDA кључна компонента матичног млеча која испољава естрогену активност. Suzuki и сар. (2008) су показали да естрогену активност у матичном млечу, поред 10-HDA, испољавају и 10-хидрокси деканоична киселина и 24-метиленхолестерол. Ове липидне компоненте активирају транскрипцију гена, зависну од фактора који се активирају под дејством естрогена, и стимулишу пролиферацију MCF-7 ћелија, зависну од рецептора за естроген. Такође, они су показали да субкутана апликација ових липидних компоненти матичног млеча изазива благу хипертрофију луминалног епитела утеруса код полно незрелих женки пацова. Агонистички и антагонистички ефекти масних киселина из матичног млеча на α и β естрогене рецепторе су проучавани *in vitro* користећи ћелијске линије које испољавају ове рецепторе (Moutsatsou и сар., 2010). Показано је да 10-HDA и

3,10-дихидроксидеканоична киселина испољавају слабу агонистичку активност према естрогеном рецептору β (али не и за α) у MCF-7 ћелијама. Насупрот томе, ове масне киселине имају агонистички ефекат на естрогени рецептор α (не и на β) у HeLa ћелијама. Међутим, у присуству 17 β -естрадиола оне испољавају антагонистички ефекат на дејство овог хормона који је посредован механизмом компетитивне инхибиције. Аутори су ову инхибицију објаснили тиме што 10-HDA (али не и друге масне киселине) има способност везивања за лиганд-везујуће домене на α и β естрогенским рецепторима чиме онемогућава везивање 17 β -естрадиола.

Анти-туморска активност. Townsend и сар. (1959, 1960) су показали да 10-HDA инхибира раст различитих туморских ћелија (AKR леукемије и три различите мишје ћелијске туморске линије) *in vitro*. Други аутори су испитивали ефекат ове масне киселине на ангиогенезу (Izuta и сар., 2009). Показали су да 10-HDA испољава инхибиторни ефекат на пролиферацију и миграцију хуманих ендотелних ћелија умбиликалне вене (HUVEC) стимулираних фактором раста васкуларног ендотела (VEGF). С обзиром да је ангиогенеза један од кључних процеса у расту тумора, овај анти-ангиогени ефекат 10-HDA се може схватити као индиректна анти-туморска активност.

Подстицај продукције колагена. Коуа-Мiyата и сар. (2002) су показали да матични млеч стимулише фибробласте да продукују колаген. Касније су утврдили да је за овај ефекат матичног млеча одговорна његова солубилна фракција у којој је једина активна компонента 10-HDA (Коуа-Мiyата и сар., 2004). Показано је да ова масна киселина индукује продукцију фактора трансформације раста (TGF)- β , познатог стимулатора синтезе колагена (Narayanan и сар., 1989). Важност овог цитокина за повећану продукцију колагена под дејством 10-HDA потврђена је коришћењем анти-TGF- β антитела која су у потпуности инхибирала синтезу колагена стимулисану овом масном киселином.

Епигенетска регулаторна активност. Spannhoff и сар. (2011) су испитивали да ли матични млеч испољава епигенетску регулаторну активност. Они су користили K-ras трансформисане NIH 3T3 ћелије у којима активирани Ras пут епигенетски смањује експресију про-апоптотског Fas гена (Peli и сар., 1999). Показали су да у овим ћелијама после третмана матичним млечом настаје

реактивација Fas гена. Такође су идентификовали 10-HDA као компоненту одговорну за овај ефекат матичног млеча и потврдили да испољава активност инхибитора хистон деацетилазе (енгл. *histone deacetylase inhibitor* – HDACi).

Модулација активности јонских канала. Terada и сар. (2011) су проучавали ефекат матичног млеча на активност TRPA1 (енгл. *transient receptor potential ankyrin*), неселективног катјонског канала. Они су показали да одређене врсте екстракта лиофилизованог матичног млеча повећавају пермеабилност калцијума у НЕК293 које експримирају TRPA1. Ови аутори су такође показали да је 10-HDA главна компонента која има способност активације овог јонског канала.

Неурогена активност. *In vitro* експерименти су показали да 10-HDA стимулише неурогенезу, а инхибира глиогенезу неуралних матичних/прогениторских ћелија. Насупрот томе, матични млеч подстиче диференцијацију у више врста можданих ћелија (неурона, астроцита и олигодендроцита) (Hattori и сар., 2007). Механизам којим 10-HDA регулише диференцијацију неуралних матичних/прогениторских ћелија је непознат, али се сматра да ова масна киселина слично делује као BDNF (енгл. *brain-derived neurotrophic factor*). Ito и сар. (2012) су, на мишјем моделу, показали да интраперитонеална апликација 10-HDA смањује ниво анксиозности и депресије индуковане стресом.

Имуномодулаторна улога. Досадашња истраживања углавном на *in vitro* анималним моделима су показала анти-инфламаторно својство 10-HDA. Две скорије студије на мишјој макрофагној ћелијској линији (RAW264) су потврдиле да 10-HDA инхибира продукцију азот оксида, као и IL-6 и TNF- α (Sugiyama и сар., 2012b, Takahashi и сар., 2012). Поред тога, Yang и сар. (2010) су показали да 10-HDA супримира продукцију матриксних металопротеиназа 1 и 3 фибробласта, изолованих од пацијената са реуматоидним артритисом. Истраживања спроведена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије на ћелијама пацова су показала да водени екстракт матичног млеча и 10-HDA имају имуномодулаторна својства (Gasic и сар., 2007, Vucevic и сар., 2007). Поред тога, литературни подаци о антиоксидативном деловању 10-HDA су веома оскудни. Наиме, постоји само једна *in vitro* студија у којој је приказано да претретман

хуманих дермалних фибробласта овом масном киселином смањује степен оксидативног стреса индукованог ултравиолетним А зрачењем (Zheng и сар., 2012).

С обзиром да се према доступним литературним подацима може видети да до сада није описан ефекат ове јединствене масне киселине матичног млеча на хумане дендритске ћелије (DC) и неутрофиле, предмет нашег истраживања, између осталог, био је да покажемо како 10-HDA делује на ове ћелије. Због тога ће у наредном делу увода бити описана физиолошка улога неутрофила и DC.

Неутрофили

Неутрофили се константно стварају у костној сржи из мијелоидних прекурсора. Њихова дневна производња код људи може достићи и до 2×10^{11} ћелија (Vorregaard, 2010). Процес развоја неутрофила је контролисан фактором стимулације колонија гранулоцита (G-CSF) (Lieschke и сар., 1994), који се углавном производи у одговору на IL-17A кога синтетишу Т лимфоцити (Ley и сар., 2006). С друге стране, ослобађање IL-17A је под контролом IL-23 кога продукују резидентни макрофаги и DC. Током инфламације број неутрофила у ткивима се повећава. Временом ове ћелије умиру апоптозом и уклањају их макрофаги и DC. Овај процес узрокује нисходну регулацију синтезе IL-23 у макрофагима и DC, што за последицу има смањење G-CSF (Stark и сар., 2005, Ley и сар., 2006, Amulic и сар., 2012, Kolaczowska и Kubes, 2013).

Процес сазревања неутрофила је под контролом транскрипционих фактора (претежно PU.1 и C/EBP $_{\alpha-\zeta}$) (Nerlov и Graf, 1998, Dahl и сар., 2003). Током сазревања, неутрофили пролазе кроз неколико фаза: мијелобласти, промијелоцити, мијелоцити, метамијелоцити и, на крају, полиморфонуклеарне (сегментиране) ћелије (Vorregaard, 2010). Неутрофилне грануле се формирају током сазревања од промијелцитне фазе.

Број циркулишућих неутрофила се разликује код људи и мишева. Код људи, 50-70% циркулишућих леукоцита су неутрофили, док је код мишева овај проценат само 10-25% (Hampton и сар., 1998, Doeing и сар., 2003, Mestas и Hughes, 2004, Amulic и сар., 2012). Хумани неутрофили периферне крви имају просечни пречник

од 7-10 μm , једро им је сегментирано, а цитоплазма испуњена гранулама и секреторним везикулама (Vorregaard, 2010).

Постоје три основна типа гранула у неутрофилима које се формирају током њиховог сазревања. Азурофилне грануле (познате и као пероксидаза-позитивне или примарне грануле) су највеће, величине око 0,3 μm у пречнику и прве се формирају током сазревања неутрофила. Назив су добиле по способности да везују боју базног карактера, *azure A*, али и по томе што садрже мијелопероксидазу (МРО) (Nusse и Lindau, 1988, Lacy, 2005). Ове грануле такође садрже дефензине, лизозиме, ВР1 (енгл. *bactericidal/permeability-increasing protein*) и серин протеазе: неутрофилну еластазу (NE), протеиназу 3 (PR3) и катепсин G (CG) (Faurischou и Vorregaard, 2003). Други тип гранула, специфичне (или секундарне) грануле, су мање (пречника око 0,1 μm), не садрже МРО, а карактерише их присуство гликопротеина лактоферина. Ове грануле се формирају касније од азурофилних гранула. Оне такође садрже доста антимикуробних супстанци као што су NGAL, hCAP-18 и лизозим (Faurischou и Vorregaard, 2003, Lacy, 2005). Трећи тип, желатиназне (терцијарне) грануле, такође су МРО-негативне, мање су од специфичних гранула и садрже бројне металопроотеиназе, попут желатиназе и леуколизина. Оне се најкасније формирају у току развоја неутрофила (Vorregaard и Cowland, 1997). Поред ова три типа гранула, неутрофили садрже и секреторне везикуле које се такође могу сматрати неком врстом неутрофилних гранула. За разлику од класичних гранула, оне се не одвајају од Голџијевог апарата, већ се формирају ендцитозом на крају процеса сазревања неутрофила (Vorregaard и сар., 2007).

При активацији неутрофила настаје мобилизација гранула и оне фузионишу или са плазма мембраном или са фагозомом, ослобађајући притом садржај (Vorregaard и Cowland, 1997). Различите врсте гранула показују различиту склоност за мобилизацију у одговору на инфламаторне сигнале. Најтеже се мобилишу азурофилне, а затим специфичне и желатиназне грануле, и коначно, секреторне везикуле (Vorregaard и сар., 1992, Kjeldsen и сар., 1992, Kjeldsen и сар., 1993, Sengelov и сар., 1993, Vorregaard и сар., 1994, Amulic и сар., 2012). На месту инфламације постиже се потпуна активација неутрофила што изазива покретање оксидативног праска и мобилизацију азурофилних и специфичних гранула. Ове грануле, било да фузионишу са фагозомом или са плазма мембраном, ослобађајући

притом свој садржај, доприносе склапању NADPH оксидазе и продукцији реактивних кисеоничних врста (Jesaitis и сар., 1990). Дегранулација примарних и секундарних гранула доприноси стварању антимикробног миљеа на месту запаљења (Nauseef и Borregaard, 2014).

Неутрофили производе велики број пептида и протеина који директно или индиректно убијају микроорганизме (Табела 3). Ове антимикробне супстанце се могу сврстати у три групе: (а) катјонски пептиди и протеини који се везују за мембране микроорганизама; (б) ензими; (в) протеини који онемогућавају микроорганизме да користе есенцијалне хранљиве материје. У групу катјонских антимикробних пептида спадају дефензини и кателицидини, док су најзначајнији катјонски протеини BPI и хистони. Неутрофили углавном производе α -дефензине, који садрже велики број дисулфидних веза и чија структура, у зависности од околних утицаја, може да се мења појачавајући њихову активност (Schroeder и сар., 2011). Најзначајнија функција α -дефензина је инхибиција синтезе ћелијског зида бактерија (Schneider и сар., 2010). Кателицидини, укључујући и најбоље проучен LL-37, настају протеолитичком разградњом већих протеина, а поред њихове антимикробне активности, могу да потенцирају активацију DC (Lande и сар., 2007). BPI је протеин који снажно везује LPS, изазивајући повећану бактеријску пермеабилност, хидролизу бактеријских фосфолипида и, на крају, смрт бактерија (Canny и Levy, 2008). Хистони су изузетно ефикасни у убијању микроорганизама и представљају једну од антимикробних супстанци неутрофила која је прва описана (Hirsch, 1958). Друга класа неутрофилних антимикробних супстанци обухвата велики број протеолитичких ензима који учествују у убијању микроорганизама. Ту спадају лизозим, који уништава бактеријски зид (Nash и сар., 2006) и неколико серин протеаза као што су PR3, CG, NE; познате као серпроцидини (Weingauch и сар., 2002). Поред ових ензима постоји још један протеин који припада овој групи. То је азуроцидин, који не испољава протеолитичку активност, али има антимикробно дејство (Campanelli и сар., 1990). Трећу класу неутрофилних антимикробних супстанци чине протеини који имају способност да хелирају есенцијалне метале и на тај начин инхибирају раст бактерија. Лактоферин (везује гвожђе) и калпротектин (везује цинк) су два најважнија протеина ове класе (Weinberg, 1975, Corbin и сар., 2008).

Табела 3. Антимикробни пептиди и протеини неутрофила и механизам њиховог дејства

Антимикробни пептиди и протеини	Механизам антимикробног дејства
<u>Катјонски пептиди и протеини</u>	
α-дефензини (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	–Пермеабилizација мембране –Инхибиција синтезе DNK, RNK и протеина –Инхибиција синтезе ћелијског зида бактерија
LL-37	–Формирање трансмембранских пора
ВР1	–Повећање пермеабилности мембране бактерија –Хидролиза фосфолипида
Хистони	–Непознати механизам
<u>Протеолитички ензими</u>	
Лизозим	–Разградња ћелијског зида бактерија
Протеиназа 3	–Механизам који је независан од протеолитичке активности а посредован је везивањем за мембрану бактерија
Неутрофилна еластаза	–Исецање фактора вируленције бактерија и других мембранских протеина –Механизам који је независан од протеолитичке активности а посредован је везивањем за мембрану бактерија
Катепсин G	–Исецање фактора вируленције бактерија и других мембранских протеина –Механизам који је независан од протеолитичке активности а посредован је везивањем за мембрану бактерија
Азуроцидин	–Механизам који је независан од протеолитичке активности а посредован је везивањем за мембрану бактерија
<u>Протеини хелатори метала</u>	
Лактоферин	–Ремети раст бактерија тако што се везује за гвожђе које је есенцијални бактеријски нутријент
Калпротектин	–Ремети раст бактерија тако што се везује за магнезијум и цинк смањујући њихову расположивост

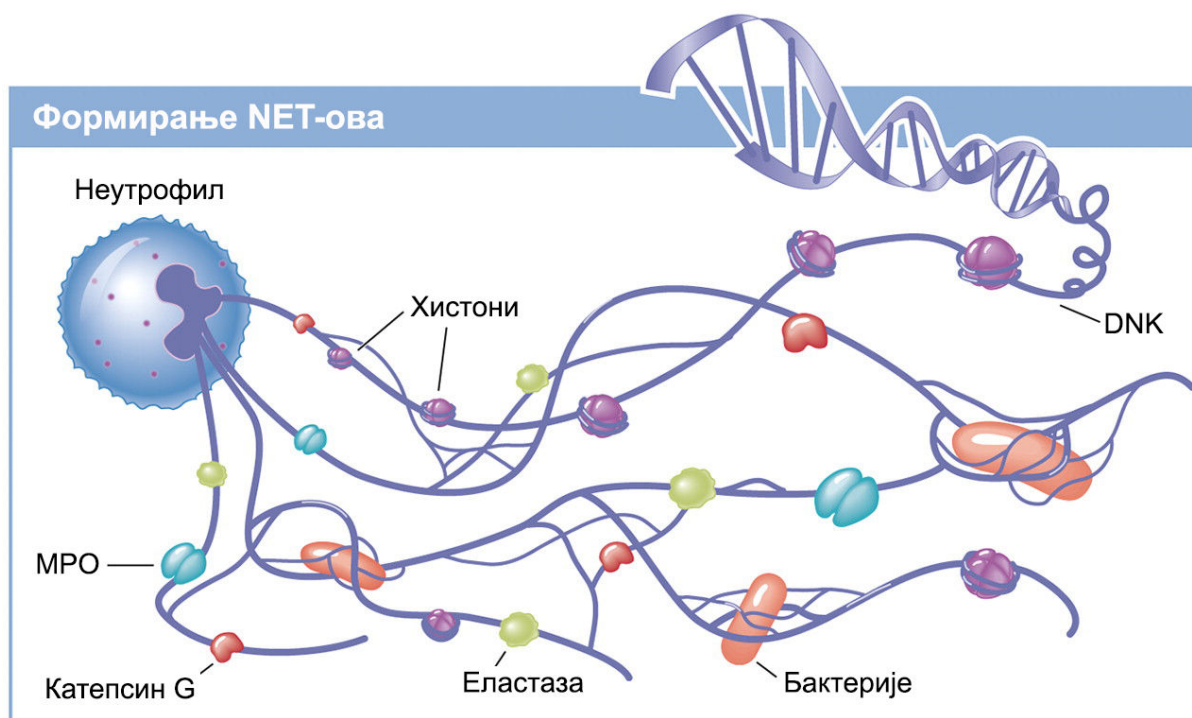
Модификовано према Amulic и сар. (2012)

Након активације, неутрофили производе реактивне кисеоничне врсте у процесу који се зове респираторни или оксидативни прасак (Nauseef и Borregaard, 2014). Први корак у настајању реактивних кисеоничних врста је склапање

комплекса NADPH оксидазе на плазма мембрани и мембрани фагозома. NADPH оксидаза редукује молекулски кисеоник до супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) који процесом дизмутације прелази у водоник-пероксид (H_2O_2). $O_2^{\cdot-}$ такође може да реагује и са азот-оксидом, који је присутан у високим концентрацијама на месту запаљења, формирајући пероксинитрит, јак оксидант. Након дегранулације у фагозома, МРО реагује са H_2O_2 при чему настаје хипохлорна киселина ($HOCl$) која је реактивнија од $O_2^{\cdot-}$ и има антимикуробно дејство *in vitro*; стога се претпоставља да има директан антимикуробни ефекат у фагозома (Hampton и сар., 1998, Bogdan и сар., 2000, Winterbourn и сар., 2006, Winterbourn, 2008). Реактивне кисеоничне врсте су веома важне за антимикуробну активност неутрофила. Наиме, неутрофили особа са хроничном грануломатозном болешћу (енгл. *chronic granulomatous disease* - CGD) показују слабу антимикуробну активност, што чини ове пацијенте осетљивим на многе инфекције (Segal и сар., 2000). Иако је МРО важна за микробицидну активност неутрофила *in vitro*, парадоксално је да већина МРО-дефицијентних особа имају, наизглед, нормалан имунски одговор, без клиничких манифестација имунодефицијенције (Klebanoff, 2005, Nauseef, 2007). Ово указује да МРО није есенцијална за антимикуробну активност неутрофила и да, у одсуству МРО, друге реактивне кисеоничне врсте ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , пероксинитрит) могу обављати антимикуробну активност (Winterbourn и сар., 2006).

Неутрофили могу након снажне активације да уђу у NETozi, активну форму ћелијске смрти која се одликује ослобађањем декондензованог хроматина у екстрацелуларни простор (Brinkmann и сар., 2004, Fuchs и сар., 2007, Amulic и сар., 2012). Влакнасте структуре које се називају неутрофилне екстраћелијске замке (NET; енгл. *neutrophil extracellular traps*) садрже хистоне, као и антимикуробне протеине пореклом из цитоплазме и из гранула (лактоферин, CG, дефензини, LL37, NE, PR3, МРО и желатиназа) (Urban и сар., 2009, Kolaczkowska и Kubes, 2013) (слика 2). *Ex vivo* је показано да NET-ови могу да “хватају” и убијају многе микроорганлизме излажући их високим концентрацијама антимикуробних супстанци (Papaannopoulos и Zychlinsky, 2009, Yipp и сар., 2012). Механизам којим се NET-ови формирају није у потпуности разјашњен. Међутим, показано је да је за процес NEToze неопходна нормална функција NADPH оксидазе и МРО, односно синтеза реактивних кисеоничних врста (Fuchs и сар., 2007, Patel и сар., 2010, Metzler и сар.,

2011). Може се рећи да је за скоро све познате активаторе NEToze, била неопходна продукција реактивних кисеоничних врста.



Слика 2. Схематски приказ NEToze са приказаним хистонима и цитоплазматским протеинима. Преузето из Miyata и Fan (2012).

Важност NEToze у одбрани од патогених микроорганизама потврђује и податак да се бактерије које испољавају ензим дезоксирибонуклеазу (DNKaza), као фактор вируленције, лакше шире у организму и показују већу патогеност. Настанак овог ензима код бактерија се сматра последицом притиска еволуције како би оне избегле процес NEToze (Beiter и сар., 2006, Buchanan и сар., 2006). Поред тога, упорне инфекције *Aspergillus-ом* код CGD пацијента нестају после генске терапије при којој се обнавља активност NADPH оксидазе и формирање NET-ова (Bianchi и сар., 2009). С друге стране, претпоставља се да NET-ови имају веома важну улогу у борби против инфекција изазваних микроорганизмима, који због величине не могу бити фагоцитовани. Поред повољних функција у организму сматра се да NET-ови могу имати и штетне ефекте по домаћина, с обзиром да екстрацелуларно испољавају сопствене антигене што може узроковати аутоимуност (Wang и Arase, 2014). Наиме, све се више истражује улога NET-ова у патогенези SLE, аутоимунског обољења које се одликује појавом аутоантитела претежно на компоненте хроматина и неутрофила

(Kessenbrock и сар., 2009, Hakkim и сар., 2010, Garcia-Romo и сар., 2011, Lande и сар., 2011, Villanueva и сар., 2011).

Дендритске ћелије

Дендритске ћелије су професионалне антиген презентујуће ћелије које је први описао Steinman 1973. год. (Steinman и Cohn, 1973) и за то откриће добио Нобелову награду за физиологију или медицину 2011. године. Назив су добиле због свог морфолошког изгледа који се одликује присуством великог броја цитоплазматских продужетака путем којих лако ступају у контакт са другим ћелијама (Banchereau и Steinman, 1998). Главна улога ових ћелија се огледа у преузимању, обради, транспорту и презентацији антигена Т лимфоцитима (Banchereau и сар., 2000, Shortman и Liu, 2002, Shortman и Naik, 2007). Поред тога, DC су једине познате ћелије које могу да активирају наивне Т лимфоците, али и ћелије које играју веома важну улогу у повезивању урођене и стечене имуности, као и регулацији имунског одговора (Banchereau и Steinman, 1998, Banchereau и сар., 2000, Steinman и Hemmi, 2006, Steinman и Banchereau, 2007, Buckwalter и Albert, 2009).

DC настају из прекурсора у костној сржи, а по обављању своје биолошке функције у лимфним органима и ткивима, умиру процесом апоптозе (Mildner и Jung, 2014). Током животног циклуса ове ћелије пролазе кроз неколико стадијума: а) непосредни прекурсори DC, који циркулишу крвним и лимфним судовима, б) незреле DC, налазе се у ткивима, са великом фагоцитозном способношћу и в) зреле DC, смештене у секундарним лимфним органима са испољеним великим бројем ко-стимулаторних молекула (Banchereau и сар., 2000, Buckwalter и Albert, 2009, Mildner и Jung, 2014). Диференцијацијом матичних ћелија костне сржи настају мијелоидни или лимфоидни прекурсори DC. Због тога су ове ћелије према пореклу сврстане у две групе: лимфоидне или плазмацитоидне DC и мијелоидне или конвенционалне DC (cDC). Плазмацитоидне DC (pDC) учествују у имунском одговору на вирусе продукујући велике количине интерферона тип I, а по изгледу подсећају на плазма ћелије и бројчано су мање заступљене у односу на cDC, иако их има у многим ткивима и органима (костна срж, крв, јетра, тимус, тонзиле, Т ћелијске зоне лимфних органа) (Buckwalter и Albert, 2009, Ganguly и сар., 2013). Значајно већу

популацију присутну у готово свим ткивима и органима чине cDC. Ове ћелије се могу даље сврстати у различите подгрупе на основу њихове локације и експресије површинских маркера. На пример у кожи постоје више подгрупа cDC: а) cDC у епидермису се називају Лангерхансове ћелије и одликују се присуством пенталамеларних цитоплазматских органела (Бирбекове грануле), а фенотипски испољавају лангерин (лектин који везује манозу); б) у дерму су, поред Лангерхансових ћелија, присутне дермалне DC, такође означене и као интерстицијалне DC које се налазе у интерстицијуму скоро свих органа; в) и трећу групи чине DC настале од моноцита (MoDC) који углавном у току инфламације мигрирају у кожу и ту се диференцирају (Leon и Ardavin, 2008, Buckwalter и Albert, 2009).

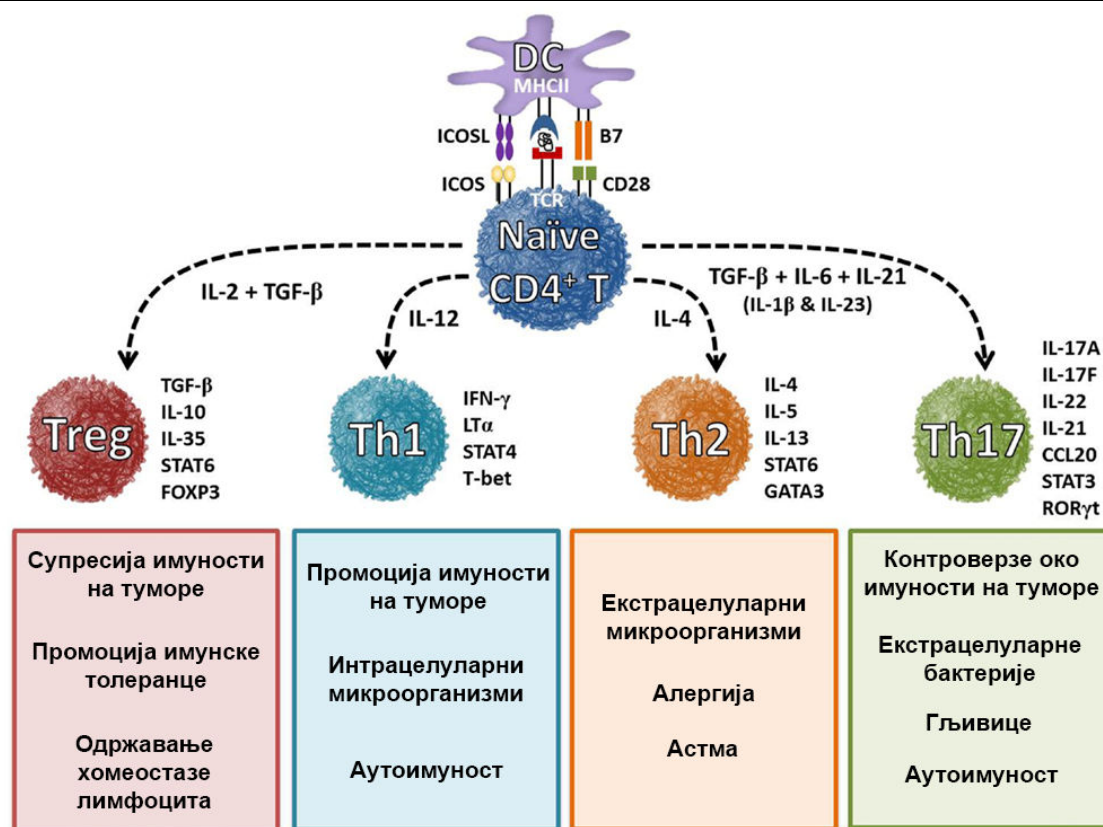
Готово све DC у периферним ткивима, као што су ове три претходно споменуте групе (интерстицијалне, Лангерхансове и MoDC), су незреле DC и њихова главна улога је надгледање локалне микросредине за присуство микроорганизама. Незреле DC се карактеришу израженом способношћу препознавања, интернализације и обраде антигена, али и слабом способношћу активације Т лимфоцита (Sato и Fujita, 2007, Ueno и сар., 2007). Сходно таквој активности, ове ћелије испољавају рецепторе који су укључени у препознавање и интернализацију антигена. У ове рецепторе спадају рецептори слични *Toll*-у (енгл. *Toll Like Receptors* – TLR), којима DC препознају различите молекуле микроорганизама (протеогликане, LPS, флагелин, неметиловане CpG олигонуклеотиде бактерија, једноланчане и дволанчане RNK вируса и др), Fc рецептори (препознавање опсонизованих ћелија и имунских комплекса), лектински рецептори С типа (препознавање манозних и фукозних остатака на површини микроорганизама), рецептори за комплемент (препознавање опсонизованих микроорганизама) итд. Осим тога, незреле DC испољавају различите рецепторе за хемокине (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 и CXCR2) који им омогућавају да дођу на место инфламације, а фенотипски се карактеришу CD83^{негативно}, CD14^{слабо}, HLA-DR^{умерено} CD86^{слабо/умерено}, CCR7^{негативно} (Guermontprez и сар., 2002, Sato и Fujita, 2007, Merad и Manz, 2009)

Када се незреле DC сусретну са страним антигеном у присуству различитих продуката микроорганизама (LPS, CpG) и про-инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6) започиње процес њихове активације, односно сазревања (Skoberne и сар., 2004, Sabatte и сар., 2007). У току сазревања, на површини DC се најпре у високом степену испољава CD83 молекула, главни маркер сазревања DC (Zhou и Tedder, 1996, Dalod и сар., 2014). Осим тога, DC повећавају експресију МНС молекула II класе, костимулаторних молекула (CD40, CD80 и CD86) и адхезивних молекула (CD2, CD11a, CD54, CD58, β 1 и β 2 integrini) (Scholer и сар., 2008, Dalod и сар., 2014), а губе способност обраде антигена. Процес сазревања се одликује високом ћелијском покретљивошћу и морфолошким променама у виду реорганизације цитоскелета. DC током сазревања мењају експресију хемокинских рецептора тако што губе рецепторе за инфламаторне хемокине, а испољавају CCR7 и CXCR4 хемокинске рецепторе. За ове рецепторе се везују хемокини CCL19, CCL21 и CXCL12 који се продукују у лимфним чворовима. Привучене овим хемокинима DC из периферних ткива мигрирају у регионалне лимфне чворове где ступају у контакт са наивним Т лимфоцитима (Martin-Fontecha и сар., 2009, Dalod и сар., 2014).

У секундарним лимфним органима зреле DC ступају у интеракцију са наивним Т лимфоцитима, што доводи до пролиферације и диференцијације наивних Т лимфоцита у различите субпопулације ефекторских Т лимфоцита (Banchereau и сар., 2000). Ова интеракција је посредована адхезивним молекулима (β 1 и β 2 интегринима) и молекулима који припадају суперфамилији имуноглобулина (CD2, CD50, CD54, CD58). За потпуну активацију и клонску експанзију антиген-специфичних Т лимфоцита неопходна су најмање два сигнала. Покретање првог сигнала активације узрокује специфично препознавање пептидног антигена у склопу МНС молекула испољеног на DC од стране Т ћелијског рецептора (TCR). Други сигнал активације се покреће интеракцијом CD80 и/или CD86 молекула на DC и CD28 молекула испољеног на Т лимфоцитима (Banchereau и сар., 2000, Steinman и Nemmi, 2006). Међутим, у овом почетном контакту Т лимфоцити нису у потпуности активирани јер је ниво остварене костимулације низак. Због тога је неопходно да Т лимфоцити додатно стимулишу испољавање CD80 и CD86 молекула на DC. То се постиже интеракцијом CD40L испољеног на активираним Т лимфоцитима са CD40 молекулом на DC (Haase и сар., 2004). Ова интеракција повећава испољавање

костимулаторних лиганада на DC што узрокује потпуну активацију Т лимфоцита. Поред ова два сигнала, DC обезбеђују лимфоцитима и трећи, цитокински сигнал (Kalinski и сар., 1999). Наиме, настанак одређене субпопулације ефекторских CD4⁺ Т лимфоцита регулисан је цитокинима које углавном продукују DC. DC су специјализоване да секретују цитокине у зависности од типа микроорганизма. На тај начин DC усмеравају диференцијацију наивних CD4⁺ Т лимфоцита у субпопулацију која ће бити најефикаснија у елиминисању микроорганизма окружења (Murphy и Reiner, 2002). Описан је већи број субпопулација ефекторских CD4⁺Т лимфоцита од којих су најбоље проучене Th1, Th2, Th17 и регулаторни Т лимфоцити (Treg) (слика 3) (Zhu и сар., 2010).

Развој Th1 лимфоцита подстичу IL-12, IL-18, IFN- α и IFN- β , с тим да је најпотентнији међу њима IL-12. Основна улога Th1 лимфоцита је продукција IFN- γ који снажно активира макрофаге да фагоцитују и елиминишу антиген (Berenson и сар., 2004, O'Garra и Robinson, 2004). Такође, секрецијом IFN- γ , ове ћелије, подстичу диференцијацију наивних CD4⁺Т лимфоцита у Th1, а истовремено инхибирају настанак Th2 и Th17 лимфоцита. Наиме, IL-12 и IFN- γ стимулишу Th1 диференцијацију активирањем транскрипционих фактора T-bet, STAT1 и STAT4. T-bet, члан T-box фамилије транскрипционих фактора, представља главни регулатор Th1 диференцијације. Експресија T-bet у наивним CD4⁺ Т лимфоцитима индукује се у одговору на антиген и IFN- γ (активира транскрипциони фактор STAT1 који стимулише експресију T-bet). Такође, T-bet подстиче продукцију IFN- γ тако што директно активира гене за IFN- γ и врши ремоделацију хроматина у нивоу локуса за IFN- γ . Способност IFN- γ да стимулише експресију T-bet и способност T-bet да појача транскрипцију гена за IFN- γ представља пример позитивне повратне спреге која усмерава диференцијацију Т лимфоцита ка Th1 фенотипу. IL-12 доприноси Th1 усмеравању, везујући се за рецепторе на антиген стимулисаним CD4⁺ Т лимфоцитима што активира транскрипциони фактор STAT4 који даље увећава продукцију IFN- γ (Aune и сар., 2009, Plasek и сар., 2009).



Слика 3. Поларизација Th имунског одговора; преузето из Bailey и сар. (2014)

Th2 лимфоцити настају у одговору организма на хелминте и алергене. Хелминти и алергени узрокују хроничну стимулацију Т лимфоцита, често без јаког урођеног имунског одговора који је потребан за Th1 диференцијацију (Окоуе и Wilson, 2011). Диференцијацију антиген-стимулисаних CD4⁺ Т лимфоцита у Th2 лимфоците стимулише IL-4. У одређеним ситуацијама, као што је нпр. инфекција хелминтима, вероватно су мастоцити ти који секретују IL-4. Друга могућност је да антиген-стимулисани CD4⁺ Т лимфоцити секретују мале количине IL-4 за њихову почетну активацију (O'Garra и Arai, 2000). Слично IFN-γ, IL-4 стимулише настанак Th2, а инхибира Th1 и Th17 лимфоцита. IL-4 стимулише Th2 диференцијацију тако што активира транскрипциони фактор STAT6, а он заједно са сигнаlima од TCR-а узрокује експресију GATA-3, транскрипционог фактора који је главни регулатор Th2 диференцијације. GATA-3 повећава експресију гена за IL-4, IL-5 и IL-13, везујући се директно за промоторе ових гена и такође узрокује ремоделовање хроматина које отвара генске локусе за могућност деловања других транскрипционих фактора (Но и сар., 2009). Th2 лимфоцити обављају своју улогу тако што секретују IL-4 који индукује IgE хуморални одговор, IL-5 који активира

еозинофиле и IL-13 који заједно са IL-4 учествује у инфламацији алергијске природе и у одбрани од паразита (Okoye и Wilson, 2011).

Развој Th17 лимфоцита стимулисан је проинфламаторним цитокинима који се продукују у одговору на бактерије и гљивице. DC у одговору на различите бактерије и гљивице продукују IL-6, IL-1 и IL-23 што узрокује Th17 диференцијацију. Сигнал за DC да продукују ове цитокине је везивање гљивичних продуката за лектински рецептор *dectin-1*. DC такође секретују ове цитокине и након ингестије ћелије која је услед инфекције бактеријом или гљивицом ушла у апоптозу. Осим тога, развој проинфламаторних Th17 лимфоцита у присуству других медијатора запаљења, као што су IL-6 и IL-1, подстиче TGF- β . Th17 лимфоцити продукују IL-21 који појачава њихову диференцијацију, односно има аутокрино дејство (Stockinger и Veldhoen, 2007). Развој Th17 лимфоцита зависи од транскрипционих фактора ROR γ t и STAT3. TGF- β , IL-6 и IL-1 заједно индукују продукцију транскрипционог фактора ROR γ t који је члан породице рецептора ретиноичне киселине. Инфламаторни цитокини, посебно IL-6, активирају транскрипциони фактор STAT3, који заједно са ROR γ t узрокује Th17 одговор (Stockinger и Veldhoen, 2007, de Jong и сар., 2010, Hwang, 2010). Th17 лимфоцити су углавном присутни у мукозама, посебно у мукози гастро-интестиналног тракта. Ова чињеница указује на могућност да околно ткиво утиче на развој ове субпопулације, вероватно продукцијом TGF- β и других цитокина. Th17 лимфоцити продукују неколико цитокина од којих је најзначајнији IL-17, који представља породицу од шест структурно повезаних цитокина. У оквиру фамилије, највећа сличност постоји између IL-17A и IL-17F, а улога у имунским реакцијама се углавном приписује IL-17A. Овај цитокин стимулише продукцију хемокина и цитокина који на месту запаљења регрутују неутрофиле и моноците. IL-17A у многим ћелијама стимулише продукцију антимикробних супстанци као што су дефензини. Такође, Th17 лимфоцити, осим IL-17, продукују IL-21 и IL-22. IL-21 стимулише хуморални имунски одговор и ефекторске функције CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија, а IL-22 има улогу у очувању интегритета епитела коже и гастроинтестиналног тракта. Th17 лимфоцити су такође важни у патогенези многих инфламаторних болести, као што су псоријаза, запаљенске болести црева, реуматоидни артритис и мултипла склероза (Crome и сар., 2010, Torchinsky и Blander, 2010).

Трег лимфоцити настају претежно препознавањем аутоантигена у тимусу и препознавањем аутоантигена и страних антигена у периферним лимфним органима. Трег лимфоцити, који настају у тимусу, називају се природни Трег лимфоцити, а Трег лимфоцити који настају у периферним лимфним органима називају се адаптивни или индуковани. У периферним лимфним органима, препознавање антигена у одсуству снажног урођеног имунског одговора подстиче настајање Трег лимфоцита из наивних $CD4^+$ Т лимфоцита, мада Трег лимфоцити могу да се развију и после запаљенских реакција. Природни Трег лимфоцити су специфични за сопствене антигене, док индуковани Трег лимфоцити могу бити специфични за сопствене, али и за стране антигене. Настанак и преживљавање Трег лимфоцита зависи од цитокина $TGF-\beta$ и $IL-2$. $TGF-\beta$ стимулише експресију Foxp3 транскрипционог фактора који подстиче диференцијацију Т лимфоцита у Трег лимфоците. $IL-2$ подстиче диференцијацију Т лимфоцита у Трег тако што активира транскрипциони фактор STAT5 који појачава експресију Foxp3. Главна улога Трег лимфоцита је супресија имунског одговора и одржавање толеранције на сопствене антигене. Трег лимфоцити продукују $IL-10$ и $TGF-\beta$, који делују доминантно супресорски (Thornton, 2005, Askensy и сар., 2008, Li и Boussiotis, 2011, Kaczorowski и Jutel, 2013).

**Хипотезе и
циљеви
истраживања**

Иако први научни радови о 10-HDA датирају још од четрдесетих и педесетих година прошлог века (Townsend и Lucas, 1940, Townsend и сар., 1959) мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози. Досадашња истраживања превасходно на анималним експерименталним моделима су показала њено анти-инфламаторно дејство (Sugiyama и сар., 2012a, Sugiyama и сар., 2012b, Takahashi и сар., 2012, Sugiyama и сар., 2013). Поред тога, експерименти на ћелијама пацова спроведени на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије су указали и на имуномодулаторна својства ове масне киселине (Gasic и сар., 2007, Vucevic и сар., 2007). Међутим, о антиоксидативној активности 10-HDA се зна само на основу једне *in vitro* студије у којој је показано да ова масна киселина смањује степен оксидативног стреса индукованог ултравиолетним А зрачењем код хуманих дермалних фибробласта (Zheng и сар., 2012). На основу ових литературних података и сазнања да се најпогодније методе у савременом концепту изучавања имунофармаколошких својстава појединих лековитих препарата у *in vitro* системима, базирају на проучавању одговора ћелија периферне крви, као и да је интеракција DC и T лимфоцита једна од кључних у регулацији имунског одговора, поставили смо следеће

Хипотезе

1. 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на функционални одговор хуманих имунских ћелија *in vitro* при чему у високим концентрацијама делује инхибиторно, а у ниским концентрацијама стимулаторно
2. 10-HDA у милимоларним концентрацијама испољава директна антиоксидативна својства

За проверу ових хипотеза постављени су следећи:

Циљеви истраживања

1. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA), N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланином (fMLP) или опсонизованим зимозаном (opZy)
2. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на спонтану и PMA, fMLP и opZy индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви
3. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на процес NEToze хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA
4. Испитати способност 10-HDA да „сакупља“, односно реагује са реактивним кисеоничним врстама користећи системе без ћелија
5. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на пролиферацију моноклеарних ћелија периферне крви (PBMNC) стимулираних фитохемаглутинином (PHA)
6. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина у култури PBMNC стимулираних PHA
7. Испитати ефекат различитих концентрација 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора у култури PBMNC стимулираних PHA
8. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на матурацију и алостимулаторну способност MoDC
9. Испитати дозно-зависан ефекат 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора у ко-култури MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита периферне крви

Материјал и методе

Медијуми, пуфери и реагенси

RPMI 1640 медијум

RPMI 1640 медијум (Sigma, Минхен, Немачка) са 1% гентамицином (Галеника, Београд, Србија) и 7.5% NaHCO_3 (Апотека ВМА, Београд, Србија) коме је додато 10% феталног телећег серума (енгл. *fetal calf serum*, FCS; PAA Laboratories, Келбе, Немачка), 50 μM 2-меркаптоетанола (2-МЕ, Sigma), 50 i.j/ml пеницилина и 50mg/ml стрептомицина (Галеника) коришћен је за култивацију PBMNC и MoDC и представља комплетан RPMI медијум.

За изолацију PBMNC коришћен је RPMI 1640 медијум (Sigma) са 1% гентамицином (Галеника) и 7.5% NaHCO_3 са додатим 0,02% Na-EDTA (Апотека ВМА).

HBSS (енгл. Hank's Balanced Salt Solution) медијум

HBSS медијум је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,26mM CaCl_2 (Merck, Њујорк, САД), 5,37mM KCl (Serva, Хајделберг, Немачка), 0,81mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 140mM NaCl (Merck), 0,36mM KH_2PO_4 (Merck), 0,34mM Na_2HPO_4 (Merck), 4,17mM NaHCO_3 (Merck), 5,55mM D-глукоза (Merck) у дестилованој води. рН вредност медијума је подешена на 7,4 коришћењем концентроване HCl (Merck) или 5M NaOH (Merck), а стерилизација је извршена аутоклавирањем. Овај медијум је коришћен за изолацију и култивацију неутрофила периферне крви.

HBSS⁺ медијум

HBSS⁺ медијум је HBSS са додатим 0,05% FCS и 10nM HEPES-ом (Flow Laboratories, Ирвин, Шкотска). Овај медијум је коришћен за култивацију неутрофила периферне крви у појединим експериментима.

PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline)

PBS (рН 7,4) је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,06mM KH_2PO_4 , 155,17mM NaCl, 2,97mM Na_2HPO_4 у дестилованој води.

PBS1

PBS1 је 0,01%NaN₃ (Sigma) у PBS.

PBS2

PBS2 је 2% FCS у PBS1.

Калијум-PBS

К-PBS је направљен коришћењем следећих супстанци: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ у дестилованој води. Овај пуфер је према упутству произвођача коришћен за ELISA тестове.

Пропидијум јодид

Пропидијум јодид (PI) (ICN, Санта Ана, САД) је растворен у дејонизованој води у концентрацији од 1mg/ml (15mM) и чуван на +4°C до употребе.

Пропидијум јодид у хипотонном пуферу

PI у хипотонном пуферу је направљен на следећи начин: 250μL PI штока (15mM у H₂O, Sigma), 2,2mL 0.75M воденог раствора натријум цитрата (Merck), 50μL Triton X-100 (Serva); допунити са H₂O до 50ml.

Декстран 500

Декстран 500 (Merck) је растворен у физиолошком раствору тако да је добијен 20% шток. Овај раствор је аутоклавиран и чуван на собној температури, а коришћен је за изолацију неутрофила из периферне крви.

Пуфер за лизирање еритроцита

Пуфер за лизирање еритроцита је направљен десет пута концентрован и садржи следеће супстанце: 1,5M NH₄Cl (Merck), 0,1M NaHCO₃, 1mM Na₂EDTA (Sigma) у дестилованој води. Овај пуфер, разблажен десет пута дестилованом водом,

је коришћен за лизирање контаминирајућих еритроцита у току изолације неутрофила.

Пуфер за сортирање

Пуфер за сортирање ћелија је водени раствор који садржи 2mM Na₂EDTA и 0,5% FCS

Фосфатни пуфер, 19mM, pH 7,4

Фосфатни пуфер је водени раствор који садржи 14,7mM Na₂HPO₄ и 4.3mM NaH₂PO₄ (Merck).

Фосфатни пуфер, 100mM, pH 7,4

Фосфатни пуфер је је водени раствор који садржи 77.4mM Na₂HPO₄ и 22,6mM NaH₂PO₄.

Калијум-фосфатни пуфер са EDTA (КРЕ пуфер)

КРЕ пуфер је направљен тако да садржи 8,78mM династријумове соли EDTA у 0,1M фосфатном пуферу pH 7,5. Овај пуфер је коришћен за одређивање концентрације глутатиона.

Екстракциони пуфер

Екстракциони пуфер је 0,1% Triton X-100 и 0,6% сулфосалицилна киселина у КРЕ пуферу. Овај пуфер је коришћен при хомогенизацији и сонификацији ћелија током одређивања концентрације глутатиона, а прављен је непосредно пре употребе.

Рекомбинантни хумани фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (GM-CSF)

Рекомбинантни хумани GM-CSF (rh GM-CSF; Leucotax, специфичне активности 4.44x10⁶ U; Sandoz-Schering Plough, Швајцарска). Растворен је под стерилним условима у дестилованој води у концентрацији од 100μg/ml и тако чуван

на -80°C , до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 100ng/ml .

Рекомбинантни хумани IL-4

Рекомбинантни хумани IL-4 (rh IL-4; Roche Diagnostics GmbH, Минхен, Немачка). Растворен је под стерилним условима у дестилованој води у концентрацији од $25\mu\text{g/ml}$ и чуван на -80°C до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 20ng/ml .

10-HDA

У експериментима је коришћена комерцијална 10-HDA (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Осака, Јапан). 10-HDA је растворена у диметил-сулфоксиду (DMSO) у концентрацији од 2M, аликвотирана и чувана на -40°C . У експериментима је коришћена у концентрацијама од $0,01\text{mM}$ до 4mM .

Моноклонска антитела коришћена у фенотипској анализи ћелија

Табела 4. Моноклонска антитела коришћена у фенотипској анализи МоDC:

Антитело (специфичност)	Клон/каталогски број	Порекло	Коњугат	Произвођач	Разблажење
CD1a	NA/34HLK	Миш	PE	Serotec, Велика Британија	1:10
CD40	5C3	Миш	FITC	Biosciences, САД	1:10
CD54	MCA1615PE	Миш	PE	Serotec, Велика Британија	1:10
CD83	HB15e	Миш	FITC	Biosciences, САД	1:10
CD86	BU63	Миш	PE	Serotec, Велика Британија	1:10
HLA-DR	LN3	Миш	FITC	eBioscience, САД	1:10

Липополисахарид

LPS (Sigma) из *Escherichiae coli* је растворен у RPMI 1640 медијуму у концентрацији од 1mg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацији од 1µg/ml.

Фитохемаглутинин

PHA (Serva) је растворен у RPMI 1640 медијуму у концентрацији од 1mg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацији од 30µg/ml.

Форбол-12-миристан-13-ацетат

PMA (Sigma) је растворен под стерилним условима у DMSO у концентрацији од 160µM и чуван на -20°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацијама од 16nM, 32nM и 48nM.

N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин

fMLP (Sigma) је растворен под стерилним условима у DMSO у концентрацији од 10mM, аликвотиран и чуван на -40°C до употребе. fMLP је у експериментима коришћен у концентрацији од 1µM.

Опсонизовани зимозан

орZу је припремљен како је раније описано (Allen, 2014). Укратко: 50mg зимозана (Sigma) је помешано са 5ml стерилног PBS-а и сонификовано 5 минута у ултразвучном купатилу, а затим инкубирано у кључалом воденом купатилу 10мин. После инкубације и центрифугирања на 3000rpm (енгл. *revolutions per minute*), 10 минута, партикуле зимозана су пале на дно епрувете. Супернатант је одбачен, а талог који је састављен од партикула зимозана је ресуспендован у нових 5ml PBS. Цео поступак (ултразвучно и кључало водено купатило, центрифугирање) је поновљен два пута, а финални пелет је ресуспендован у 2,5ml стерилног HBSS, аликвотиран по 250µl (5mg партикула зимозана) и чуван на -40°C. Радни раствор

зимозана је добијен разблаживањем HBSS-ом до концентрације од 1mg/ml. opZy је припреман непосредно пре експеримената инкубацијом радног раствора зимозана (1mg/ml) са истом запремином свежег хуманог серума на 37 °C 30 минута. После инкубације опсонизоване партикуле зимозана су исталожене центрифугирањем (3 минута, 14000rpm) и испране два пута помоћу HBSS. Овако припремљене партикуле opZy су чуване на леду и коришћене у року од два сата.

Дихидрородамин 123

Дихидрородамин 123 (DHR) (Sigma) је растворен у DMSO у концентрацији од 10mM, а затим разблажен помоћу PBS до концентрације од 1mM, аликвотиран и чуван на -20°C.

Луминол

Луминол (Fluka, Бухс, Швајцарска) је растворен у свеже припремљеном 0,1M воденом раствору NaOH до концентрације од 50mM. Раствор луминола добијен на овај начин је стабилан неколико месеци ако се чува на собној температури заштићен од светлости. У експериментима је коришћена концентрација од 50µM, добијена разблаживањем штока непосредно пре експеримената.

2',7'-дихлородихидро-флуоресцеин диацетат

2',7'-дихлородихидро-флуоресцеин диацетат (DCFH-DA) (Sigma) је растворен у DMSO у концентрацији од 10mM, а затим разблажен помоћу PBS до концентрације од 1mM, аликвотиран и чуван на -40°C. Коришћен је у концентрацији од 1µM.

p-Нитроблутетразолијум хлорид

p-Нитроблутетразолијум хлорид (NBT) (Merck) је растворен у HBSS у концентрацији од 5 mg/ml, аликвотиран и чуван на -20°C. Коришћен је у концентрацији од 500µg/ml.

5,5-дитио-бис (2-нитробензоева киселина) (DTNB)

DTNB (енгл. *5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)* (Merck) је растворен у КРЕ пуферу у концентрацији од 0,67mg/ml (1,7mM) и чуван на +4°C.

BAY11-7082

BAY11-7082 (Invivogen, Сан Дијего, САД), инхибитор нуклеарног фактора κB (енгл. *nuclear factor κB* (NF-κB) је растворен у DMSO у концентрацији од 50mM, аликвотиран и чуван на -40°C.

LY294002

LY294002 (Tocris Cookson Inc, Елисвил, САД) инхибитор фосфатидилинозитол 3-киназе (PI3K) је растворен у DMSO у концентрацији од 5mM, аликвотиран и чуван на -40°C.

Редуковани глутатион

Редуковани глутатион (Sigma; ≥98.0%) растворен је у КРЕ пуферу у концентрацији од 1mg/ml (3,25mM), аликвотиран и чуван на -40°C.

Редуковани никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH)

NADPH (Merck) је растворен у КРЕ пуферу у концентрацији од 0,67mg/ml (8mM) и чуван на -20°C.

Редуковани никотинамид аденин динуклеотид (NADH)

NADH (Merck) је растворен у 19mM фосфатном пуферу у концентрацији од 1mM и одмах коришћен.

Феназин метосулфат (PMS)

PMS (Sigma) је растворен у дејонизованој води у концентрацији од 1mM, аликвотиран и чуван на -20°C.

HOCl

HOCl је припремљена непосредно пре употребе тако што је у 1% водени раствор NaOCl (Sigma) додавана кап по кап 10% H₂SO₄ (Merck) до постизања pH вредности од 6,2. Концентрација тако припремљене HOCl је одређивана на таласној дужини од 235nm користећи моларни апсорпциони коефицијент 100M⁻¹ cm⁻¹, а потребно разблажење је направљено помоћу 100mM фосфатног пуфера, pH 7,4.

Јономицин

Јономицин (MP; порекла *Streptomyces conglobatus*) је растворен у DMSO у концентрацији од 1mg/ml (1,4mM), аликвотиран и чуван на -20°C.

SDS-HCl

10% раствор натријум-додецил-сулфата (SDS; Serva) у 0,1N HCl

Све остале супстанце су коришћене као што су добијене од произвођача и то су:

- Limforгер градијент (PAA Laboratories), специфичне густине 1,077g/ml.
- Радиоактивно обележен тимидин - [³H]-тимидин (Amersham International, Амершам, Велика Британија), специфичне активности 6.7 Ci/mmol.
- Triton X-100 (Sigma; laboratory grade)
- Диметил-сулфоксид – DMSO (Merck), стерилан, ≥99.7%
- 4% формалин растворен у фосфатном пуферу и 4% формалин растворен у етанолу (Апотека ВМА)
- Глутатион редуктаза (Sigma), порекла пекарског квасца (*S. cerevisiae*), 200UN,
- H₂SO₄ (Merck), 95-97%
- HCl (Merck), 37%

Изолација и култивација ћелија

Изолација неутрофила периферне крви

Неутрофили периферне крви су изоловани из крви здравих добровољних давалаца којој је као антикоагуланс додат K_3EDTA на основу претходно описане методе (Chen и Junger, 2012). Укратко: у 10 ml крви је додато 3 ml 5% декстрана и након 35 минута седиментације ћелија на собној температури издвојила се плазма обogaћена леукоцитима. Плазма је пажљиво сакупљена и нанета на површину Limforger градијента. После центрифугирања (2200rpm, 20 минута на собној температури) издвојио се прстен PBMNC, а на дну су се исталожили неутрофили и веома мали број еритроцита. Затим је на талог сипано 3 ml пуфера за лизирање како би се лизирали преостали еритроцити у трајању од 2 минута уз лагано мешање аутоматском пипетом. После лизирања ћелије су испране два пута (1400 rpm, 8 минута на собној температури) и ресуспендоване у HBSS медијуму. Чистоћа ћелијске суспензије је одређивана бојењем ћелија, у Türk-овом раствору (Апотека ВМА), а вијабилност бројањем ћелија у 0.2% раствору Трипан плавог (Sigma).

Изолација мононуклеарних ћелија периферне крви

PBMNC су изоловане из леукоцитног концентрата (енгл. *buffy coat*) добијеног од крви здравих добровољних давалаца (Институт за трансфузиологију Војномедицинске академије) центрифугирањем на Limforger градијенту. Леукоцитни концентрат је разблажен три пута медијумом за изолацију ћелија, а затим је у стаклене епрувете запремине 12ml у којима се налази 2,5ml градијента пажљиво нането 7ml суспензије ћелија тако да се формирају две фазе течности. Епрувете су потом центрифугиране на 2200rpm, 20 минута на собној температури након чега се издвојио прстен који садржи PBMNC. Прстени из свих епрувета су сакупљени, а затим су PBMNC испране од градијента центрифугирањем на 1400rpm 8 минута на собној температури. Преостали тромбоцити су уклањени понављаним центрифугирањем и испирањем на 800rpm 8 минута на собној температури минимум 3 пута. Ћелије су затим ресуспендоване у комплетном медијуму за

култивацију ћелија и бројане. Овако добијене ћелије су коришћене за изолацију моноцита, Т лимфоцита и за постављање култура ћелија.

Изолација моноцита

Моноцити су изоловани из PBMNC на основу њихове способности да адхерирају на површину пластичних боца за култивацију ћелија (фласкова). Засејавано је 30×10^6 ћелија/фласку величине T25 (Sarstedt, Нимбрехт, Немачка) у 5ml комплетног RPMI медијума. Након једночасовне инкубације на 37°C у инкубатору за култивисање ћелија са 5% CO_2 , неадхерентна фракција ћелија је одстрањена испирањем помоћу PBS-а, а адхерентна (моноцитна) фракција даље култивисана у циљу добијања MoDC.

Изолација и култивација MoDC

Моноцити добијени на описан начин су култивисани 6 дана у пластичним флашковима на 37°C , у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO_2 (у инкубатору за култивацију ћелија) у комплетном RPMI медијуму уз додатак GM-CSF (100ng/ml) и IL-4 (20ng/ml). По истеку шестог дана култивације, један део незрелих MoDC је сакупљен и анализирана им је експресија CD1a и CD14 молекула методом цитофлуориметрије, а остатак ћелија је распоређен у плочама од 6 места (Sarstedt) (1×10^6 /базену) и стимулисан LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) у одсуству или присуству 10-NDA (50 μM и 500 μM). Након 48h инкубације, на 37°C , ћелије су сакупљене и коришћене у даљим експериментима. Супернатанти из свих базена у којима су ћелије култивисане су сакупљени и смрзнути на -20°C у циљу одређивања концентрације цитокина.

Изолација алогених CD4^+ Т лимфоцита периферне крви помоћу имуномагнетног сортирања

За поставку културе мешаних леукоцита (енгл. *mixed leukocyte reaction*, MLR) и одређивање способности MoDC за поларизацију имунског одговора Th лимфоцита коришћени су CD4^+ Т лимфоцити изоловани методом имуномагнетног сортирања из PBMNC помоћу комерцијалног кита за изолацију, а према протоколу произвођача

(CD4⁺T-cell Isolation Kit, MACS technology, Miltenyi Biotec, Бергиш Гладбах, Немачка). Укратко: 1×10^7 PBMNC је инкубирано 15 минута на хладном, у пуферу за магнетно сортирање, са антителима (анти-CD8, анти-CD14, анти-CD16, анти-CD19, анти-CD36, анти-CD56, анти-CD123, анти-TCR γ/δ и анти-CD235a) коњугованим биотином. Затим су ћелије испране у пуферу за сортирање (1400 грм, 8 минута на +4°C) и инкубиране 15 минута на хладном уз додатак анти-биотин антитела за која су везане магнетне партикуле. Након инкубације, ћелије су испране у пуферу за сортирање (1400грм, 8 минута на +4°C), ресуспендоване у 500 μ l пуфера за сортирање и нанесене на сепарациону колону (LS separation column, Miltenyi Biotec, Немачка) постављену у магнетном пољу (MidiMACS™ Separator, Miltenyi Biotec, Немачка). Чистоћа изолованих CD4⁺ ћелија је проверавана помоћу проточне цитофлуориметрије применом анти-CD4 антитела коњугованог флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) (Serotec, Оксфорд, Велика Британија).

Одређивање броја и вијабилности ћелија помоћу Tripan плавог

Број и вијабилност ћелија је одређивана применом 0.1% Tripan плавог у физиолошком раствору, на Neubauer-овој комори за бројање уобличених елемената крви. Ћелије су посматране на светлосном микроскопу. Током бројања, вијабилним су сматране ћелије које се нису обојиле у плаво.

Процена ћелијске апоптозе и вијабилности

Мерење апоптозе бојењем раствором T_{ürk}-a

Апоптоза ћелија је одређивана морфолошким анализом ћелија применом T_{ürk}-овог реагенса. На микроскопску плочицу са више поља (енгл. *multi-spot*) је стављено 10 μ l ћелијске суспензије чија је апоптоза процењивана. Узорци су анализирани на светлосном микроскопу (Olympus CX31) бројањем најмање 500 ћелија по препарату. Ћелијска суспензија за анализу је припремана тако што је на 2×10^5 ћелија у запремини од 50 μ l додавано 100 μ l концентрованог T_{ürk}-овог раствора.

Мерење апоптозе и вијабилности коришћењем пропидијум јодида

Мерење апоптозе помоћу PI је рађено тако што је након култивације, у 50 μ l ћелијске суспензије која је анализирана додато 250 μ l хипотоног цитратног пуфера са PI (75 μ M). После 15 минута инкубације на леду ћелије су анализирани на проточном цитофлуориметру (Cube 6, Partec, Минстер, Немачка), а обрада података је урађена помоћу програма FCS Express 4 (De Novo Software, Глендејл, Калифорнија, САД). Апоптотичним ћелијама су сматране оне са хиподиплоидним пиком. За процену вијабилности, ћелијама је додат раствор PI у PBS-у (20 μ g/ml), а после 10 минута ћелије су анализирани на цитофлуориметру. Процент вијабилних ћелија је одређиван тако што је од укупног броја анализираних ћелија (100%) одузет проценат PI⁺ ћелија.

Мерење апоптозе у најранијем стадијуму на основу експресије анексина V

Детекција апоптозе у најранијем стадијуму је одређивана помоћу Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen Biosource, Карлсбад, САД) који садржи Annexin V Alexa Fluor 488 и PI. Испитиване ћелије су након култивације сакупљене и испране у хладном PBS-у, а затим ресуспендоване у комерцијалном пуферу за „везивање“ (енгл. *binding buffer*) и третиране Annexin V Alexa Fluor 488 и PI у складу са упутством произвођача. По истеку инкубације од 15 минута, на собној температури ћелијама је додат пуфер за „везивање“ и затим су анализирани на проточном цитофлуориметру.

Фенотипска анализа ћелија

Степен матурације и активације MoDC одређивани су на основу испољавања карактеристичних површинских молекула. За ову методу су коришћена мишја моноклонска антитела (mAt) (Табела 4) која су специфична за хумане антигене и коњугована флуоресцентним бојама (FITC и фикоеритрин (PE, *phycoerythrin*)).

Непосредно пре додавања mAt ћелије су једном испране и ресуспендоване у хладном PBS1 у концентрацији од 1x10⁵ ћелија/50 μ l. У ћелијске суспензије су додата mAt у финалним разблажењима приказаним у табели 4. Ћелије су инкубирани 30 минута на +4 $^{\circ}$ C, испране у PBS1 (центрифугирањем на 1400 rpm, 8

минута, на $+4^{\circ}\text{C}$) и фиксиране у алкохолном раствору 4% формалина. Неспецифично везивање је одређивано применом ирелевантних анти-мишјих mAb коњугованих FITC-ом или PE-ом. Овако обележене ћелије су анализирани на проточном цитофлуориметру (Cube 6), а детаљна обрада података је урађена помоћу програма FCS Express 4. Анализирано је најмање 10 000 ћелија/узорку. Резултати су приказани као средње вредности интензитета флуоресценце (енгл. *mean fluorescence intensity*, MFI).

Процена функционалних карактеристика ћелија

Тест пролиферације PBMNC

PBMNC (3×10^5 /базену у финалној запремини од 200 μl) су култивисане у плочи од 96 места (Sarstedt) у комплетном RPMI медијуму, у одсуству или присуству различитих концентрација 10-HDA. За стимулацију пролиферације је коришћен РНА (30 $\mu\text{g/ml}$). Културе су инкубирани на 37°C у инкубатору за култивацију ћелија са 5% CO_2 , током 72h. 18h пре истека култивације ћелијама је додат [^3H]-тимидин у концентрацији од 1 μCi /базену. Ћелије су сакупљене аутоматским скидачем култура (Titertec Cell Harvester, ICN), а уградња [^3H]-тимидина је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача (LKB-1219 Rackbeta, Турку, Финска). Резултати су приказани као индекс пролиферације који је рачунат тако што су вредности cpm (енгл. *count per minute*) сваког појединачног базена у којима су инкубирани стимулисане PBMNC подељени са средњом вредношћу cpm базена у којима су инкубирани нестимулисане PBMNC (базална пролиферација).

Алостимулацијска способност MoDC

Алостимулаторна способност 10-HDA (50 μM и 500 μM)-третираних MoDC одређивана је према степену пролиферације алогених CD4^+ Т лимфоцита периферне крви у ко-култури са MoDC. У плочу од 96 места са „U“ дном (Sarstedt) додате су MoDC (стимулатори) у двоструко опадајућим концентрацијама ($0,5 \times 10^4$ - $0,125 \times 10^4$ /базену) и CD4^+ Т лимфоцити (респондери) у константној концентрацији од 1×10^5 /базену у финалној запремини од 200 μl . Ћелије су култивисане 5 дана у комплетном RPMI медијуму на 37°C и 5% CO_2 . 18h пре истека култивације ћелијама

је додат [³H]-тимидин у концентрацији од 1μCi/базену. Након 5 дана, ћелије су сакупљене аутоматским скидачем култура, а уградња [³H]-тимидина је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача. Резултати су приказани као индекс пролиферације који је рачунат тако што су вредности срп сваког појединачног базена у којима су инкубирани МоDC и CD4⁺T лимфоцити подељени са средњом вредношћу срп базена у којима су инкубирани само CD4⁺T лимфоцити.

Мерење степена NEToze хуманих неутрофила периферне крви in vitro

Интензитет NEToze је мерен на основу флуориметријске методе Vong и сар. (2013) са мањим модификацијама. Метода се заснива на мерењу количине екстрацелуларне DNK, која је сразмерна интензитету NEToze, користећи PI, ћелијски непропустљиву, флуоресцентну боју која се везује за DNK. Неутрофили су распоређени у црној плочи од 96 места са равним дном (Costar, Њујорк, САД) у концентрацији од 1x10⁵/базену/200μl HBSS⁺ медијума (табела 5). Поједине комбинације неутрофила су најпре преинкубирани са 10-HDA (0,5mM-2mM) у трајању од 30 минута на 37°C. Након ове преинкубације ћелије су стимулисане PMA (48nM) у циљу индуковања NEToze. У одређене базене је додат Triton X-100 како би се измерила количина укупне DNK. Након 2h инкубације на 37°C, у инкубатору за културе ћелија, у присуству 5% CO₂, у одговарајуће базене је додата DNKaza и инкубација је настављена још 45 минута под истим условима. Након тога је у све базене додат PI (20μg/ml). Интензитет флуоресценце је прочитан после 15 минута на читачу за микроплоче (Synergy HT, BIO-ТЕК, Вермонт, САД).

Количина екстрацелуларне DNK (изражена као проценат тоталне DNK) је израчуната на основу следеће једначине (приказан је пример са PMA где је ИФ=интензитет флуоресценце; Неут=неутрофили)

Процент тоталне DNK

$$= \frac{\text{ИФ (Неут + PMA)} - \text{ИФ (Неут + PMA + DNKaza)}}{\text{ИФ (Неутрофили + Triton X - 100)}} \times 100$$

Табела 5. Начин поставке културе неутрофила приликом одређивања степена NEToze

	Неутрофили (1×10^6 /ml)	Triton X-100 (1%)	10-HDA (0.5mM- 2mM)	PMA (50nM)	DNKaza (20 U/ μ L)	PI (20 μ g/ml)
Неутрофили	✓					✓
Неутрофили + DNKaza	✓				✓	✓
Неутрофили + Triton X- 100	✓	✓				✓
Неутрофили + PMA	✓			✓		✓
Неутрофили + PMA + DNKaza	✓			✓	✓	✓
Неутрофили + 10-HDA + PMA	✓		✓	✓		✓
Неутрофили + 10-HDA + PMA + DNKaza	✓		✓	✓	✓	✓
Неутрофили + 10-HDA	✓		✓			✓
Неутрофили + 10-HDA + DNKaza	✓		✓		✓	✓

Визуелизација NEToze коришћењем PI

Неутрофили су засејани у плочу од 24 места (Sarstedt) у којој су претходно постављене „coverslip“ плочице пречника 13mm (Sarstedt) у концентрацији од 1×10^5 /базену у 1ml HBSS⁺ медијума. Након 30 минута преинкубације са 10-HDA (2mM) на 37°C, ћелије су стимулисане PMA (48nM) и инкубиране 4h на 37°C. По истеку инкубације ћелије су фиксиране у 4% формалину раствореном у фосфатном пуферу и обојене PI (20 μ g/ml). Препарати су посматрани на флуоресцентном микроскопу (Nikon Eclipse 5i equipped with a Nikon DXM1200C Camera, Токио, Јапан) при увећању објектива 20X.

Мерење интензитета оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви методом хемилуминисценције помоћу луминола

Неутрофили периферне крви су постављени у беле плоче од 96 места са равним дном (Costar) у концентрацији $2,5 \times 10^5$ /базену у 200 μ l HBSS медијума. Ћелије су пре-инкубиране у присуству растућих концентрација 10-HDA (0,05mM-2mM) и луминолом (50 μ M), 30 минута на 37°C. Након тога су стимулисане PMA (16nM), OpZy (10 μ g/ml) или fMLP (1 μ M). Одмах након стимулације мерен је интензитет емитоване светлости, који је пропорционалан синтетисаним реактивним кисеоничним врстама, током 60 минута помоћу хемилуминисцентног спектрометра (Synergy HT).

Мерење интензитета оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви колориметријски помоћу NBT теста

Потенцијал стварања $O_2^{\cdot -}$ у неутрофилима је одређиван NBT тестом. Неутрофили периферне крви су постављени у плоче од 96 места са равним дном (Sarstedt) у концентрацији $2,5 \times 10^5$ /базену у 200 μ l HBSS медијума. Ћелије су пре-инкубиране у присуству различитих концентрација 10-HDA (0,25mM-2mM), 30 минута на 37°C. Након тога су стимулисане PMA (16nM), OpZy (10 μ g/ml) или fMLP (1 μ M). Истовремено са стимулусима у ћелијске културе је додат NBT у финалној концентрацији од 0.5 mg/ml. Ћелије су затим инкубиране на 37°C наредних 90 минута у инкубатору за културе ћелија. У току инкубације настала је редукција жуто обојеног NBT-а у дифорамазан. Реакција редукције NBT-а је заустављена додавањем раствора SDS-HCl у коме се настали диформазон раствара. Интезитет растворене боје, који је директно сразмеран активности NADPH оксидазе, мерен је на спектрофотометру на таласној дужини од 570nm (референтна 650nm).

Мерење интензитета оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви флуориметријском методом помоћу DHR-а

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила помоћу DHR-а спроведено је применом раније описане цитофлуориметријске методе (Chen и Junger, 2012). Укратко: неутрофили (1×10^6 /ml у HBSS медијуму) су, након пре-

инкубације од 30 минута на 37°C са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM - 2mM), инкубиране у присуству PMA (16nM), OpZy (10µg/ml) или fMLP-ом (1µM) и DHR (10µM) током 15 минута (PMA и fMLP) или 30 минута (OpZy) на 37°C. Након инкубације ћелије су инкубиране на леду 10 минута, испране у хладном PBS и фиксиране у 0,5% формалдехиду у фосфатном пуферу. Интензитет флуоресценце је мерен на проточном цитофлуориметру (Cube 6).

Мерење интензитета оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви флуориметријском методом помоћу DCFH-DA

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила помоћу DCFH-DA урађено је на основу раније описане методе (Cossarizza и сар., 2009). Неутрофили (10×10^6 /ml у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству DCFH-DA (1µM) на 37°C, а затим испрани у HBSS. Такви „обојени“ неутрофили (1×10^6 /ml у HBSS медијуму) су пре-инкубирани 30 минута на 37°C у присуству различитих концентрација 10-HDA (0,5mM-2mM), а потом стимулирани PMA (16nM), OpZy (10µg/ml) или fMLP (1µM). Након инкубације од 30 минута на 37°C, ћелије су испране у хладном PBS-у, а интензитет флуоресценце је мерен одмах на проточном цитофлуориметру (Cube 6).

Одређивање концентрације цитокина

Концентрације свих испитиваних цитокина су одређиване употребом комерцијалних сендвич ELISA китова према упутствима произвођача.

Цитокини су одређивани у супернатантима култура PBMNC након 72h култивације у присуству или одсуству различитих концентрација 10-HDA (10µM-500µM) и РНА (30µg/ml) као стимулусом. Одређиване су концентрације IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, IL-1β, IL-6 и TNF-α (R&D Systems, Минеаполис, САД).

Такође, цитокини су одређивани и у супернатантима култура MoDC након 48h култивације у присуству или одсуству различитих концентрација 10-HDA (50µM и 500µM) и LPS (1µg/ml) као стимулусом. Одређивана је концентрација IL-12p70, IL-18, IL-10, IL-23 и TNF-α (R&D Systems).

У циљу сагледавања како 10-HDA интерферира са сигналним механизмима који су укључени у продукцију цитокина од стране МоDC, културе незрелих МоDC (1×10^5 /базену у плочи од 96 места са равним дном) су инкубиране са инхибитором NF- κ B (BAY11-7082) и инхибитором PI3K (LY294002) 30 минута, на 37°C а затим стимулисане LPS (1 μ g/ml) у присуству или одсуству 10-HDA (500 μ M). После 48h инкубације на 37°C супернатанти су сакупљени и коришћени за одређивање концентрације IL-12p70 и TNF- α .

Способност МоDC, претходно третираних различитим концентрацијама 10-HDA (50 μ M и 500 μ M), у усмеравању Т ћелијског имунског одговора одређивана је мерењем концентрација карактеристичних цитокина из супернатаната ко-култура МоDC и алогених CD4⁺T лимфоцита периферне крви: IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-17A (R&D Systems), IL-4 (Invitrogen). Укратко у плочу од 96 места са „U“ дном (Sarstedt) додате су МоDC (стимулатори) у двострукооппадајућим концентрацијама од 1×10^4 - 0.125×10^4 /базену и CD4⁺T лимфоцити (респондери) у константној концентрацији од 1×10^5 /базену у финалној запремини од 200 μ l. Ћелије су култивисане 5 дана у комплетном RPMI медијуму на 37°C и 5% CO₂. Током последњих 8 сати култивације ћелијама су додати PMA (30nM) и јономицин (670nM; Sigma). Супернатанти ових култура су сакупљени и чувани на -20°C до одређивања концентрације цитокина.

Процењивање способности „сакупљања“ реактивних кисеоничних врста

Процена способности „сакупљања“ супероксид анјон радикала

Метода је урађена као што је описано у раду (Gomes и сар., 2007) са мањим модификацијама. O₂⁻ је синтетисан коришћењем NADH/PMS система, а способност „сакупљања“ односно „хватања“ је процењена спектрофотометријски на читачу микроплоча мерењем ефекта 10-HDA на редукцију NBT индуковану O₂⁻ на 560nm после 5 минута инкубације. Реакциона смеша се састојала из следећих реагенаса са приказаним финалним концентрацијама. NADH (166 μ M), NBT (43 μ M), 10-HDA (0,5mM-4mM) и PMS (2.7 μ M) (Sigma). NADH, NBT и PMS су растворени у 19mM фосфатном пуферу, рН 7,4. Као позитивна контрола коришћен је витамин С.

Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) редукције NBT до диформаза \pm SD из три независна експеримента.

Процена способности „сакупљања“ водоник пероксида

Способност „сакупљања“ H_2O_2 је процењена на основу мерења степена оксидације луминола индукованог H_2O_2 користећи претходно описане методе (O'Dowd и сар., 2004, Gomes и сар., 2007) са мањим модификацијама. Есеј је рађен у белој микротитарској плочи са 96 места, а реакциона смеша се састојала из следећих реагенаса са приказаним финалним концентрацијама: 50mM фосфатни пуфер, pH 7,4, луминол (50 μ M), 10-HDA (0,5mM-4mM) и 1% H_2O_2 . Као позитивна контрола коришћен је витамин С. Промена интензитета хемилуминисценце је мерена на читачу за микроплоче (Synergy HT) у трајању од 20 минута. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) оксидације луминола \pm SD из три независна експеримента.

Процена способности „сакупљања“ HOCl

Способност „сакупљања“ HOCl је мерена на основу претходно описане флуориметријске методе (Gomes и сар., 2007) која се заснива на мерењу степена HOCl-индуковане оксидације DHR до родамина 123. Есеј је рађен у црној микротитарској плочи са 96 места, а реакциона смеша се састојала из следећих реагенаса са приказаним финалним концентрацијама: 100mM фосфатни пуфер, pH 7,4, 10-HDA (0,5mM-4mM), DHR (5 μ M) и HOCl (5 μ M). Као позитивна контрола коришћен је витамин С. Интензитет флуоресценце је мерен на читачу за микроплоче (ексцитација 480nm/емисија 520nm) (Synergy HT) после 5 минута инкубације. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) оксидације DHR \pm SD из три независна експеримента.

Одређивање концентрације укупног глутатиона

Концентрација укупног глутатиона (редуковани и оксидовани глутатион) је одређивана на основу методе која је детаљно описана у раду Rahman и сар. (2006). Ова метода се заснива на реакцији глутатиона са DTNB при чему настају TNB (енгл.

5-thio-2-nitrobenzoic acid), који има максимум апсорбанце на 412nm и глутатион-ТНВ адукт. Брзина формирања ТНВ је пропорционална концентрацији глутатиона у узорку. Ензим глутатион редуктаза редукује дисулфидни продукт глутатион-ТНВ у присуству NADPH, рециклирајући притом глутатион. С обзиром да глутатион редуктаза редукује и оксидовани глутатион формирајући 2 молекула редукованог глутатиона, количина измереног глутатиона представља суму редукованог и оксидованог глутатиона, односно укупни глутатион.

Неутрофили ($1,5 \times 10^6$ /базену у слабоадхерентној плочи од 24 места (Sarstedt)) су, после преинкубације од 30 минута на 37°C са различитим концентрацијама 10-NDA (0,5mM-2mM), стимулирани PMA (16nM), OpZy (10µg/ml) или fMLP (1µM). После 2h инкубације ћелије су сакупљене, испране у хладном PBS-у, ресуспендоване у 500µl екстракционог пуфера и сонификоване ултразвучним сонификатором 6 пута по 30 секунди. Затим је хомогенат подвргнут циклусу смрзавања на -70°C и одмрзавања како би се осигурала деструкција ћелијских мембрана, а након тога уследило је центрифугирање на 5000 rpm 4 минута при температури од +4°C. Супернатант је коришћен за одређивање концентрације глутатиона.

Процедура је рађена тако што је по 20µl узорка у трипликатима додато у провидну микротитарску плочу од 96 места (Sarstedt) као и по 20µl опадајућих концентрација стандарда (редуковани глутатион: 26,4nM/ml–0.103nM/ml). Затим је у сваки базен додато по 120µl раствора који садржи DTNB (0,67mg/ml) и глутатион редуктазу (3,33U/ml) у односу 1:1. После 30 секунди дадато је по 60µl NADPH (0,67mg/ml; Merck) и одмах је почело читање апсорбанце на 412nm на сваких 10 секунди у току 3 минута. Затим је израчуната промена апсорбанце у минути (брзина настанка ТНВ) за сваки базен, а помоћу тих вредности је нацртана стандардна крива и израчуната концентрација глутатиона у узорку. Све супстанце коришћене у методи су растворене у KPE пуферу.

Статистичка обрада података

За статистичку анализу коришћени су Student-ов t тест и једноструки ANOVA тест са Dunnett пост тестом. Вредности добијених података су сматране статистички значајним уколико је $p < 0,05$. Статистичка обрада података урађена је помоћу

статистичког програма GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Сан Дијего, САД).

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) из најмање три независна експеримента.

Резултати

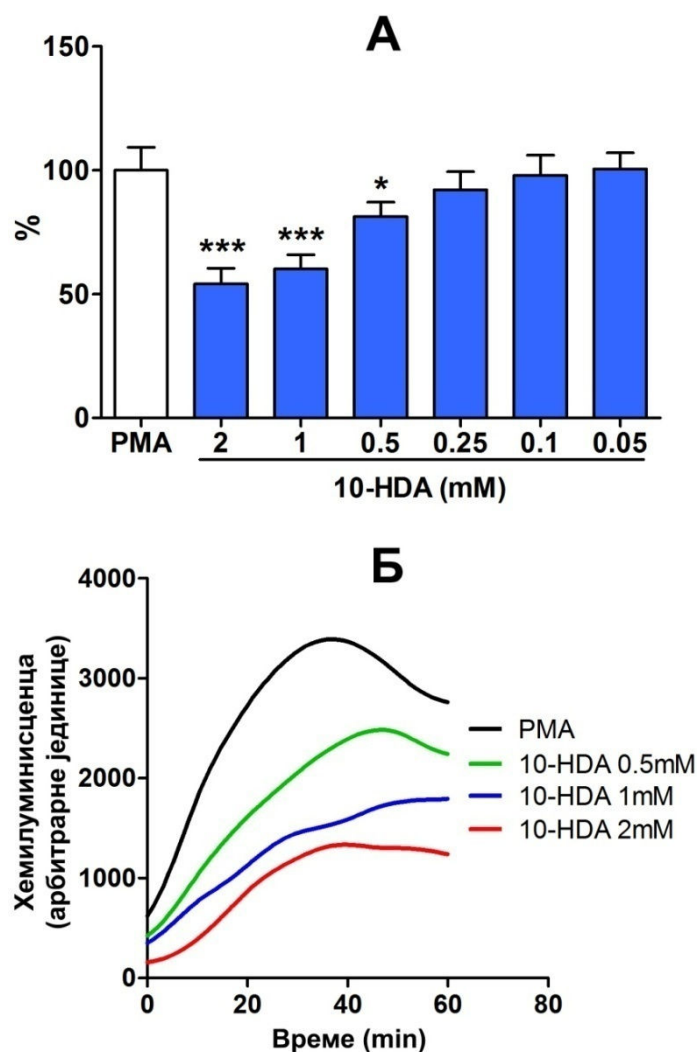
Утицај 10-HDA на функцију хуманих неутрофила периферне крви

Ефекат 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила

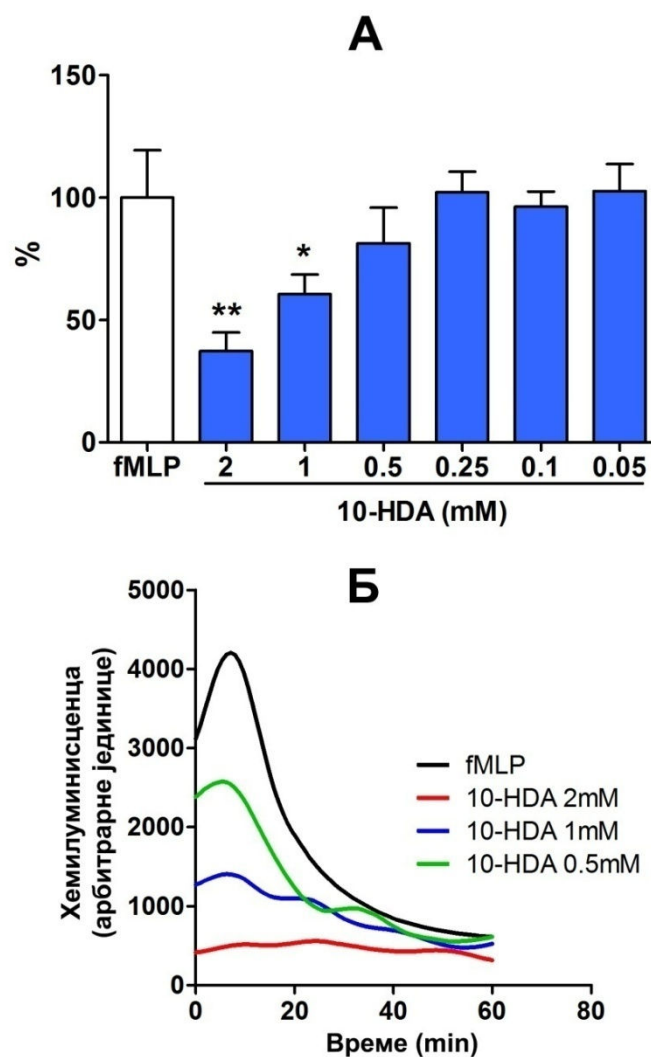
Утицај 10-HDA на оксидативни прасак неутрофила је испитиван методом хемилуминисценце помоћу луминола, која може да детектује интрацелуларну и екстрацелуларну продукцију различитих реактивних кисеоничних врста. Добијени резултати су показали да 10-HDA у концентрацијама од 0,5-2mM смањује продукцију реактивних кисеоничних врста у неутрофилима стимулираним РМА (16nM) (графикон 1). Сличан инхибиторни ефекат 10-HDA у концентрацијама од 1mM и 2mM је потврђен кад су као стимулуси за активацију неутрофила коришћени fMLP (графикон 2) и opZy (графикон 3).

С обзиром да луминол неспецифично реагује са различитим реактивним кисеоничним врстама, желели смо да проверимо како 10-HDA утиче на продукцију појединачних реактивних кисеоничних врста, као што су $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $HOCl$, у неутрофилима. Стога смо користили специфичне методе за детекцију појединих реактивних кисеоничних врста. Интрацелуларну продукцију $O_2^{\cdot-}$ смо мерили колориметријски помоћу NBT теста.

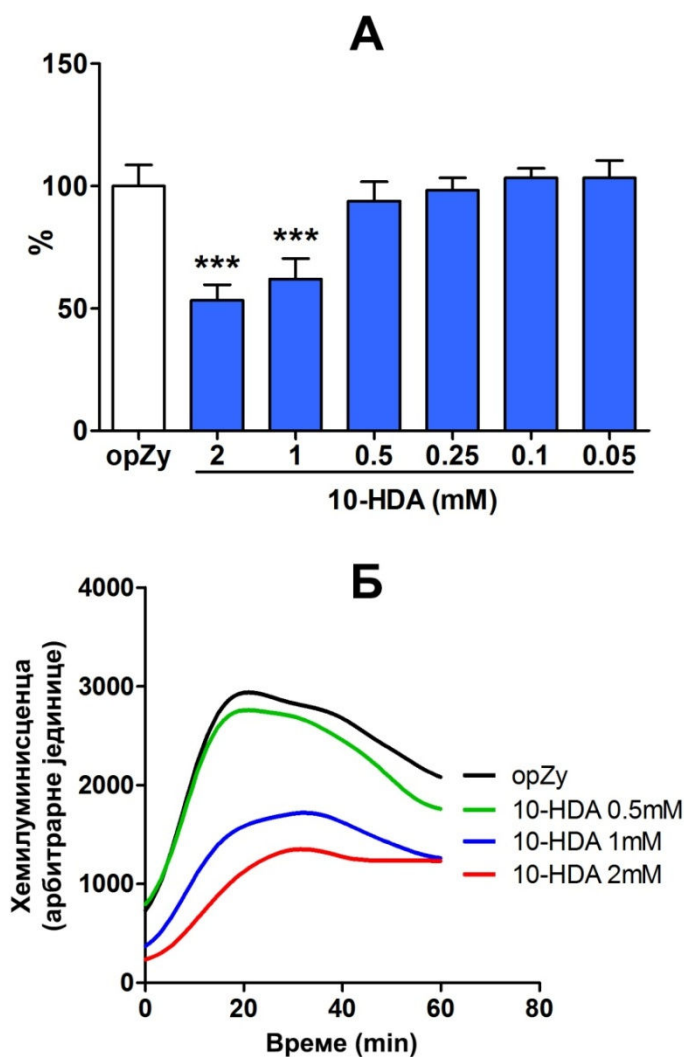
Резултати приказани на графикону 4. показују да 10-HDA (1mM и 2mM) дозно зависно смањује интрацелуларну продукцију $O_2^{\cdot-}$ у неутрофилима стимулираним РМА (16nM), fMLP (1 μ M) и opZy (10 μ g/ml). Такође, слично као у есеју са луминолом 10-HDA у концентрацији од 0,5mM је статистички значајно смањила продукцију $O_2^{\cdot-}$ само код неутрофила стимулираних РМА (16nM).



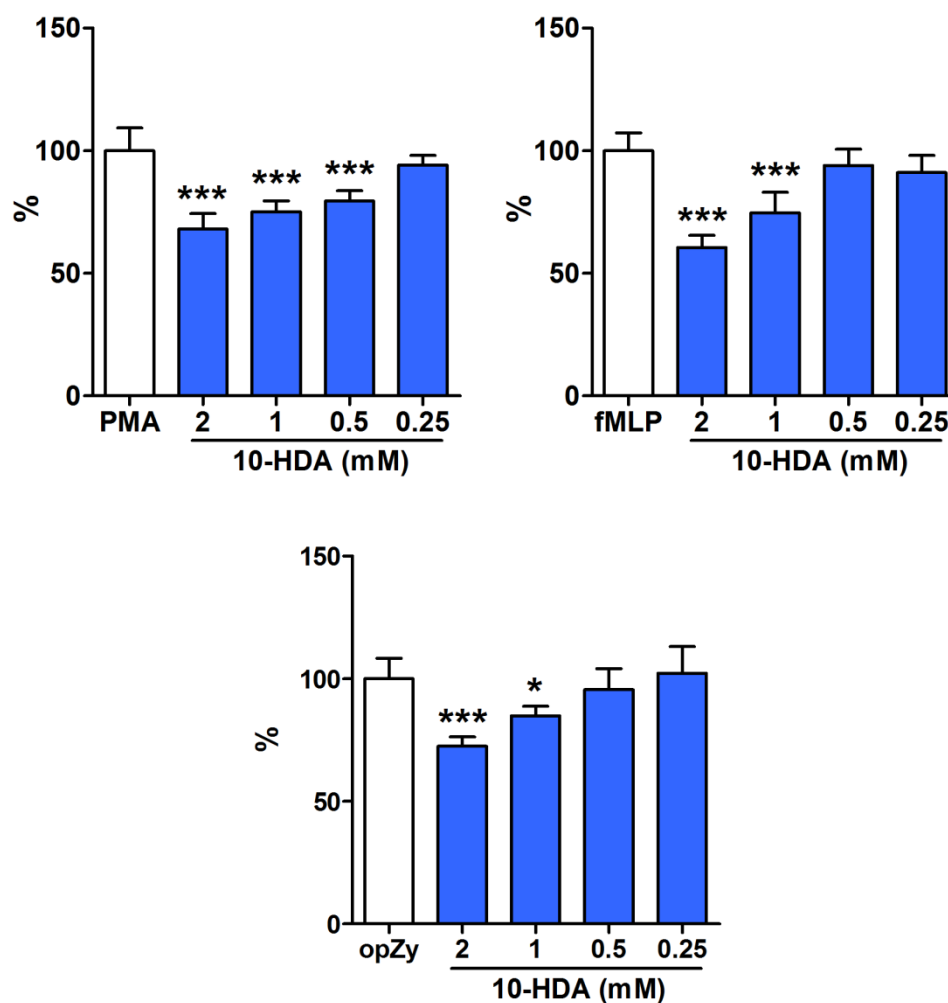
Графикон 1. Ефекат 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних РМА. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после пре-инкубације од 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,05mM-2mM) и луминолом ($50 \mu\text{M}$) стимулирани РМА (16nM) као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Одмах након стимулације почело је мерење интензитета емитоване светлости која је пропорционална синтетисаним реактивним кисеоничним врстама. **(А)** Приказана је средња вредност релативног интензитета продукције реактивних кисеоничних врста у односу на контролу ($100\% \pm \text{SD}$) из три независна експеримента. $*p < 0,05$; $***p < 0,001$. **(Б)** Графички приказ резултата једног репрезентативног експеримента, са читавањем луминисценце на сваких 50 секунди у току 60 минута. Криве су добијене из средњих вредности 8 суседних тачака.



Графикон 2. Ефекат 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после пре-инкубације од 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,05mM-2mM) и луминолом (50 μM) стимулирани fMLP (1 μM) као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Одмах након стимулације почело је мерење интензитета емитоване светлости која је пропорционална синтетисаним реактивним кисеоничним врстама. **(А)** Приказана је средња вредност релативног интензитета продукције реактивних кисеоничних врста у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента $p < 0,05$; $**p < 0,01$. **(Б)** Графички приказ резултата једног репрезентативног експеримента, са читавањем луминисценце на сваких 50 секунди у току 60 минута. Криве су добијене из средњих вредности 8 суседних тачака.

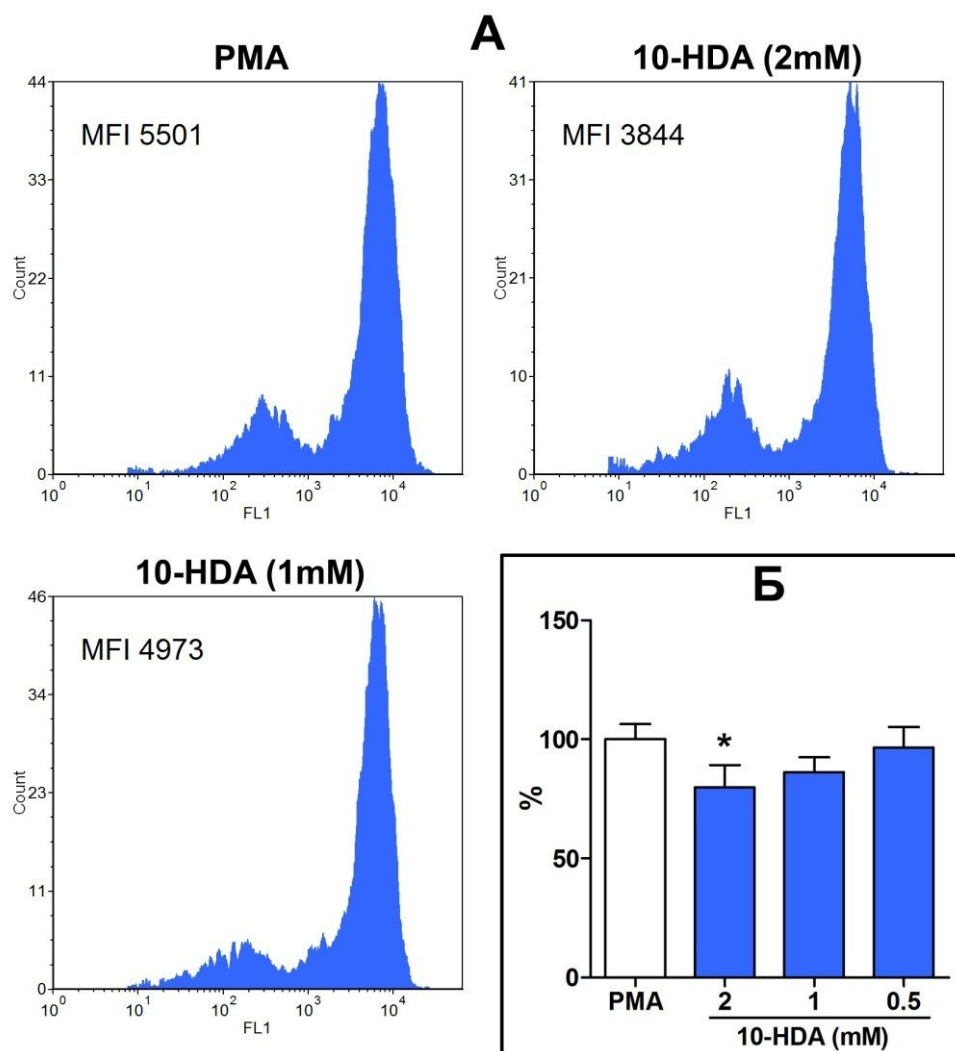


Графикон 3. Ефекат 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила стимулираних opZy. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после пре-инкубације од 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,05mM-2mM) и луминолом ($50 \mu\text{M}$) стимулирани opZy ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Одмах након стимулације почело је мерење интензитета емитоване светлости која је пропорционална синтетисаним реактивним кисеоничним врстама. **(А)** Приказана је средња вредност релативног интензитета продукције реактивних кисеоничних врста у односу на контролу ($100\% \pm \text{SD}$) из три независна експеримента.*** $p < 0,001$. **(Б)** Графички приказ резултата једног репрезентативног експеримента, са читавањем луминисценце на сваких 50 секунди у току 60 минута. Криве су добијене из средњих вредности 8 суседних тачака.

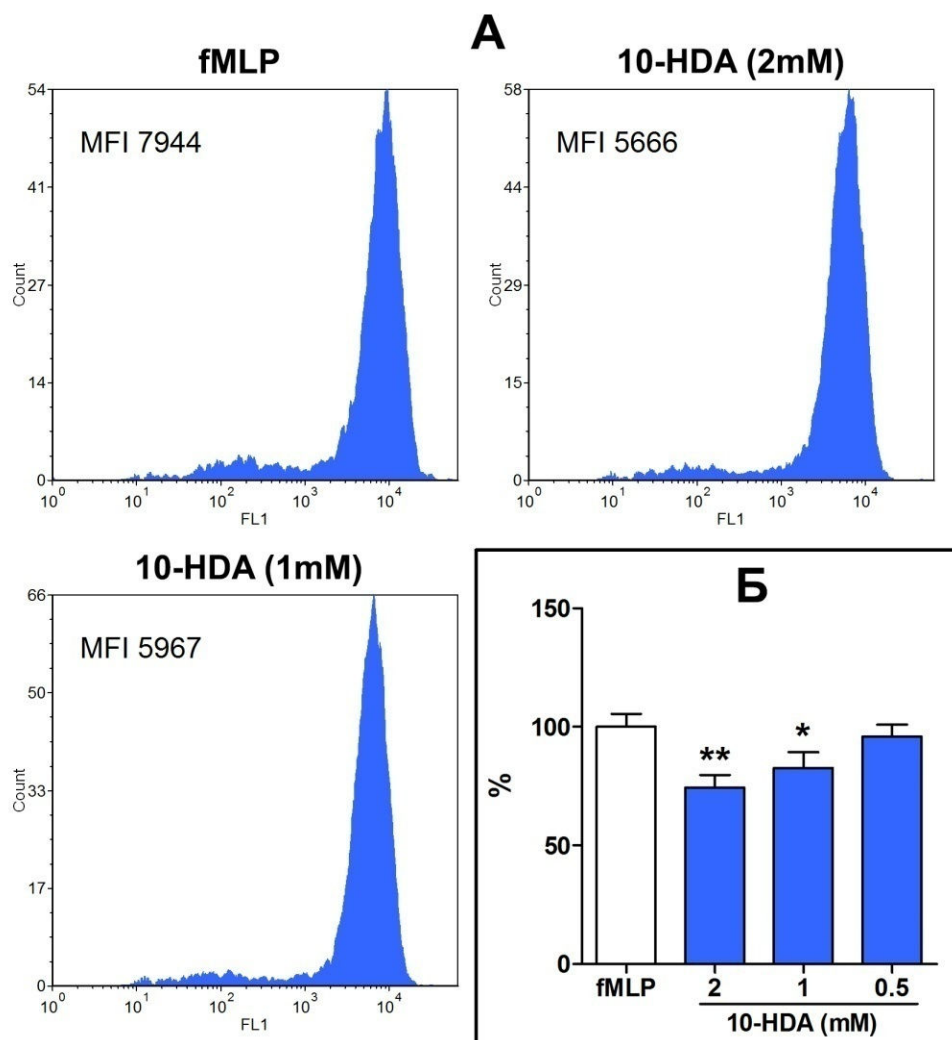


Графикон 4. Ефекат 10-HDA на продукцију $O_2^{\cdot-}$ од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA (A), fMLP (Б) и opZy (В). Неутрофили ($1 \times 10^6/ml$ у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству различитих концентрација 10-HDA (0,25mM-2mM) у микротитарским плочама са 96 места. Затим су им додати стимулуси (PMA (16nM), fMLP (1 μ M) или opZy (10 μ g/ml)) и NBT (0,5 mg/ml). Након 2h инкубације и центрифугирања микротитарске плоче, супернатант је сакупљен и издвојен, а на талог је додат SDS-HCl како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Интезитет растворене боје је мерен на спектрофотометру на таласној дужини од 570nm (референтна 650nm). На графикону су приказане средње вредности продукције $O_2^{\cdot-}$ у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

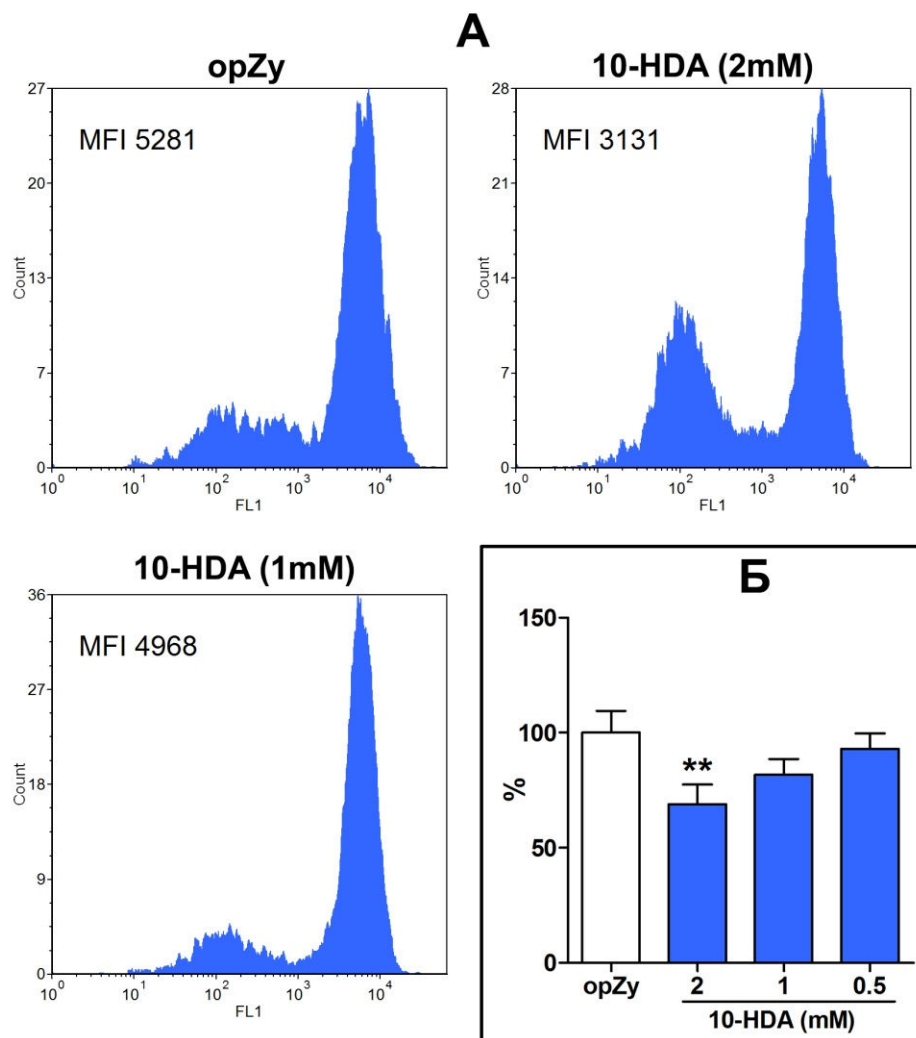
Даљи увид у ефекат 10-HDA на продукцију осталих реактивних кисеоничних врста испитан је цитофлуориметријом помоћу DCFH-DA, флуоресцентне боје којом се интрацелуларно могу детектовати H_2O_2 и хидроксилни радикал (HO^\bullet), као и поједине реактивне врсте азота (Freitas и сар., 2009). Као што се може уочити на графиконима 5, 6 и 7, 10-HDA је само у највећој примењеној концентрацији (2mM) смањила количину продукованих реактивних кисеоничних врста у хуманим неутрофилима стимулираних PMA (16nM) и opZy (10 μ g/ml), док остале примењене концентрације (0,5mM и 1mM) нису имале ефекта. Такође, 10-HDA је потентније инхибирала продукцију реактивних кисеоничних врста, који се детектују овом методом, код неутрофила стимулираних fMLP (1 μ M), јер је и концентрација од 1mM имала статистички значајан ефекат (графикон 6). Готово идентични резултати су добијени применом цитофлуориметријске методе са другом флуоресцентном бојом, DHR која специфично реагује са H_2O_2 и HOCl (Freitas и сар., 2009) (графикони 8, 9, и 10).



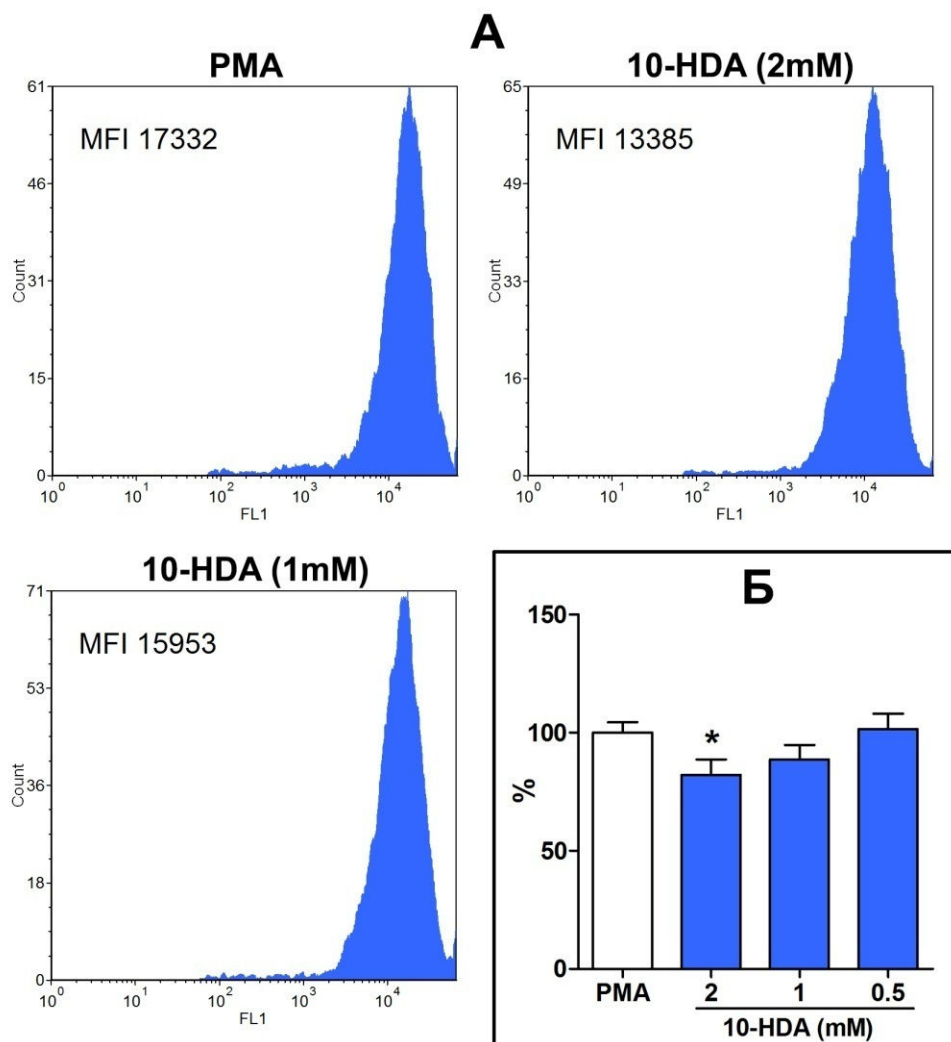
Графикон 5. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и NO^\bullet од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству DCFH-DA ($1 \mu\text{M}$) на 37°C . После испирања у HBSS, ћелије су преинкубирани 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C , а затим стимулиране PMA (16nM). Након тога ћелије су испране у хладном PBS, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (A) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$



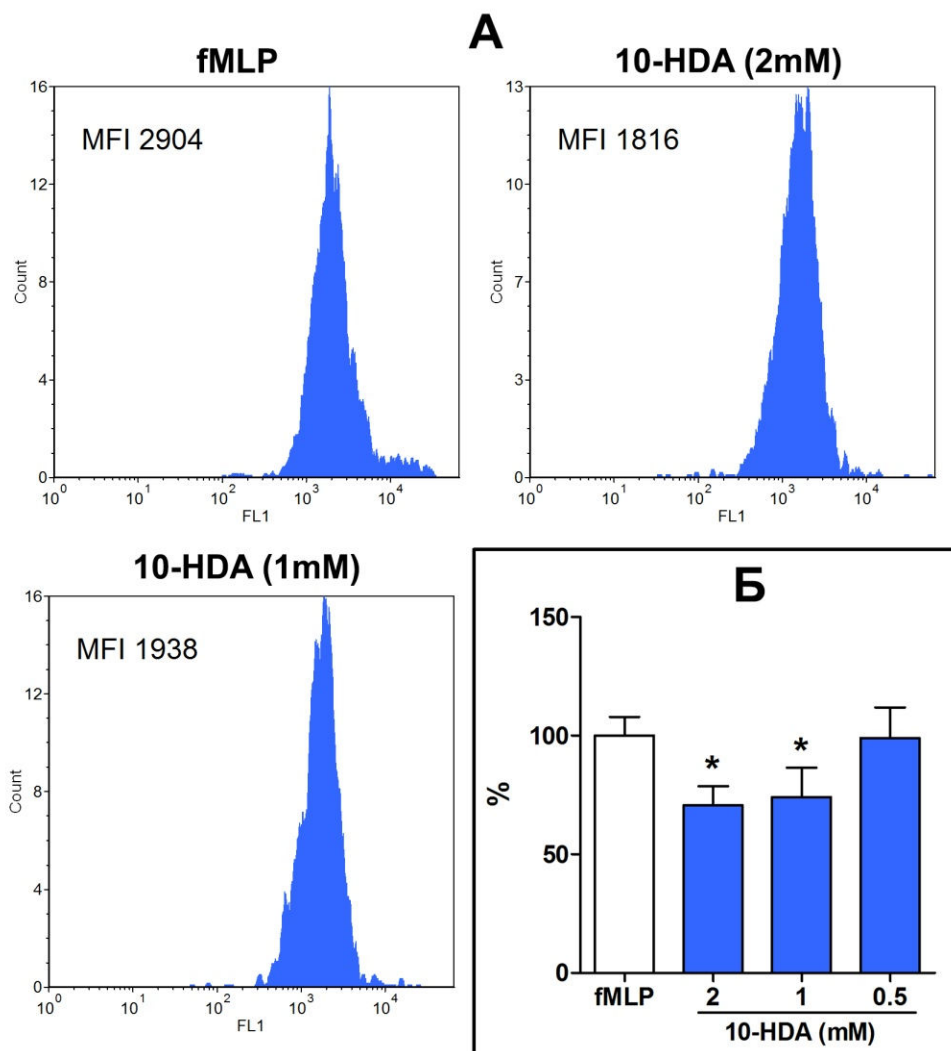
Графикон 6. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и NO^\bullet од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству DCFH-DA ($1 \mu\text{M}$) на 37°C . После испирања у HBSS, ћелије су преинкубирани 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C , а затим стимулиране fMLP ($1 \mu\text{M}$). Након тога ћелије су испране у хладном PBS, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (А) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



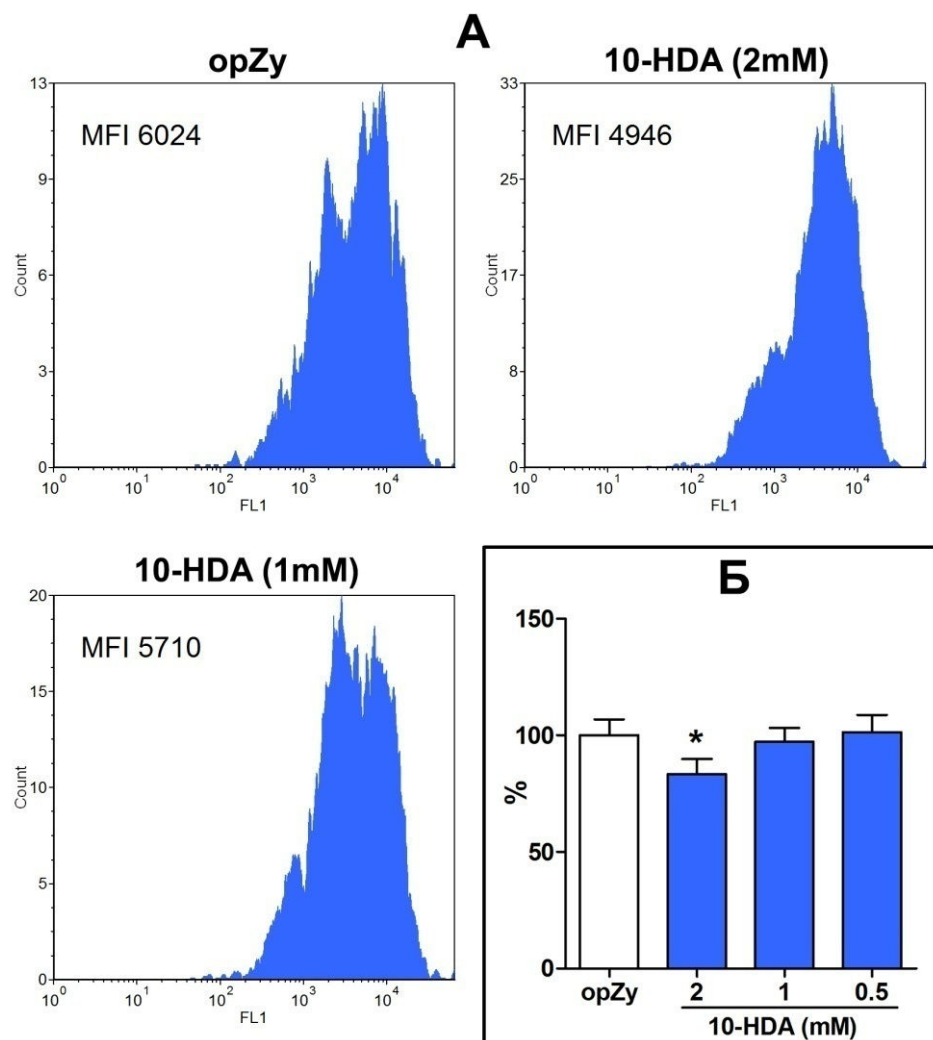
Графикон 7. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и HO^\bullet од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних opZy. Неутрофили ($1 \times 10^6/ml$ у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству DCFH-DA ($1 \mu M$) на $37^\circ C$. После испирања у HBSS, ћелије су пре-инкубирани 30 минута са 10-HDA ($0,5mM$ - $2mM$) на $37^\circ C$, а затим стимулиране opZy ($10 \mu g/ml$). Након тога ћелије су испране у хладном PBS, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (А) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу ($100\% \pm SD$) из три независна експеримента. ****** $p < 0,01$



Графикон 8. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и НОCl од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после преинкубације од 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C третиране PMA (16nM) и DHR ($10\mu\text{M}$). После 15 минута на 37°C ћелије су стављене на лед у трајању од 10 минута, испране у хладном PBS и фиксирани у 0,5% формалдехиду, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (A) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$



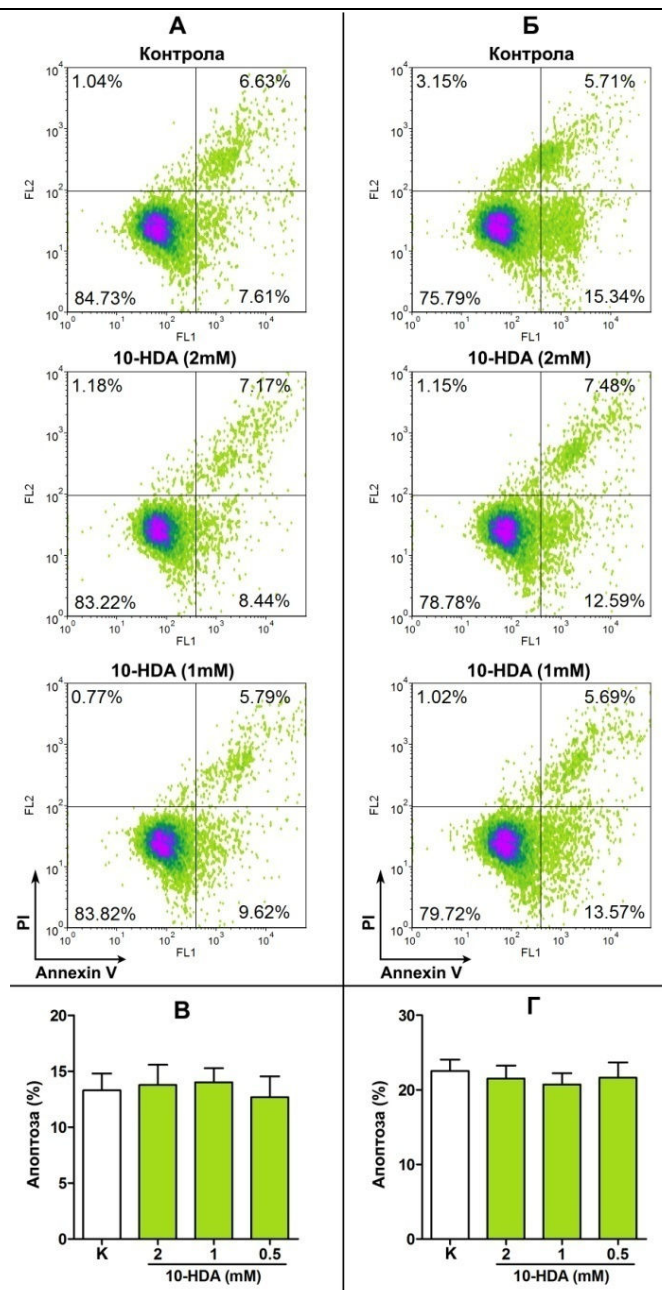
Графикон 9. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и NOCl од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после преинкубације од 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C третиране fMLP ($1\mu\text{M}$) и DHR ($10\mu\text{M}$). После 15 минута на 37°C ћелије су стављене на лед у трајању од 10 минута, испране у хладном PBS и фиксирани у 0,5% формалдехиду, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (А) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$



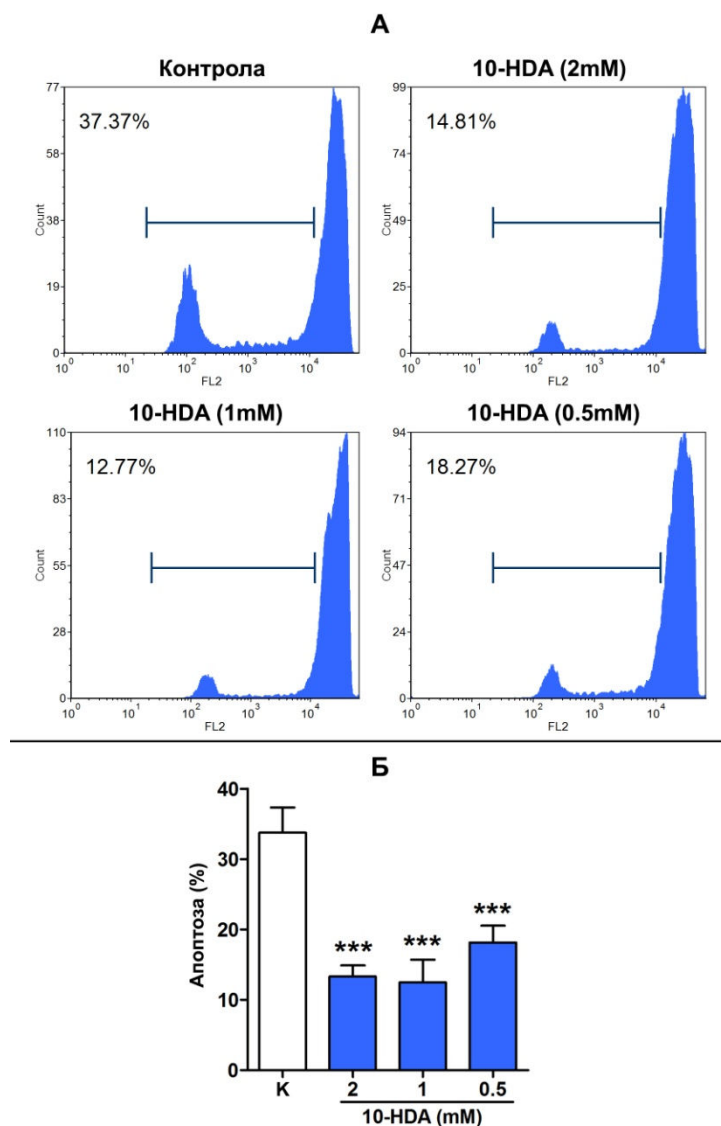
Графикон 10. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и HOCl од стране хуманих неутрофила периферне крви стимулираних *opZy*. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после преинкубације од 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C третиране *opZy* ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) и DHR ($10\mu\text{M}$). После 30 минута на 37°C ћелије су стављене на лед у трајању од 10 минута, испране у хладном PBS и фиксирани у 0,5% формалдехиду, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом како је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказани су (A) хистограми једног репрезентативног експеримента и (Б) средње вредности MFI у односу на контролу (100%) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$

Утицај 10-HDA на спонтану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви

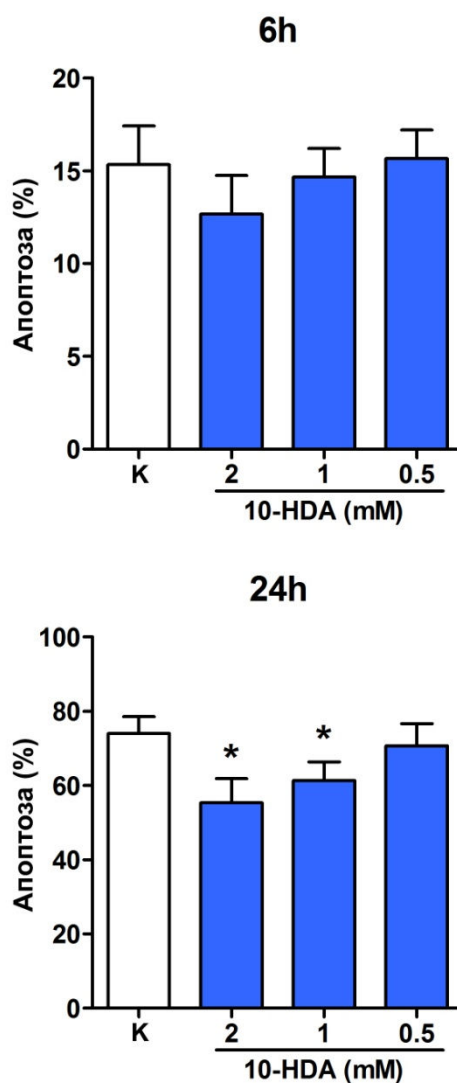
Како би искључили могућност да је ефекат 10-HDA на оксидативни прасак неутрофила последица токсичног или про-апоптотског деловања ове киселине, инкубирали смо хумане неутрофиле са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) на 37°C, а после различитих временских интервала (2h и 5h) ћелије су обележене Annexin V Alexa Fluor 488/PI. Annexin V Alexa Fluor 488 се везује за фосфатидил серин који се испољава на апоптотским ћелијама, а PI обележава некротичне ћелије (Homburg и сар., 1995). Наши резултати су показали да 10-HDA ни у једној примењеној концентрацији након 5h инкубације није токсична за хумане неутрофиле периферне крви, не индукујући ни апоптозу ни некрозу у тестираном периоду (графикон 11). Међутим, при продуженој инкубацији, од 24 часа, показано је да 10-HDA у концентрацијама од 0,5mM, 1mM и 2mM инхибира спонтану апоптозу неутрофила (графикони 12 и 13).



Графикон 11. Ефекат 10-HDA на спонтану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви након 2h и 5h. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ HBSS) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM -2mM) на 37°C , 2 часа (А, В), односно 5 часова (Б, Г). После инкубације ћелије су обележене Annexin V Alexa Fluor 488/PI и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А, Б) Различити стадијуми апоптозе неутрофила у облику хистограма једног репрезентативног експеримента. (В, Г) Графички приказ средњих вредности процента Annexin V⁺ контролних (К) и 10-HDA-третираних ћелија \pm SD из три независна експеримента.



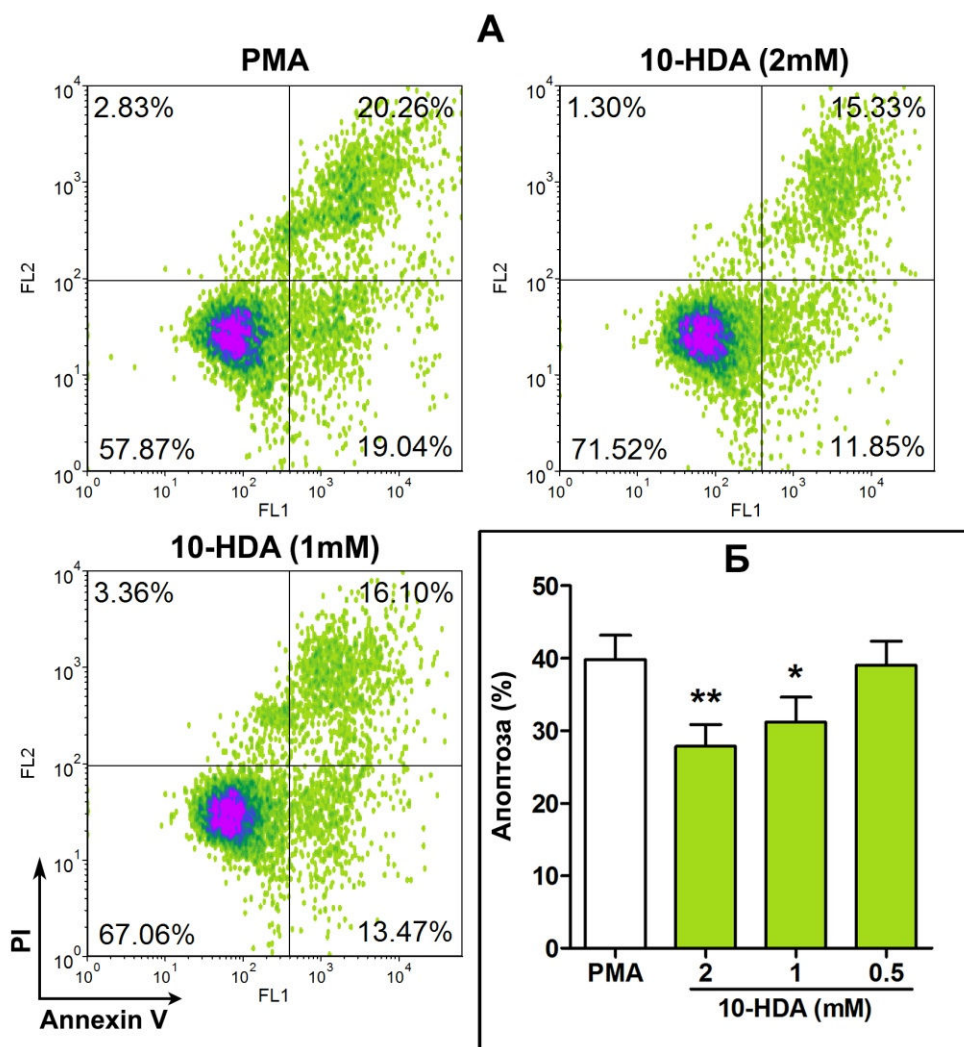
Графикон 12. Ефекат 10-HDA на спонтану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви након 24h. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM -2mM), на 37°C , 24 часа. После инкубације ћелије су обележене пропидијум јодидом у хипотонном цитратном пуферу и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Хистограми једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента апоптозе контролних (К) и 10-HDA-третираних ћелија \pm SD из три независна експеримента. *** $p < 0,001$



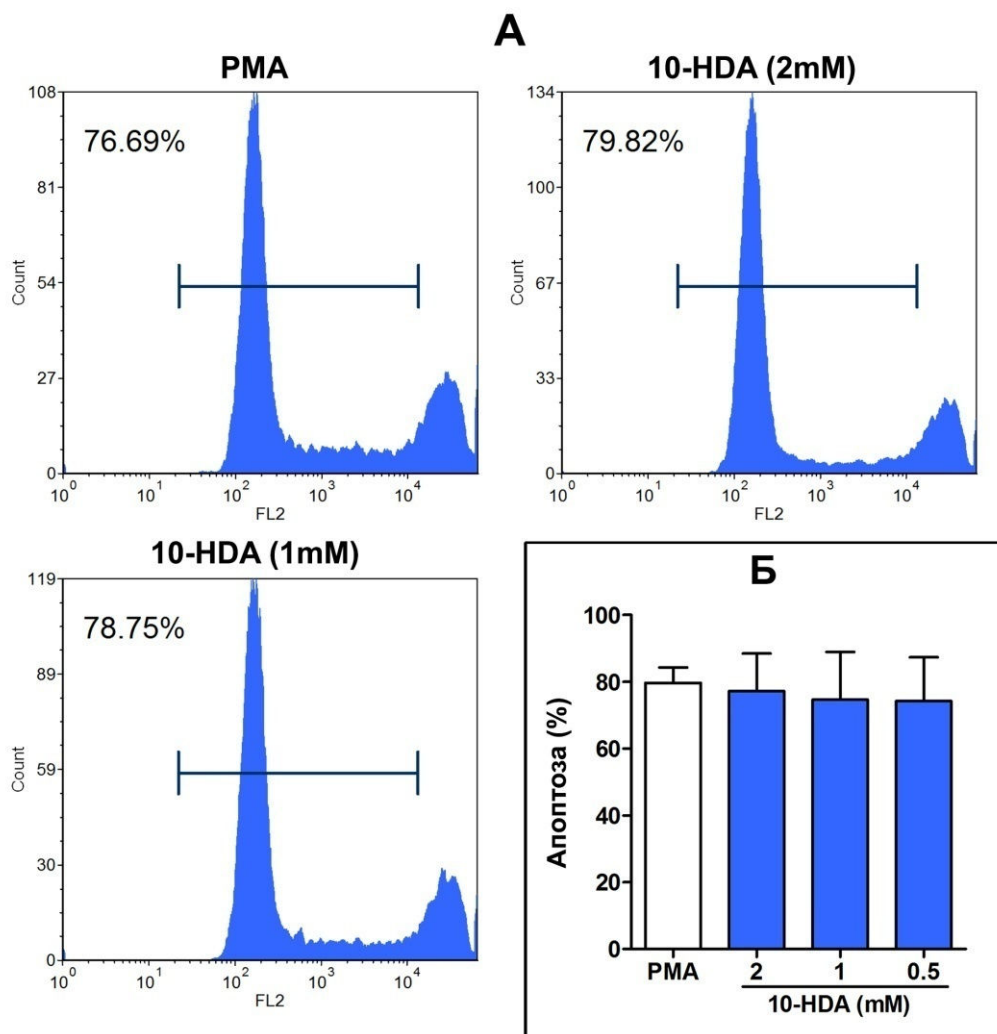
Графикон 13. Ефекат 10-HDA на спонтану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM -2mM) 6 часова, односно 24 часа на 37°C . Након инкубације ћелије су обојене Тугск-овим раствором и анализирани на светлосном микроскопу бројањем најмање 500 ћелија по препарату као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказане су средње вредности процента апоптозе контролних (K) и 10-HDA-третираних ћелија $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента. * $p < 0,05$

Утицај 10-HDA на индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви

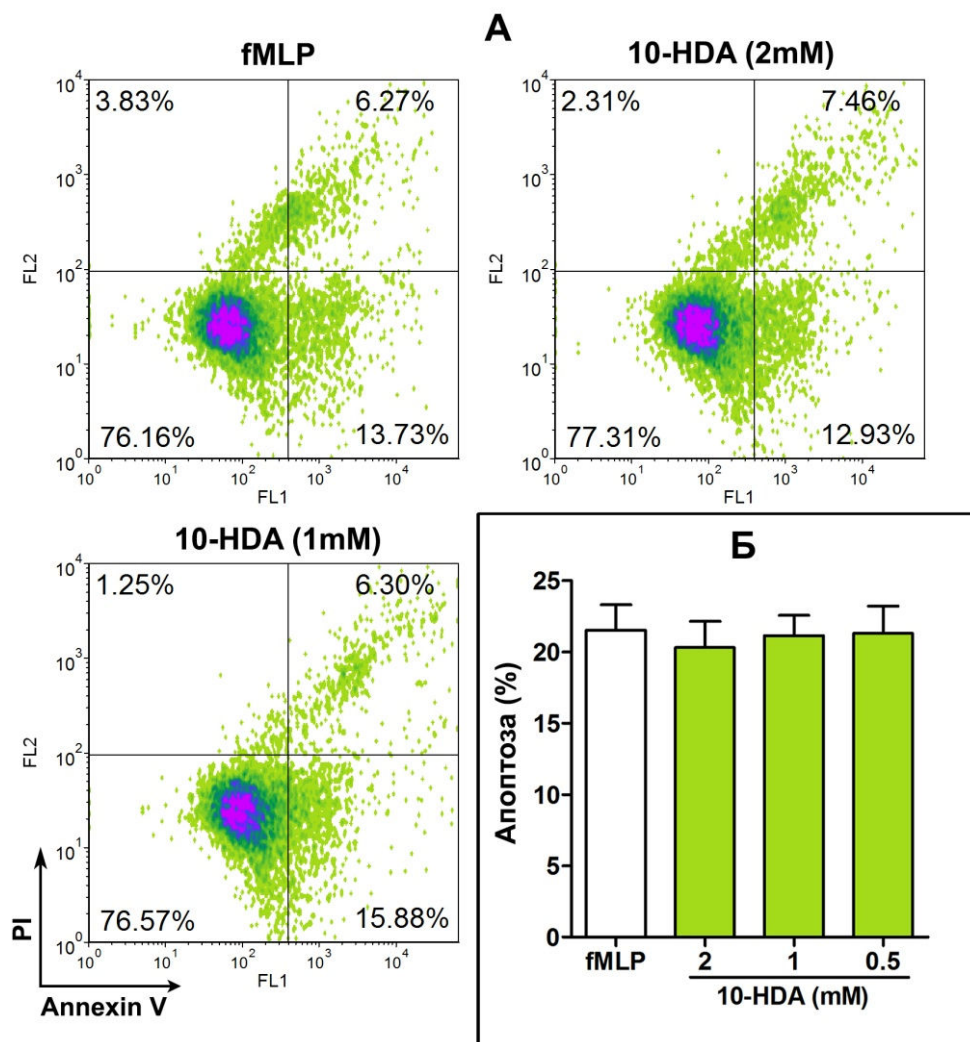
С обзиром да PMA, fMLP и opZy индукују апоптозу хуманих неутрофила у којој кључну улогу имају реактивне кисеоничне врсте, у наредном кораку смо хтели да сагледамо утицај 10-HDA на стимулисану апоптозу неутрофила. Резултати које смо добили су показали да 10-HDA (1mM и 2mM) инхибира апоптозу неутрофила индуковану PMA (16nM) у првим сатима инкубације (2h) (графикон 14). Међутим, 10-HDA после 24h није утицала на PMA-индуковану апоптозу неутрофила (графикон 15). Када је као стимулус коришћен fMLP (1 μ M), није било значајне разлике у проценту апоптозе нестимулисаних и неутрофила стимулисаних fMLP без обзира на присуство или одсуство 10-HDA током 5h инкубације (графикони 11 и 16). Истовремено, 10-HDA (1mM и 2mM) је у потпуности инхибирала апоптозу неутрофила индуковану 24h деловањем fMLP (1 μ M) (графикони 12 и 17). Ови резултати су потврђени и применом морфолошке методе одређивања апоптозе, применом T \ddot{u} rck-овог реагенса (графикон 18). Даље, показали смо да је 10-HDA у концентрацијама од 1mM и 2mM инхибирала апоптозу хуманих неутрофила индуковану opZy (10 μ g/ml) након 5h инкубације (графикони 19 и 21) и 24h инкубације (графикони 20 и 21).



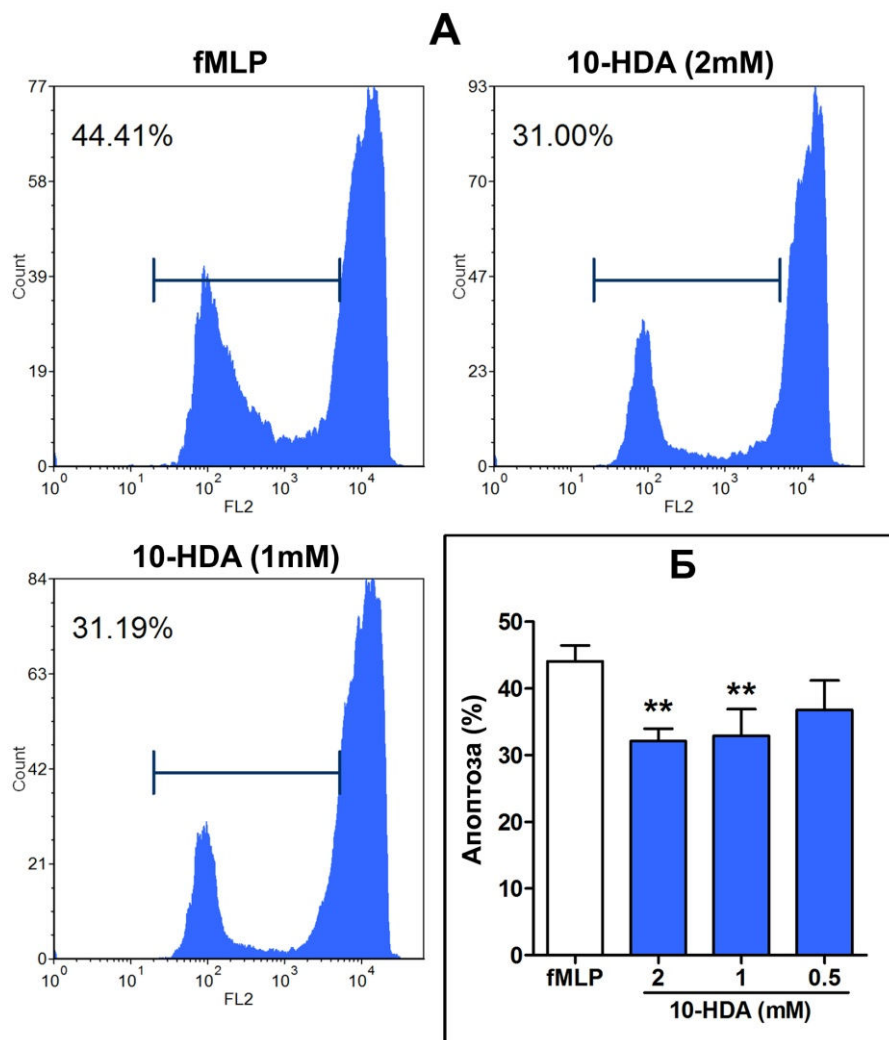
Графикон 14. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани PMA (16nM). После 2h инкубације на 37°C , ћелије су обележене Annexin V Alexa Fluor 488/PI и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Различити стадијуми апоптозе неутрофила у облику хистограма једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента Annexin V⁺ ћелија \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



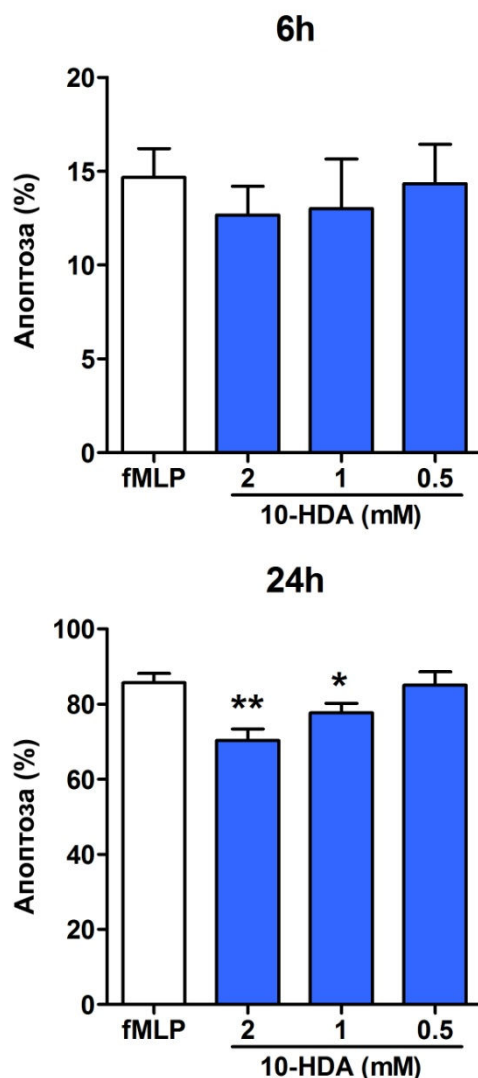
Графикон 15. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних РМА. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани РМА (16nM). Након 24h инкубације на 37°C , ћелије су обележене пропидијум јодидом у хипотонном цитратном пуферу и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Хистограми једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента апптозе $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента.



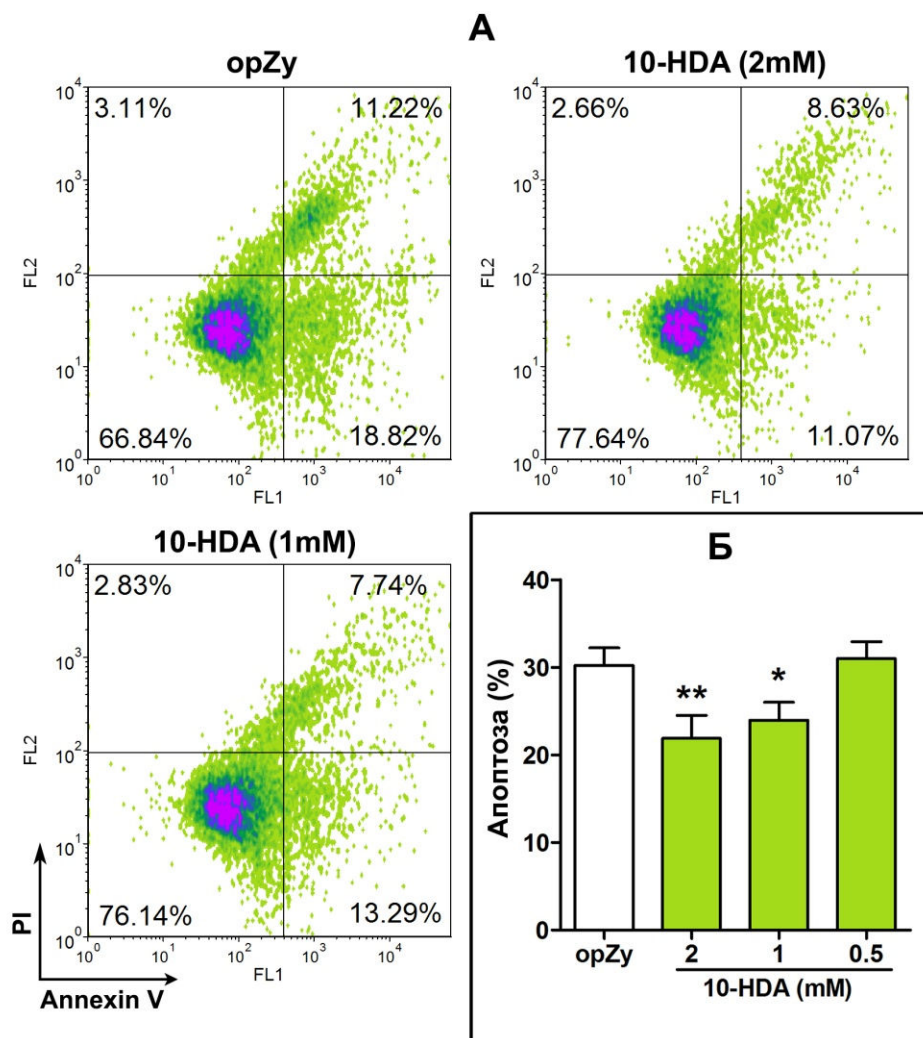
Графикон 16. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани fMLP ($1 \mu\text{M}$). После 5h инкубације на 37°C , ћелије су обележене Annexin V Alexa Fluor 488/PI и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Различити стадијуми апоптозе неутрофила у облику хистограма једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента Annexin V⁺ ћелија \pm SD из три независна експеримента.



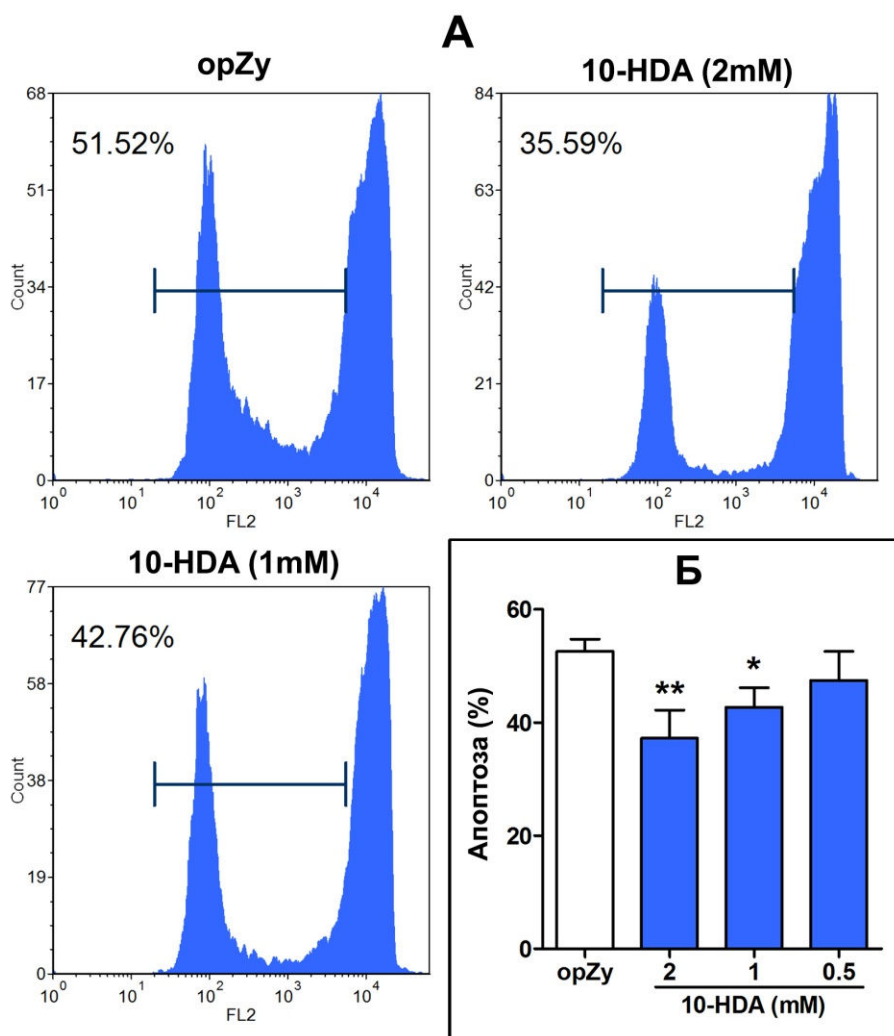
Графикон 17. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани fMLP ($1 \mu\text{M}$). Након 24h инкубације на 37°C , ћелије су обележене пропидијум јодидом у хипотонном цитратном пуферу и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Хистограми једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента апоптозе $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента. $**p < 0,01$



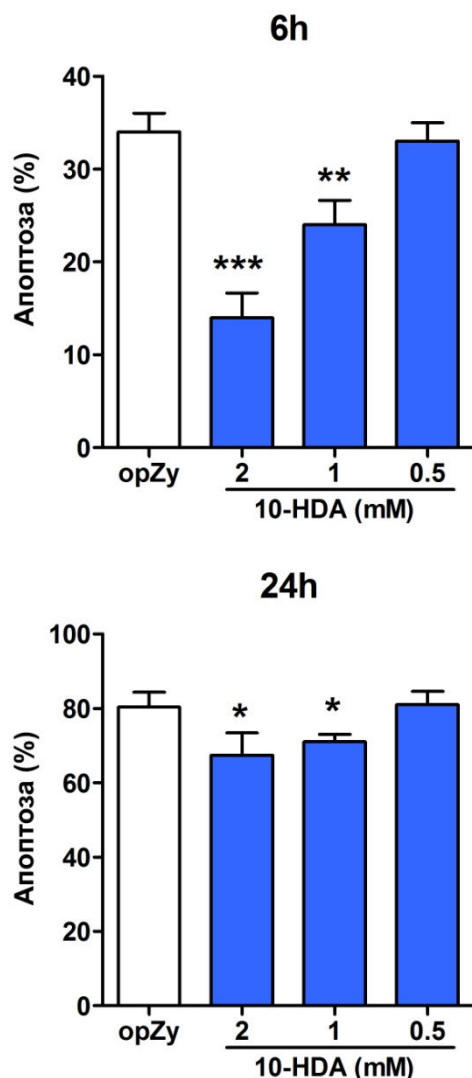
Графикон 18. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних fMLP. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) на 37°C 30 минута, а затим стимулирани fMLP ($1\mu\text{M}$). После 6h, односно 24h инкубације ћелије су обојене Türgk-овим раствором и анализирани на светлосном микроскопу бројањем најмање 500 ћелија по препарату као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказане су средње вредности процента апоптозе $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Графикон 19. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних opZy. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани opZy ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). После 5h инкубације на 37°C , ћелије су обележене Annexin V Alexa Fluor 488/PI и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Различити стадијуми апоптозе неутрофила у облику хистограма једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента Annexin V⁺ ћелија \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Графикон 20. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних opZy. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани opZy ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Након 24h инкубације на 37°C , ћелије су обележене пропидијум јодидом у хипотонном цитратном пуферу и анализирани на проточном цитофлуориметру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. (А) Хистограми једног репрезентативног експеримента. (Б) Графички приказ средњих вредности процента апоптозе $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

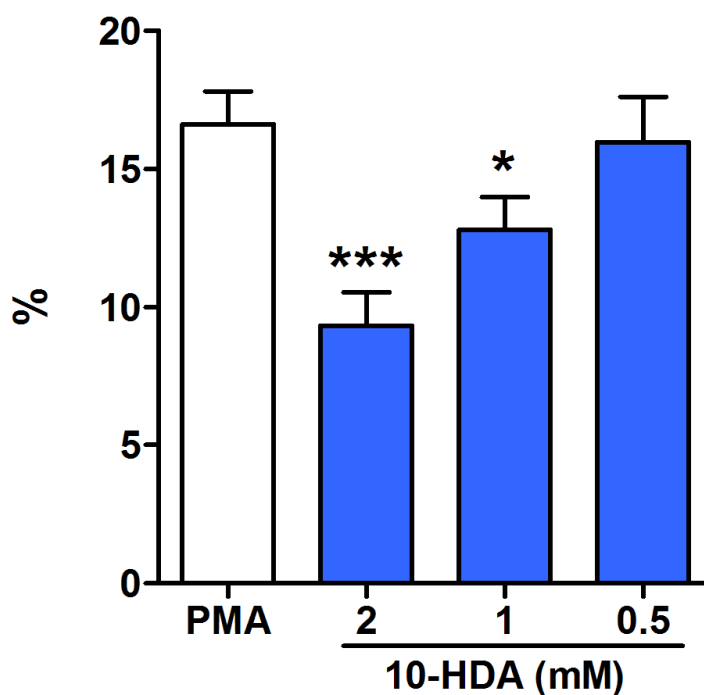


Графикон 21. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих неутрофила периферне крви стимулираних opZy. Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$) су инкубирани са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) на 37°C 30 минута, а затим стимулирани opZy ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). После 6h, односно 24h инкубације ћелије су обојене Türgck-овим раствором и анализирани на светлосном микроскопу бројањем најмање 500 ћелија по препарату као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Приказане су средње вредности процента апоптозе $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

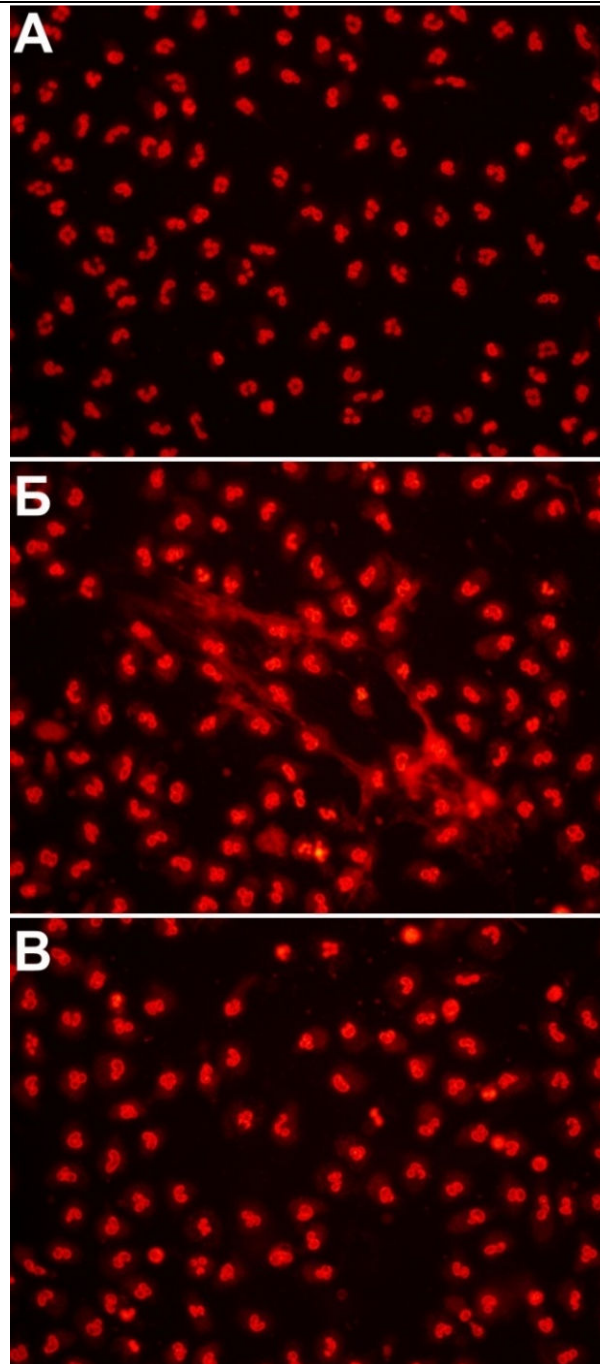
Утицај 10-HDA на процес NEToze хуманих неутрофила периферне крви

Будући да хемијска и биолошка стимулација неутрофила углавном индукује NETozу на начин који зависи од продукције реактивних кисеоничних врста (Nishinaka и сар., 2011, Kirchner и сар., 2012, Palmer и сар., 2012, Parker и Winterbourn, 2012, Kirchner и сар., 2013), претпоставили смо да ће 10-HDA, с обзиром да смањује продукцију реактивних кисеоничних врста, такође смањити интензитет NEToze.

У том циљу су хумани неутрофили периферне крви инкубирани 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM) на 37°C, а затим стимулирани PMA (48 nM), најпознатијим индуктором NEToze. Ослобађење NET-ова је квантификовано после 4h инкубације, мерењем интензитета флуоресценце PI. Као што се може видети на графикону 22, претретман неутрофила са 10-HDA (1mM и 2mM) је значајно смањио ослобађење NET-ова од стране хуманих неутрофила. Овај ефекат је потврђен и на флуоресцентном микроскопу (слика 4).



Графикон 22. Утицај 10-HDA на PMA-индуковану NEToze хуманих неутрофила периферне крви. Неутрофили су преинкубирани у присуству или одсуству различитих концентрација 10-HDA (0,5mM-2mM) 30 минута, а затим стимулирани PMA (48nM). Тест је изведен у црним микротитарским плочама са 96 места, 1×10^5 ћелија/базену у HBSS⁺ медијуму. Интензитет NEToze је процењен након 4h на основу односа количине екстрацелуларне DNK и укупне количине DNK, применом PI, као што је описано у поглављу „Метеријал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност процента екстрацелуларне DNK, која је пропорционална интензитету NEToze \pm SD у односу на укупну количину DNK из три независна експеримента. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$



Слика 4. Хумани неутрофили периферне крви у NETozi. Неутрофили су култивисани на „coverslip“ плочицама (\varnothing 13mm) у HBSS⁺ медијуму, 1×10^5 ћелија/узорку, 4 сата, на 37°C, у присуству или одсуству PMA (48nM) као стимулусом, са или без додатка 10-HDA (2mM). Након инкубације и фиксације у 4% формалину раствореном у фосфатном пуферу ћелије су обележене PI (20 μ g/ml) као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Препарати су посматрани на флуоресцентном микроскопу. (А) Нестимулисани неутрофили, (Б) неутрофили стимулирани PMA и (В) неутрофили стимулирани PMA у присуству 10-HDA. Увећање 200х.

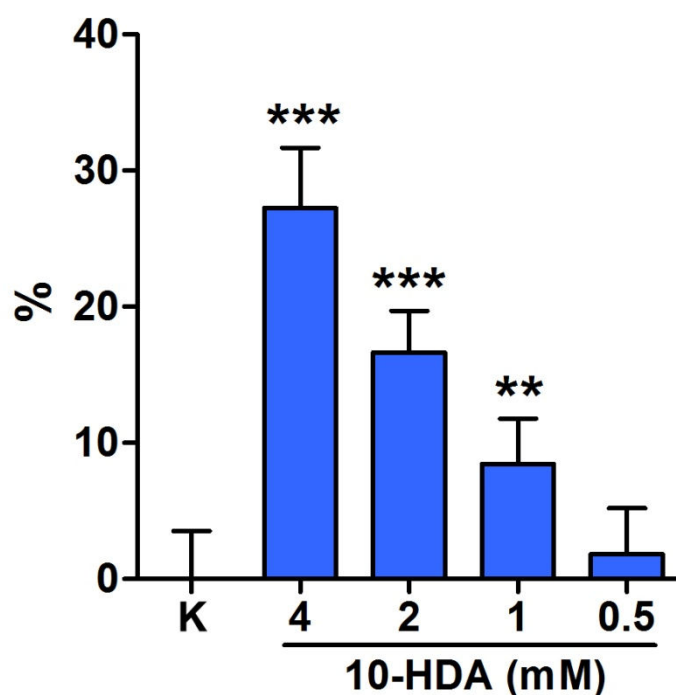
Антиоксидативна својства 10-HDA

Способност 10-HDA да “сакупља” реактивне кисеоничне врсте

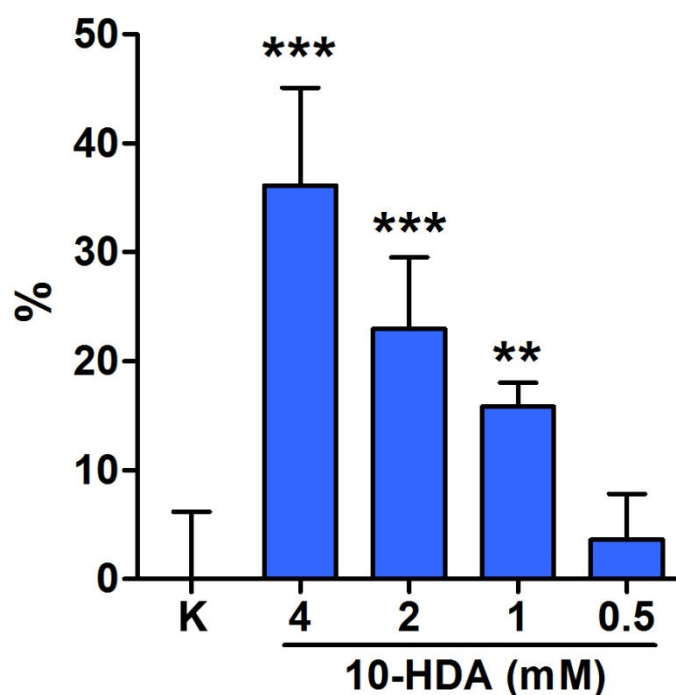
У циљу испитивања способности 10-HDA да “сакупља” реактивне кисеоничне врсте, користили смо системе без ћелија у којима су реактивне кисеоничне врсте хемијски продуковане. Резултати су показали да 10-HDA у концентрацијама од 1mM до 4mM има способност да реагује са $O_2^{\bullet -}$ (графикон 23) и HOCl (графикон 24) испољавајући директни антиоксидативни ефекат. Вредност средње инхибиторне концентрације (IC50 вредност), у нашим експерименталним моделима, за $O_2^{\bullet -}$ била је 10,7mM, а за HOCl 6,8mM. С друге стране, 10-HDA није реаговала са H_2O_2 у раствору што је показано на основу истог интензитета оксидације луминола од стране H_2O_2 без обзира на присуство или одсуство 10-HDA (графикон 25).

Ефекат 10-HDA на концентрацију глутатиона у стимулираним неутрофилима

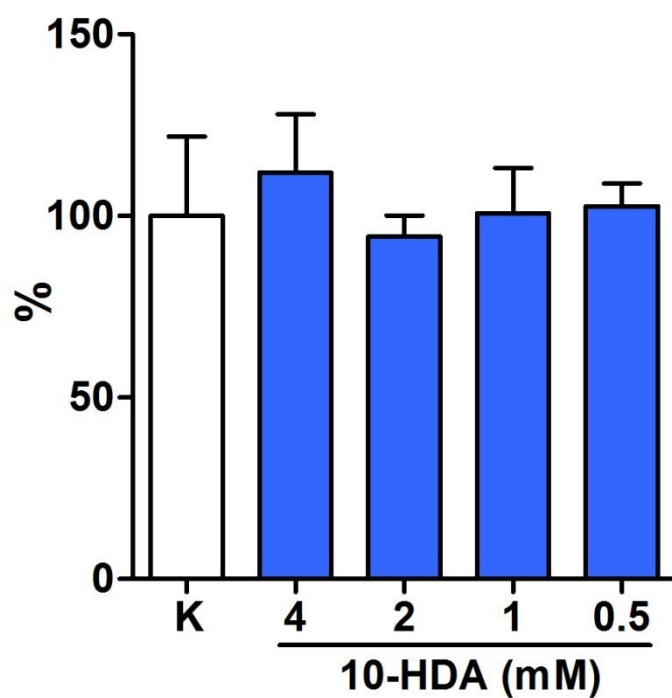
На графикону 26 се може видети да је PMA (16nM) индуковао деплецију глутатиона у неутрофилима за око 45% у односу на контролне нестимулисане ћелије. 10-HDA ни у једној примењеној концентрацији (0,5mM-2mM) није значајно модулирала ову деплецију. Остала два стимулуса, fMLP (1 μ M) и opZy (10 μ g/ml), нису значајно мењала концентрацију глутатиона у неутрофилима без обзира на присуство или одсуство 10-HDA у тестираним концентрацијама. Такође, ова масна киселина није имала ефекта на концентрацију глутатиона у нестимулисаним неутрофилима (резултати нису приказани).



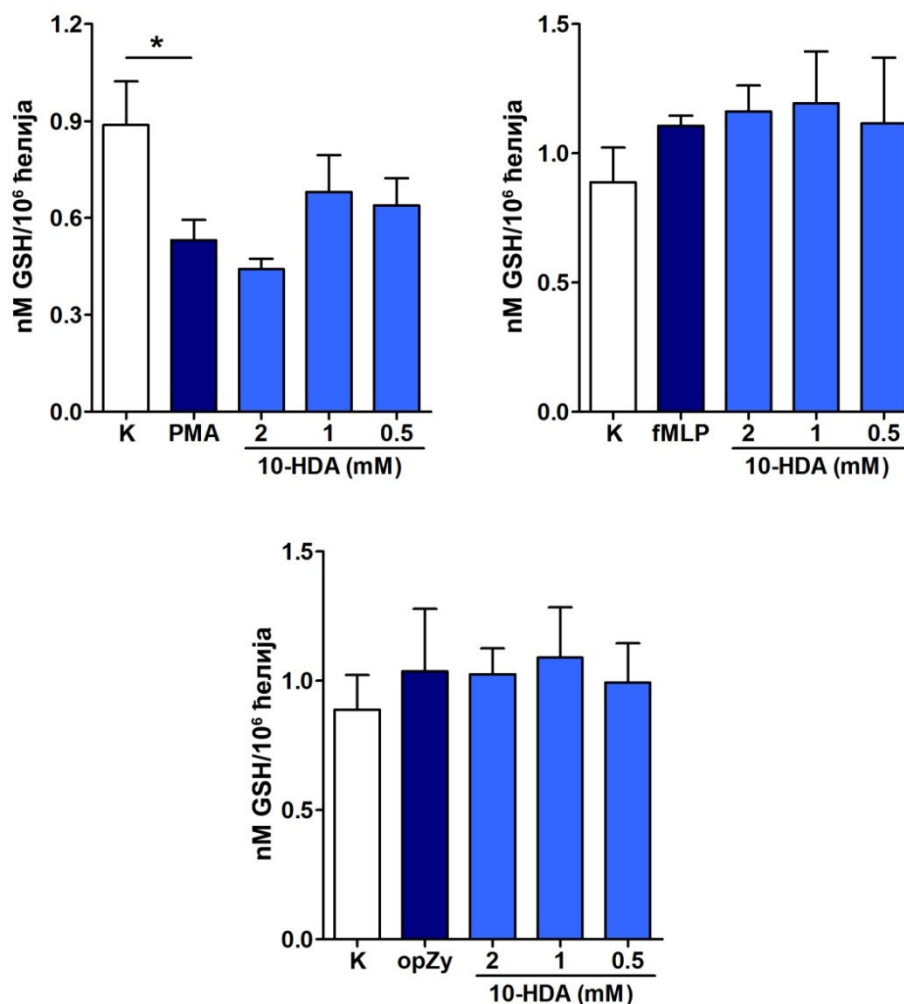
Графикон 23. Способност 10-HDA да „сакупља“ $O_2^{\cdot-}$. $O_2^{\cdot-}$ је синтетисан помоћу NADH/PMS система. Способност 10-HDA (0,5mM-4mM) да „сакупља“ овај реактивни радикал кисеоника је квантификована спектрофотометријски, мерењем интензитета редукције NBT као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) редукције NBT до диформаза у односу на контролу (K) (без додатка 10-HDA) \pm SD из три независна експеримента. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Графикон 24. Способност 10-HDA да „сакупља“, односно реагује са HOCl. Реакциона смеша се састојала од следећих реагенаса у финалној запремини од 300 μ l: фосфатни пуфер (100mM, pH 7,4), 10-HDA (0,5mM-4mM), DHR (5 μ M) и свеже припремљена HOCl (5 μ M). Интензитет флуоресценце је мерен на читачу за микроплоча (Synergy HT) 5 минута по додавању HOCl као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) HOCl-индуковане оксидације DHR у односу на контролу (K) (без додатка 10-HDA) \pm SD из три независна експеримента. **p<0,01; ***p<0,001



Графикон 25. Способност 10-HDA да „сакупља“, односно реагује са H_2O_2 . Реакциона смеше се састојала од следећих реагенаса у финалној запремини од 250 μl : фосфатни пуфер (100mM, pH 7.4), луминол (50 μM), 10-HDA (0,5mM-4mM) и 1% H_2O_2 . Промена у интензитету хемилуминисцентног сигнала је мерена 15 минута по додавању H_2O_2 на читачу за микроплоче (Synergy HT), као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност релативног интензитета оксидације луминола у односу на контролу (K) (100%) (без додатка 10-HDA) $\pm\text{SD}$ из три независна експеримента.



Графикон 26. Ефекат 10-HDA на концентрацију глутатиона у хуманим неутрофилима периферне крви стимулираних PMA, fMLP и opZy. Неутрофили ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) су преинкубирани 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-4mM) у плочи са 24 места, а затим стимулирани PMA (16nM), fMLP (1 μ M) или opZy (10 μ g/ml). После 2h инкубације на 37°C, ћелије су испране, сакупљене и лизирани. Концентрација глутатиона је одређивана колориметријски помоћу DTNB реагенса, као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средње вредности концентрације глутатиона нормализоване на милион ћелија \pm SD из три независна експеримента. *p<0,05

GSH – укупни глутатион

Ефекат 10-HDA на функцију хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви

Ефекат 10-HDA на пролиферацију PBMNC

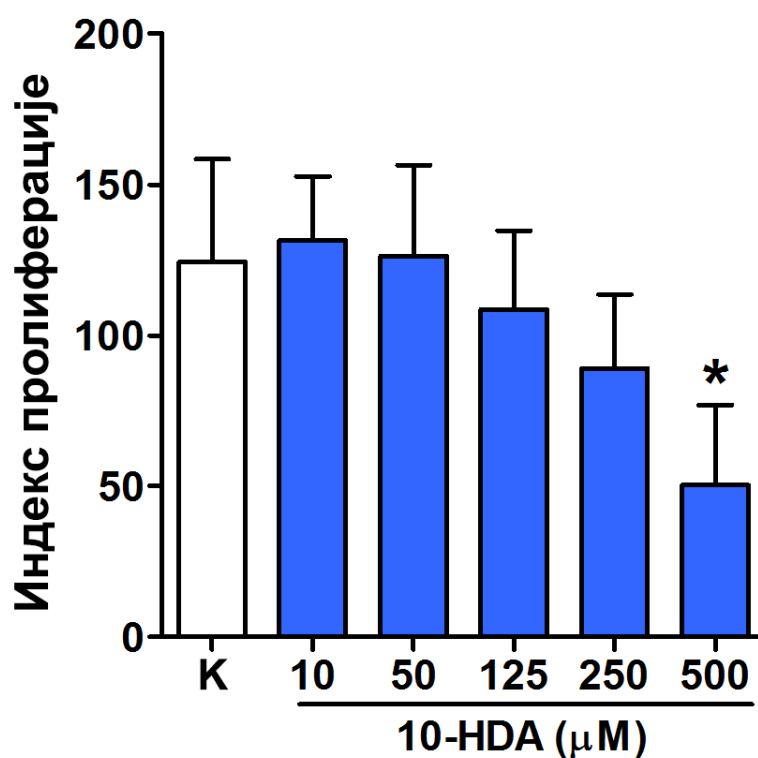
PBMNC су стимулисане PHA (30µg/ml) и различитим концентрацијама 10-HDA (10µM-500µM). PBMNC стимулисане само PHA су представљале контролу. Резултати приказани на графикону 27 показују да је 10-HDA у концентрацији од 500µM инхибирала пролиферацију лимфоцита. Инхибирана пролиферација није била последица апоптозе ћелија (графикон 28), али је била повезана са смањеном продукцијом IL-2 (графикон 29).

Ефекат 10-HDA на продукцију про-инфламаторних цитокина PBMNC

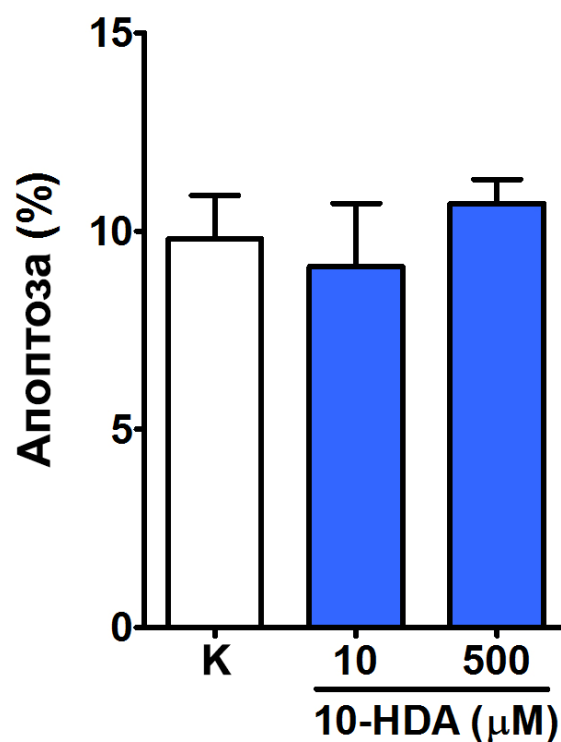
Полазећи од резултата пролиферације лимфоцита, одлучили смо да испитамо утицај две концентрације 10-HDA (50µM и 500µM) на продукцију цитокина од стране PHA-активираних PBMNC. Прво смо одредили продукцију три главна проинфламаторна цитокина (IL-1β, IL-6 и TNF-α). Резултати су приказани на графикону 30. Може се видети да је 10-HDA у концентрацији од 500µM значајно супримирао продукцију IL-1β и TNF-α.

Ефекат 10-HDA на цитокински Th профил PBMNC

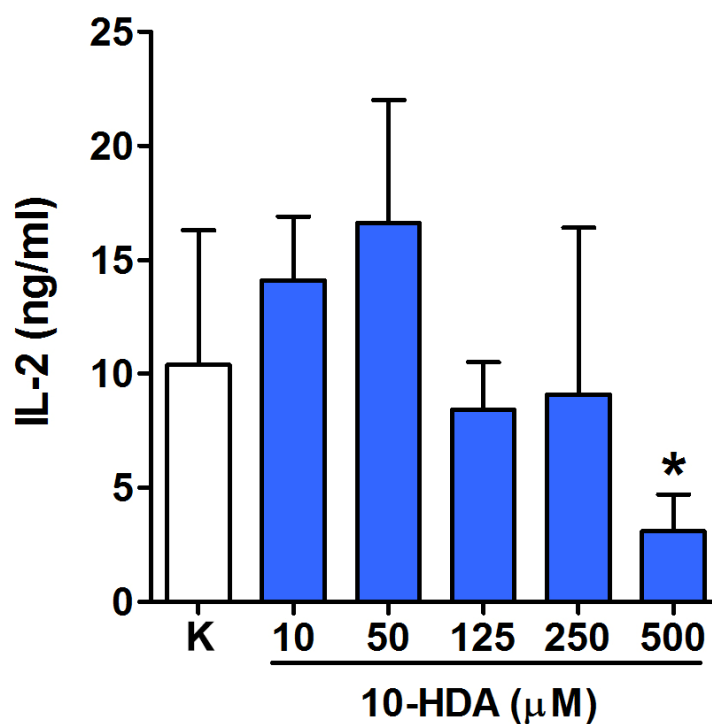
У супернатантима култура PHA-стимулисаних PBMNC одређивана је концентрација цитокина које продукују ефекторски CD4⁺ Т лимфоцити: IFN-γ (Th1 цитокин), IL-5 (Th2 цитокин), IL-17A (Th17 цитокин) и IL-10 (имунорегулаторни цитокин). Као што је приказано на графикону 31, ниска концентрација 10-HDA (50µM) није модулирала продукцију ових цитокина, док је висока доза ове масне киселине (500µM) инхибирала продукцију IFN-γ и IL-5 (графикон 31).



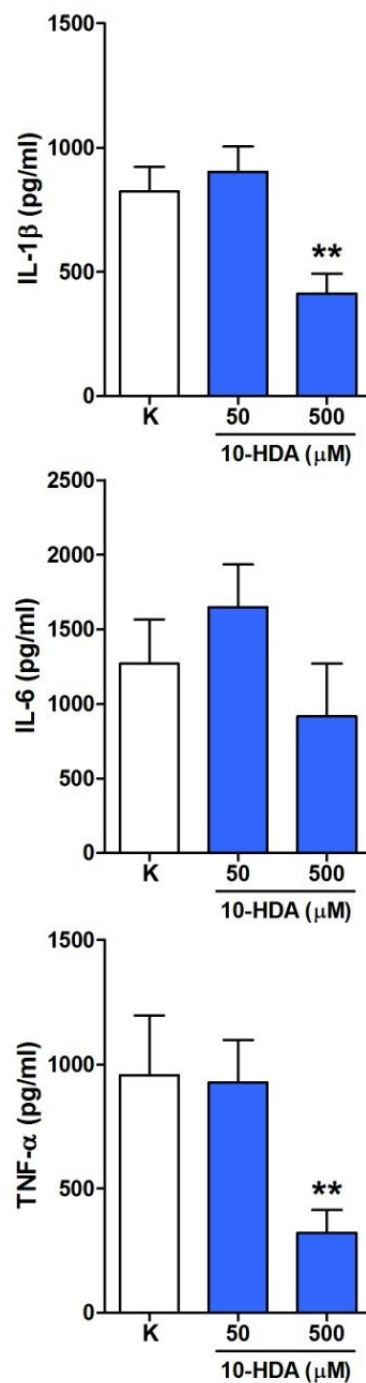
Графикон 27. Ефекат 10-HDA на пролиферацију хуманих PBMCs. Ћелије су култивисане 3 дана у присуству PHA (30μg/ml) (K) или PHA и различитих концентрациј 10-HDA (0,01-0,5mM) на 37°C, у инкубатору за ћелијске културе са 5% CO₂. Последњих 18 сати култивације ћелијама је додат [³H]-тимидин, а његова уградња је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност индекса пролиферације ±SD пет различитих донора. *p<0,05



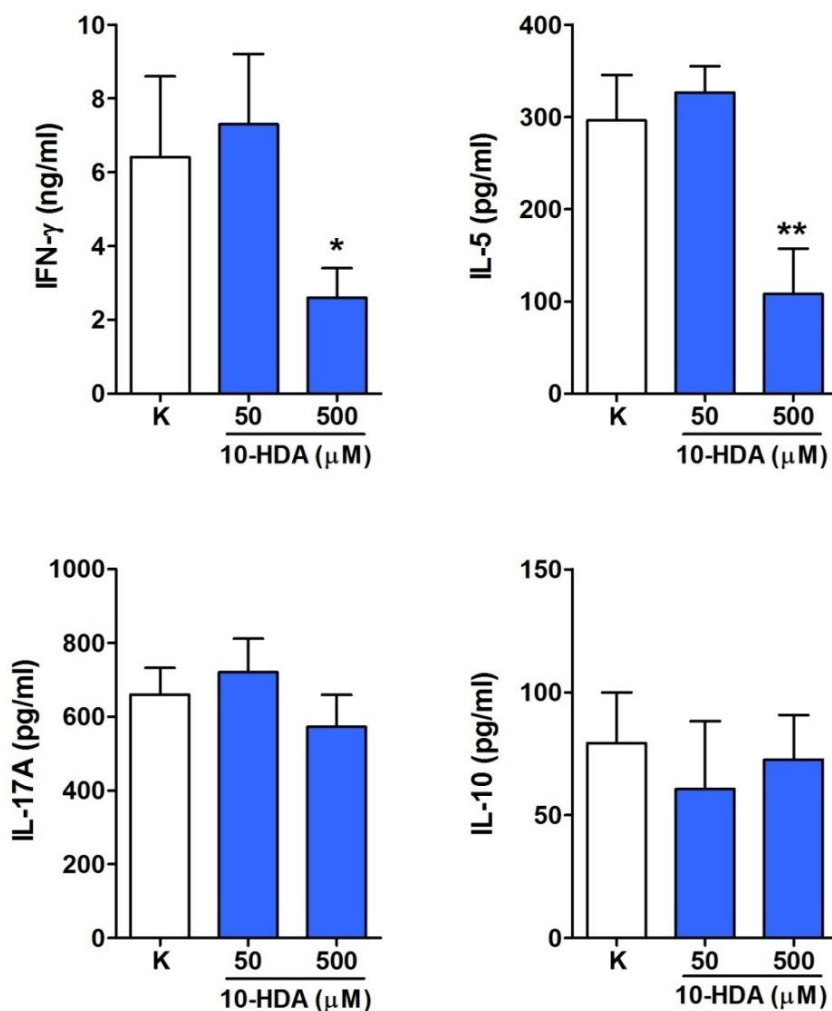
Графикон 28. Ефекат 10-HDA на апоптозу хуманих PBMCs. Ћелије су култивисане 3 дана у присуству РНА (30μg/ml) (K) или РНА и различитих концентрација 10-HDA (0,01mM и 0,5mM) на 37°C, а затим сакупљене, испране у PBS, обележене PI у хипотонном цитратном пуферу и анализиране на проточном цитометру као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност процента апоптотичних ћелија ±SD пет различитих донора.



Графикон 29. Ефекат 10-HDA на продукцију IL-2 од стране хуманих PBMNC. Ћелије су култивисане 3 дана у присуству PHA (30 $\mu\text{g/ml}$) (K) или PHA и различитих концентрација 10-HDA (0,01mM-0,5mM) на 37°C. Супернатанти из ћелијских култура су сакупљени и коришћени за одређивање концентрације IL-2 ELISA методом као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина (ng/ml) \pm SD пет различитих донора. *p < 0.05



Графикон 30. Ефекат 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина од стране хуманих PBMNC. Супернатанти PBMNC култура стимулираних PNA (30μg/ml) (K) или PNA у присуству 10-HDA (0,05mM и 0,5mM), су сакупљени после 3 дана култивације на 37°C и коришћени за одређивање концентрација IL-1β, IL-6 и TNF-α ELISA методом као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина (pg/ml) ±SD пет различитих донора. **p < 0.01



Графикон 31. Утицај 10-HDA на Th поларизациони капацитет PBMNC. Хумане PBMNC су стимулисане само PHA (30μg/ml) (K) или PHA у присуству различитих концентрација 10-HDA (0,05mM и 0,5mM), 72h на 37°C, као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Концентрације IFN-γ, IL-5, IL-17A и IL-10 су одређиване у супернатантима култура ELISA методом. Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина (ng/ml или pg/ml) ±SD пет различитих донора. *p<0,05; **p<0,01

Ефекат 10-HDA на хумане дендритске ћелије моноцитног порекла

Ефекат 10-HDA на преживљавање, вијабилност и апоптозу МоDC

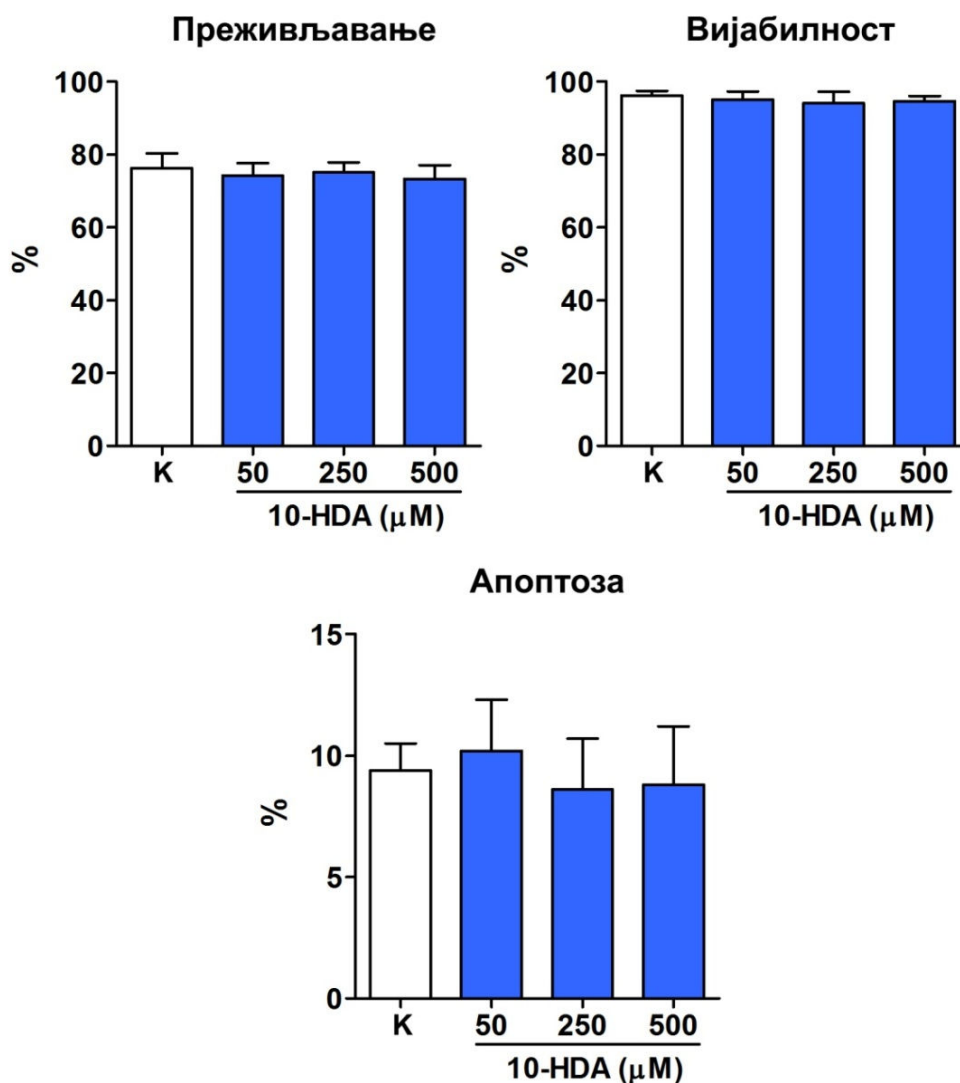
Незреле МоDC су стимулисане LPS (1 μ g/ml) и инкубиране 48 сати са различитим концентрацијама 10-HDA (50 μ M-500 μ M). Као што се може видети на графикону 32, 10-HDA ни у једној примењеној концентрацији није имала утицај на преживљавање, вијабилност и апоптозу МоDC у односу на контролне ћелије (стимулисане само LPS).

Ефекат 10-HDA на матурацију МоDC

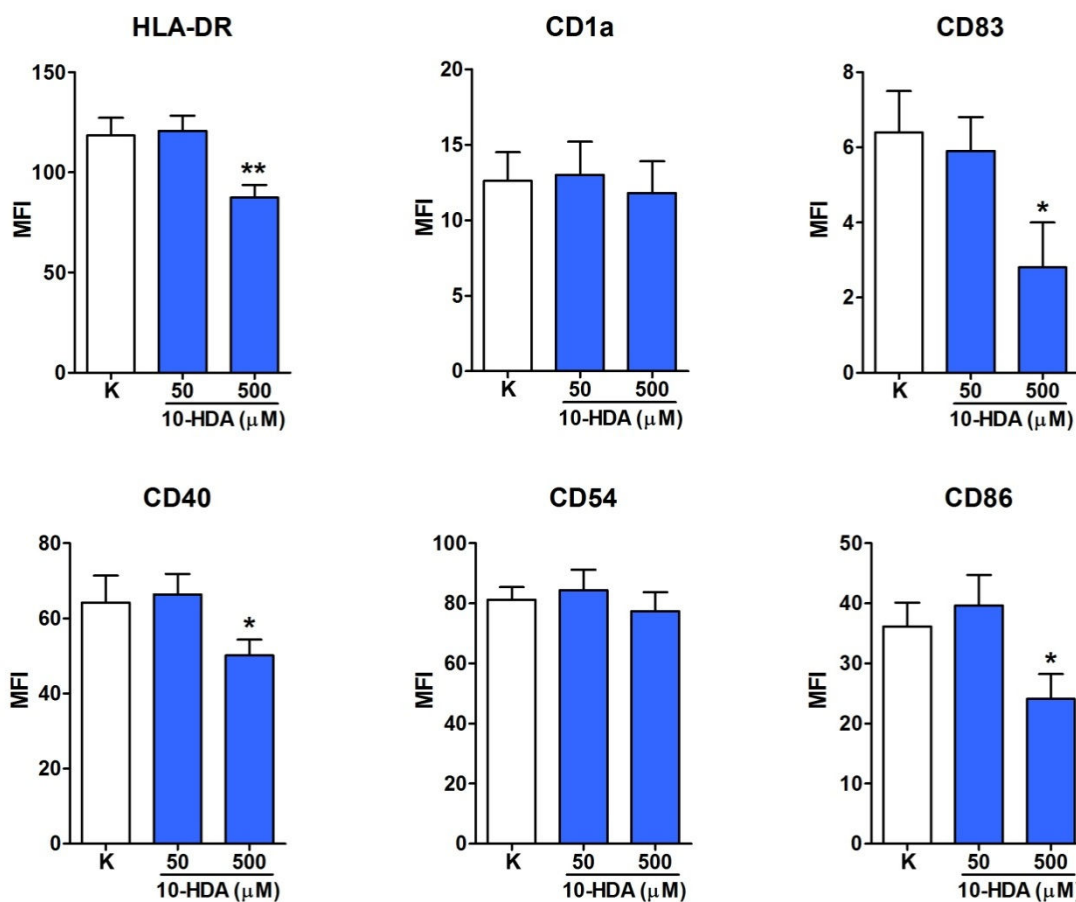
Као што се може видети на графикону 33, ниска концентрација 10-HDA (50 μ M) није значајно утицала на матурацију МоDC у поређењу са контролом. Насупрот томе, висока концентрација (500 μ M) је инхибирала матурацију МоDC на шта је указала смањена експресије HLA-DR, CD83, CD40 и CD86 молекула. Испољавање CD54 и CD1a молекула није се значајно променило код МоDC третираних 10-HDA у односу на контролу.

Ефекат 10-HDA на алостимулаторну способност МоDC

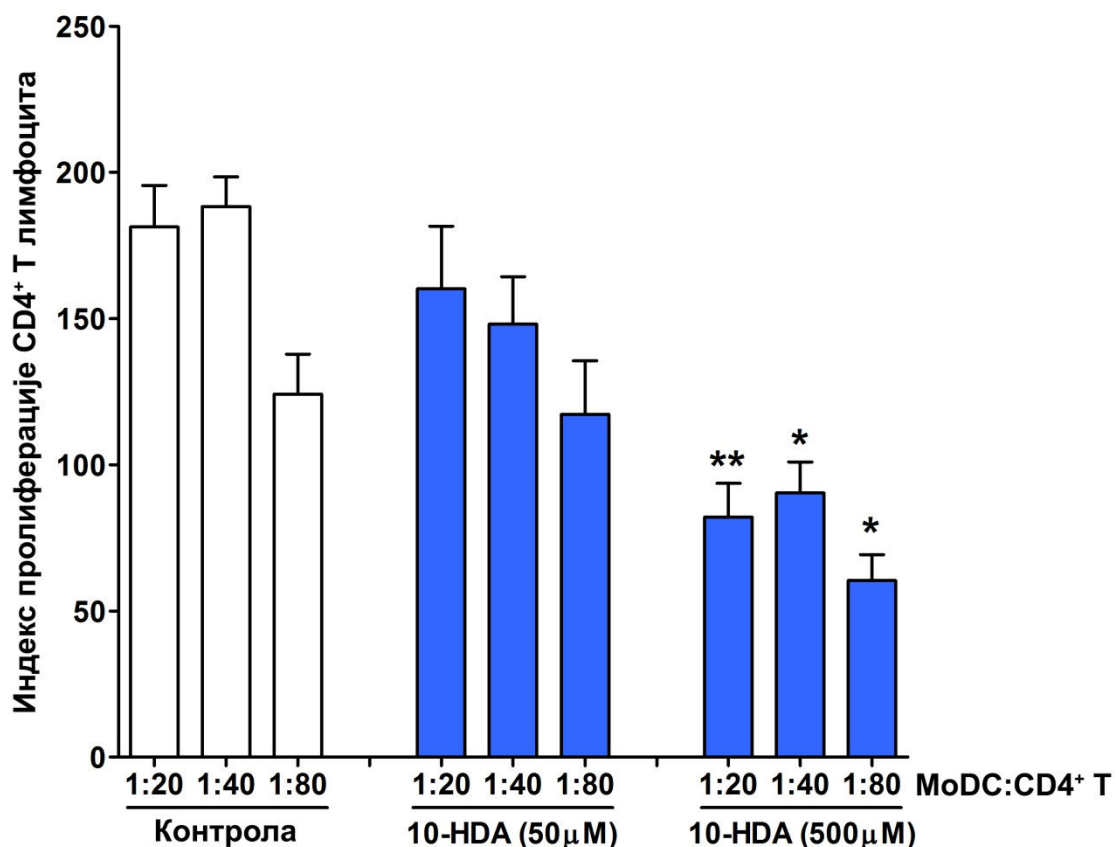
На графикону 34 се може видети да 10-HDA у концентрацији од 50 μ M није утицала на алостимулацијску активност МоDC у поређењу са контролом. Међутим, 10-HDA у концентрацији од 500 μ M је значајно смањила способност МоDC да стимулишу пролиферацију алогених CD4⁺ Т лимфоцита периферне крви у односу на контролу.



Графикон 32. Ефекат 10-HDA на преживљавање, вијабилност и апоптозу MoDC. MoDC (1×10^6 /узорку) су култивисане 48 h у присуству LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) и 10-HDA ($50 \mu\text{M}$ - $500 \mu\text{M}$) на 37°C . Контролне ћелије су стимулисане само LPS (К). Након инкубације, ћелије су сакупљене, избројане, испране у PBS и обележене PI као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Ћелије су анализирани на проточном цитометру. Преживљавање ћелија је приказано као проценат укупног броја живих ћелија у односу на почетни број незрелих MoDC (100%). Процент вијабилних ћелија је одређен одузимањем процента PI⁺ ћелија од укупног броја MoDC (100%). Апоптоза је детектована бојењем ћелија PI ($75 \mu\text{M}$) у хипотонном цитратном пуферу, а резултати су приказани као проценат ћелија са хиподиплоидним једром.



Графикон 33. Ефекат 10-НДА на фенотипске карактеристике хуманих МоDC. Незреле МоDC (1×10^6 /базену плоче са 6 места) су стимулисане само LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) (K), или LPS у присуству 10-НДА ($50 \mu\text{M}$ или $500 \mu\text{M}$) 48h на 37°C . Матурација је процењивана анализом експресије HLA-DR, CD1a, CD83, CD40, CD54 и CD86 молекула, применом mAt цитофлуориметријском методом, као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Резултати су приказани као средње вредности MFI \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



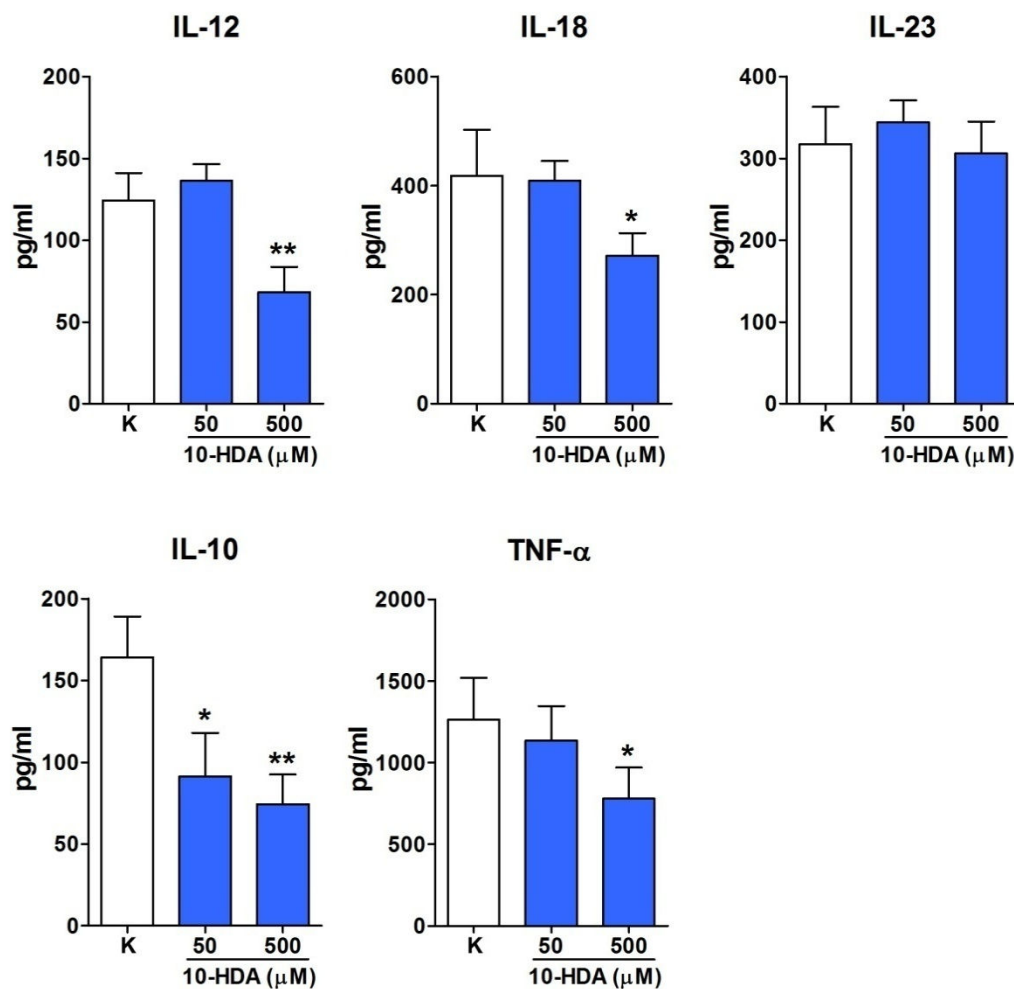
Графикон 34. Ефекат 10-HDA на алоstimулаторну активност МоDC. МоDC ($0,5 \times 10^4$ - $0,125 \times 10^4$ ћелија/базену) претходно сазреле у присуству LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) (К) са или без 10-HDA ($50 \mu\text{M}$ и $500 \mu\text{M}$), су култивисане у плочи од 96 места са „U“ дном са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима периферне крви (1×10^5 ћелија/базену), у комплетном RPMI медијуму, 5 дана, на 37°C као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Однос МоDC наспрам CD4⁺ Т лимфоцита је био 1:20, 1:40 и 1:80. Пролиферација је мерена на основу количине везаног [³H]-тимидина који је ћелијама додат 18 сати пре истека култивације. Резултати су приказани као средња вредност индекса пролиферације \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Ефекат 10-HDA на продукцију цитокина од стране МоDC и на њихову Th поларизацијску способност

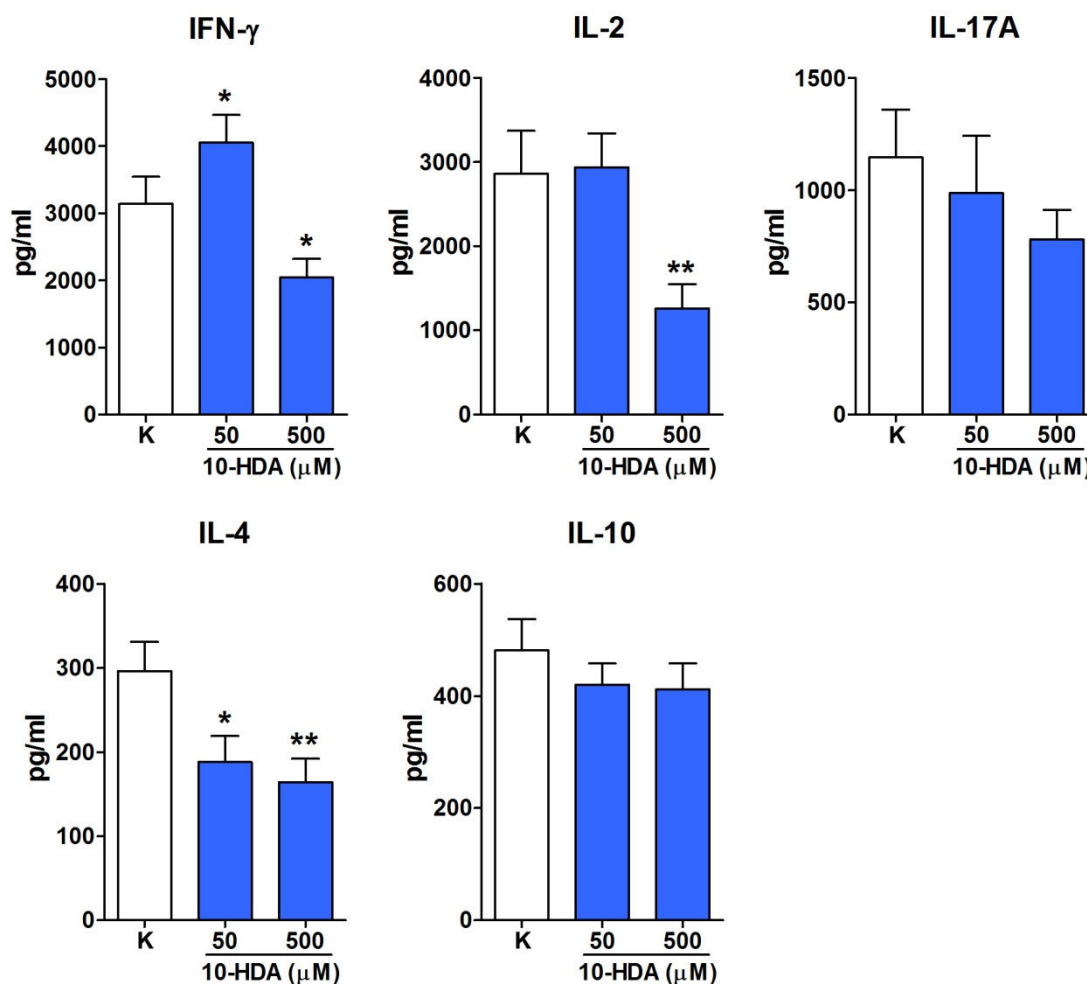
Ниска концентрација 10-HDA (50 μ M) није модулирала значајно продукцију IL-12, IL-18, IL-23 и TNF- α од стране МоDC након 48h третмана, али је редуковала продукцију IL-10 (графикон 35), што је узроковало већи IL-12/IL-10 однос (1,49) у поређењу са контролом (0,76). Поред тога, тако третиране МоDC су стимулисале продукцију IFN- γ , а смањиле секрецију IL-4 од стране алогених CD4⁺ Т лимфоцита периферне крви у кокултури од 5 дана (графикон 36). МоDC култивисане са високом концентрацијом 10-HDA (500 μ M) су продуковале ниже концентрације свих испитиваних цитокина (IL-12, IL-18, IL-10, TNF- α), осим IL-23 (графикон 35) и слабије активирале алогене CD4⁺ Т лимфоците да продукују IFN- γ , IL-2 и IL-4. Насупрот томе, концентрације IL-17A и IL-10 се нису значајно промениле (графикон 35).

Ефекат NF- κ B и PI3K инхибитора на продукцију цитокина од стране LPS-стимулисаних МоDC у присуству 10-HDA

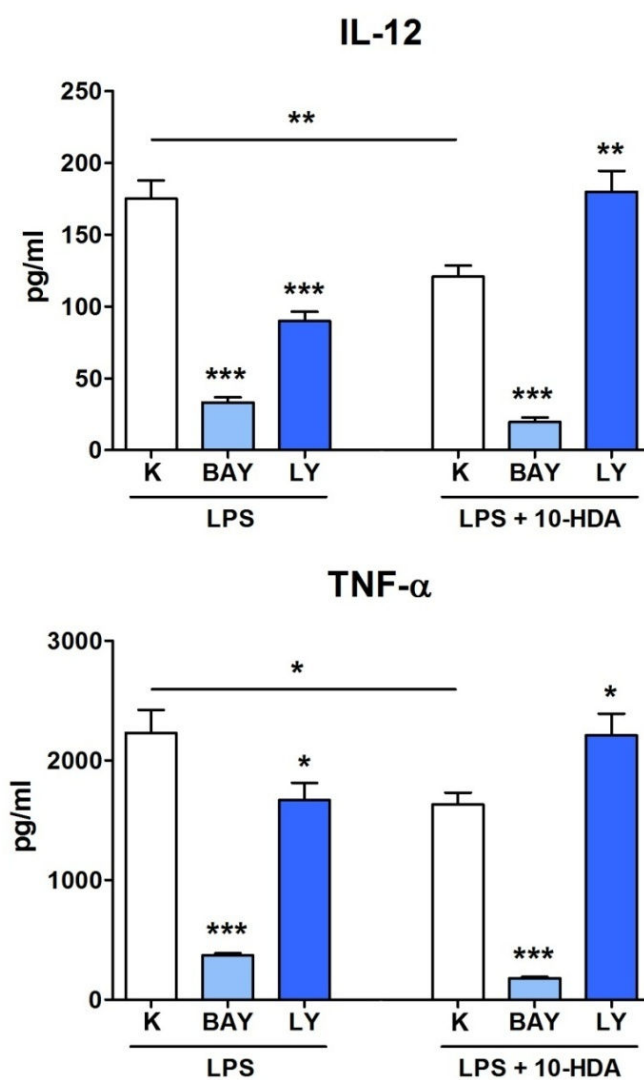
У циљу откривања могућег механизма путем кога 10-HDA инхибира продукцију IL-12 и TNF- α од стране МоDC стимулираних LPS (1 μ g/ml), преинкубирали смо МоDC са инхибиторима NF- κ B и PI3K као што је то описано у поглављу „Материјал и методе“. МоDC смо стимулисали LPS (1 μ g/ml) у присуству или одсуству 10-HDA (500 μ M). Инхибитор транскрипционог фактора NF- κ B (BAY 11-7082) је смањио продукцију IL-12 и TNF- α од стране LPS-стимулисаних МоDC за око 80%. Овај инхибитор је додатно инхибирао секрецију IL-12 и TNF- α у присуству 10-HDA. Инхибитор PI3K (LY294002) је смањио продукцију IL-12 и TNF- α од стране контролних МоDC. Међутим, овај инхибитор је у потпуности неутралисао инхибиторне ефекте 10-HDA на продукцију ова два цитокина од стране МоDC (графикон 37).



Графикон 35. Ефекат 10-HDA на продукцију цитокина од стране МоDC. МоDC су култивисане у концентрацији од 1×10^6 /базену плоче са 6 места/2ml RPMI медијума, 48h, на 37°C у присуству LPS ($1\mu\text{g/ml}$) (K), са или без 10-HDA ($50\mu\text{M}$ и $500\mu\text{M}$). Након инкубације, у супернатантима култура су одређиване концентрације IL-12, IL-18, IL-23, IL-10 и TNF- α ELISA тестовима. Резултати су представљени као средње вредности концентрација цитокина (pg/ml) \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Графикон 36. Th поларизациона способност МоDC третираних 10-HDA. МоDC су најпре сазреле у пуном RPMI медијуму у присуству LPS (1 μ g/ml) (K), са или без 10-HDA (50 μ M и 500 μ M) током 48h, на 37°C. Зреле МоDC (1×10^4 /базену плоче са 96 места) су потом култивисане са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима периферне крви (1×10^5 /базену) 5 дана. Осам сати пре истека инкубације у културе су додати РМА (30nM) и јономицин (670nM) као што је описано у поглављу „Материјал и методе“. Након истека инкубације, супернатанти култура су сакупљени и у њима је одређивана концентрација IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17A и IL-10 ELISA тестовима. Резултати су приказани као средње вредности концентрација цитокина (pg/ml) \pm SD из три независна експеримента. *p<0,05; **p < 0,01



Графикон 37. Ефекат инхибитора NF- κ B и PI3K на продукцију цитокина од стране LPS-стимулисаних MoDC. MoDC (1×10^5 /базену плоче са 96 места) су најпре преинкубиране са Bay 11-7082 (BAY; $5 \mu\text{M}$) или LY294002 (LY; $10 \mu\text{M}$) 30 минута на 37°C , у комплетном RPMI медијуму. Затим су стимулисане LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) са или без додатка 10-HDA ($500 \mu\text{M}$). Након 48h инкубације у истим условима супернатанти су сакупљени и у њима су одређиване концентрације IL-12 и TNF- α ELISA методом. Приказане су средње вредности концентрације цитокина (pg/ml) \pm SD из триplikата једног експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Дискусија

Антиоксидативна активност 10-HDA

Матични млеч је продукт субмандибуларних и хипофарингеалних жлезда пчела радилица, којим се матица и њене ларве хране. Познато је да матични млеч због свог благотворног дејства заузима важно место у традиционалној медицини. Поред тога, његови многобројни фармаколошки и биолошки ефекти су последњих двадесет година и научно потврђени. Наиме, у бројним радовима је показано да матични млеч има антиоксидативни, имуномодулаторни, хипогликемијски, хипохолестеролемијски, анти-хипертензивни, антибиотски, неуротрофични и многе друге ефекте (Fujii и сар., 1990, Inoue и сар., 2003, Fontana и сар., 2004, Bincoletto и сар., 2005, Hashimoto и сар., 2005, Liu и сар., 2008, Azab и сар., 2011, Pavel и сар., 2011, Aslan и сар., 2012). С обзиром да матични млеч има веома сложен састав (протеини, липиди, угљени хидрати, слободне аминокиселине и масне киселине, минерали, витамини итд) није познато која је компонента (или више њих) одговорна за одређено, напред наведено, деловање. Досадашња истраживања су углавном била усмерана на ефекте протеинских и у значајно мањој мери липидних компоненти матичног млеча јер су то, биолошки и фармаколошки посматрано, најважније супстанце. Највећи део липида матичног млеча чине масне киселине и то углавном у слободној форми, док око 70% укупне липидне компоненте матичног млеча чини 10-HDA (Sugiyama и сар., 2012a). Ова хидрокси, мононезасићена масна киселина, поред тога што је најзаступљенија, је и јединствена јер је у природи пронађена само у матичном млечу (Melliou и Chinou, 2014). Због тога су различите истраживачке групе претпоставиле да је 10-HDA одговорна за поједине специфичне ефекте матичног млеча. Полазећи од сазнања да матични млеч испољава антиоксидативно и имуномодулаторно дејство, један од наших циљева био је да испитамо да ли и 10-HDA, као саставни део матичног млеча, испољава слична својства.

Неутрофили су ћелије урођене имуности које имају једну од најважнијих улога у току запаљења. Ове ћелије прве долазе на место инфламације и учествују у елиминацији микроорганизама користећи различите механизме, као што су фагоцитоза, оксидативни прасак, продукција антибактеријских протеина и формирање NET-ова (Kołaczowska и Kubes, 2013). Оксидативни прасак, процес при коме неутрофили продукују реактивне кисеоничне врсте, представља

најупечатљивији показатељ активације неутрофила. Због тога смо ми у првом делу истраживања хтели да испитамо да ли 10-HDA утиче на оксидативни прасак неутрофила активираних PMA, opZy или fMLP, користећи методу хемилуминисценце помоћу луминола. Луминол неспецифично реагује са различитим реактивним кисеоничним и азотним врстама које продукују неутрофили ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, азот-оксид радикал, пероксинитрит), при чему емитује светлост чији интензитет може да се мери (Freitas и сар., 2009). С обзиром да луминол лако пролази ћелијску мембрану погодан је како за интрацелуларну, тако и за екстрацелуларну детекцију реактивних кисеоничних и азотних врста. Показали смо да 10-HDA дозно-зависно инхибира (статистички значајно до концентрације 0,5mM) оксидацију луминола од стране неутрофила активираних PMA, opZy или fMLP, односно оксидативни прасак ових ћелија.

Литературни подаци о деловању 10-HDA на продукцију реактивних кисеоничних врста су веома оскудни. Наиме, постоји само један рад у коме је показано да претретман хуманих дермалних фибробласта са 10-HDA (0,5-1,5mM) смањује количину реактивних кисеоничних врста у овим ћелијама, индуковану ултравиолетним А зрачењем, што је у сагласности са нашим налазима (Zheng и сар., 2012). Међутим, механизми деловања нису разматрани.

На месту инфламације, односно након комплетне активације неутрофила настаје мобилизација азурофилних и специфичних гранула ових ћелија. Фузија специфичних гранула са плазма мембраном или са мембраном фагозома узрокује склапање комплекса NADPH оксидазе при чему отпочиње продукција реактивних кисеоничних врста (Arruda и Barja-Fidalgo, 2009, Amulic и сар., 2012). NADPH оксидаза редукује молекуларни кисеоник до $O_2^{\cdot-}$ који, или спонтано или под утицајем SOD, прелази у H_2O_2 . $O_2^{\cdot-}$ може, у значајно мањој мери, да реагује са азот оксидом и да гради изузетно реактивно једињење пероксинитрит. Настали H_2O_2 представља главни супстрат за MPO која катализује формирање $HOCl$, много реактивнијег једињења од $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 (Babior и сар., 2002, Arruda и Barja-Fidalgo, 2009, Amulic и сар., 2012). Да би утврдили која је од ових реактивних кисеоничних врста укључена у процес инхибиције оксидативног праска помоћу 10-HDA, користили смо различите пробе специфичне за поједине реактивне кисеоничне

врсте. Прво смо користили NBT, специфичну пробу за интрацелуларну детекцију $O_2^{\cdot -}$. Показали смо да 10-HDA дозно-зависно (до концентрације 1mM) инхибира редукцију NBT до формазана у неутрофилима стимулираним PMA, opZy или fMLP. С обзиром да не постоје пробе које високо специфично детектују интрацелуларну продукцију H_2O_2 и HOCl, користили смо две флуоресцентне боје DHR и DCFH-DA чија је заједничка особина да реагују са H_2O_2 . Поред H_2O_2 , који представља најзначајнију реактивну врсту у оксидацији DHR у неутрофилима, DHR може, у мањој мери да реагује и са HOCl, док DCFH-DA ступа у реакцију и са пероксинитритом и хидроксилним радикалом (Freitas и сар., 2009). Резултати које смо добили били су идентични и показали су да 10-HDA у концентрацији од 2mM инхибира оксидацију DHR и DCFH-DA у неутрофилима активираним PMA и opZy, док код активације неутрофила fMLP постоји статистички значајна инхибиција и при концентрацији од 1mM.

Осим тога, проба са луминолом може индиректно да покаже продукцију HOCl у неутрофилима индуковану деловањем MPO. Наиме, показано је да MPO-дефицијентни хумани неутрофили производе веома мали хемилуминисцентни сигнал у одговору на PMA, fMLP и opZy, упркос нормалној продукцији $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 (Stevens и сар., 1978, Dahlgren и Stendahl, 1983). До истог закључка су дошли Muhlre и сар. (2003) показавши да третирање хуманих неутрофила MPO инхибитором смањује хемилуминисцентни сигнал луминола.

Као што је раније споменуто, ми смо за активацију неутрофила користили три стимулуса PMA, fMLP и opZy. PMA је фармаколошки активатор протеин киназе C, а представља и један од најснажнијих активатора неутрофила (Wolfson и сар., 1985). fMLP је потентни хемоатрактант пептидне структуре, који се везује за рецепторе повезане са G протеином на ћелијској мембрани и активира неутрофиле посредством различитих интрацелуларних сигналних путева у које су укључени фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза C, PI3K, MAP киназе и фосфолипаза A₂ (Sato и сар., 2013). Партикуле зимозана су делови ћелијског зида гљиве *Saccharomyces cerevisiae*, због чега се често користе, углавном у опсонизованом облику, у проучавању имунског одговора неутрофила и моноцита на гљивице. Зимозан је познати лиганд за TLR2 и дектин који се налазе на површини

неутрофила, а унутарћелијски сигнал се преноси углавном посредством Rac2 сигналног молекула (Макни-Маалеј и сар., 2013). Будући да РМА, fMLP и opZy индукују оксидативни прасак различитим сигналним путевима, а у складу са нашим резултатима, може се претпоставити да 10-HDA не модулише ову функцију неутрофила делујући на специфични сигнални пут, већ путем „сакупљања“ реактивних кисеоничних врста. Стога смо, имајући у виду да су главне реактивне кисеоничне врсте које неутрофили продукују $O_2^{\cdot-}$ (са последичним формирањем H_2O_2) и HOCl, испитали способност 10-HDA да реагује са овим реактивним кисеоничним врстама користећи системе без ћелија. Резултати које смо добили показују да 10-HDA има способност да „сакупља“, односно реагује са $O_2^{\cdot-}$ и HOCl, али нема утицаја на продукцију H_2O_2 . Литературних података о антиоксидативном ефекту 10-HDA готово да нема, осим већ споменутог рада (Zheng и сар., 2012), тако да је ово прва студија која показује директан антиоксидативни ефекат 10-HDA. То значи да и 10-HDA, као најзаступљенија масна киселина матичног млеча, доприноси антиоксидативној активности матичног млеча, а не само фенолне компоненте као што се то до сада сматрало (Melliou и Chinoц, 2005, Viuda-Martos и сар., 2008, Guo и сар., 2009). Такође, израчунали смо IC50 вредност и за $O_2^{\cdot-}$ (10,7mM) и за HOCl (6,8mM) и установили да је антиоксидативни капацитет 10-HDA релативно мали у поређењу са познатим антиоксидансима као што је витамин С чије су IC50 вредности у микроларним концентрацијама (Sharma и Bhat, 2009). Међутим, иако слаба, антиоксидативна активност ове масне киселине је довољна да модулира функцију неутрофила и смањи количину реактивних кисеоничних врста у овим ћелијама. Такође, милимоларне концентрације ове масне киселине могу бити достигнуте у серуму при уобичајеном конзумирању матичног млеча (Sugiyama и сар., 2012a).

Поједине супстанце које имају способност сакупљања реактивних кисеоничних врста могу да граде нека нова реактивна једињења која смањују антиоксидативни капацитет ћелија. Freitas и сар. (2013) су показали да ацетаминофен (парацетамол), иако испољава снажну моћ сакупљања H_2O_2 и HOCl, доводи до додатне деплеције глутатиона у неутрофилима стимулираним РМА. Ми смо, такође, детектовали смањење глутатиона после стимулације неутрофила РМА у односу на нестимулисане ћелије, а 10-HDA није променила степен ове деплеције.

Ово се може објаснити тиме што је РМА изузетно снажан фармаколошки активатор неутрофила и изазива огроман оксидативни стрес у овим ћелијама (Freitas и сар., 2013). Збога тога је, и поред антиоксидативног деловања ове масне киселине, потрошња глутатиона веома велика. Концентрација глутатиона у неутрофилима стимулираним орZу и fMLP без обзира на присуство или одсуство 10-HDA се није значајно променила.

Под нормалним условима, циркулишући хумани неутрофили имају кратак животни век у трајању од 7-12h, *in vivo*. Сматра се да неутрофили или мигрирају до слезине, јетре, па и костне сржи где бивају елиминисани (Martin и сар., 2003, Fox и сар., 2010) или напуштају циркулацију и настањују се у ткивима (Fox и сар., 2010). По обављању своје функције у ткиву, неутрофили подлежу спонтаној апоптози, која спречава неконтролисано „цурење“ токсичног садржаја ових ћелија (Fox и сар., 2010). Током инфламације животни век неутрофила се мења, смањује или продужава, у зависности од микроорганизама и околне средине у запаљењу, а у циљу побољшања имунског одговора ових ћелија. Показано је да поједини про-инфламаторни агенси (IFN- γ , TNF- α , LPS) (Haslett и сар., 1985, Haslett и сар., 1991, Witko-Sarsat и сар., 2011) и микроорганизми (*Chlamydia pneumoniae*) (van Zandbergen и сар., 2004) могу да дуплирају животни век неутрофила. С друге стране, добро је познато да РМА, као и инфекција *Streptococcus-om pneumoniae* драстично смањују животни век хуманих неутрофила, изазивајући апоптозу и NETозу (Takei и сар., 1996, Haslett, 1999, Mori и сар., 2012). Апоптоза неутрофила изазвана *Streptococcus-om pneumoniae* није последица одбрамбеног механизма ове бактерије, већ је то активни процес неутрофила у циљу побољшања имунског одговора (Haslett, 1999). Индукција апоптозе неутрофила након фагоцитозе микроорганизама смањује степен оштећења ткива и доприноси резолуцији запаљења (Kobayashi и сар., 2003b, Simons и сар., 2006).

Показали смо да 10-HDA у концентрацији од 0,5mM-2mM одлаже спонтану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви. Ово такође потврђује антиоксидативна својства 10-HDA, с обзиром да су реактивне кисеоничне врсте одговорне за спонтану апоптозу неутрофила (Kasahara и сар., 1997, Scheel-Toellner и сар., 2004, Xu и сар., 2010). Наиме, Scheel-Toellner и сар. (2004) су показали да

нагомилавање реактивних кисеоничних врста унутар неутрофила узрокује стварање церамида, кластерисање CD95 молекула независно од везивања лиганда и активацију каспазе 8. Сви ови догађаји уводе ћелију у апоптозу. Осим тога, антиоксиданси као што су N-ацетил-цистеин и десфериоксамин спречавају спонтану апоптозу хуманих неутрофила, што само потврђује улогу реактивних кисеоничних врста у овом процесу. Такође, хумани неутрофили дефицијентни у NADPH оксидази спорије подлежу апоптози (Kasahara и сар., 1997), а инкубација неутрофила у хипоксичним условима инхибира апоптозу (Mecklenburgh и сар., 2002).

Наши резултати су показали да 10-HDA поред спонтане инхибира и апоптозу индуковану стимулусима PMA, fMLP и opZy. Сматра се да и код индуковане апоптозе главну улогу имају реактивне кисеоничне врсте (Simon и сар., 2000, Maiani и сар., 2004, Witko-Sarsat и сар., 2011). Ранији резултати других аутора показују да сва три примењена стимулуса, на различите начине и у различитим временским интервалима, стимулишу апоптозу хуманих неутрофила (Colotta и сар., 1992, Takei и сар., 1996, Kettritz и сар., 1997, Schwartz и сар., 2012) Takei и сар. (1996) су показали да PMA у првим сатима стимулације индукује смрт хуманих неутрофила која се по неким својствима разликује од класичне апоптозе и некрозе, а праћена је појавом масивне интрацелуларне вакуолизације и мешањем једарног и цитоплазматског материјала (касније је установљено да је то процес NEToze (Brinkmann и сар., 2004)). Због ових различитих интрацелуларних промена тешко је мерити апоптозу неутрофила на основу морфолошких промена у једру у првим сатима након стимулације PMA. Стога је, према литературним подацима (Faddeel и сар., 1998, Freitas и сар., 2013), најбољи показатељ апоптозе неутрофила стимулираних PMA рано испољавање фосфатидил серина. Експресију овог молекула на површини неутрофила после двочасовне инкубације са PMA смо детектовали цитофлуориметријски користећи аннексин V alexa fluor 488 и PI. Показали смо да 10-HDA дозно зависно инхибира експресију фосфатидил серина индуковану деловањем PMA, при чему највећа примењена концентрација 10-HDA (2mM) смањује испољавање овог молекула за око 30%. PMA изазива апоптозу хуманих неутрофила механизмом који зависи од продукције реактивних кисеоничних врста (Faddeel и сар., 1998). Наиме, показано је да антиоксиданси: пирролидинтиокарбамат, N-ацетилцистеин, редуковани глутатион и диметилтиоуреја

(Takei и сар., 1996, Fadeel и сар., 1998), као и специфични инхибитор NADPH оксидазе, дифенилен-јодонијум (DPI), инхибирају апоптозу хуманих неутрофила стимулираних РМА (Fadeel и сар., 1998). Код особа које болују од CGD у којој постоји урођени поремећај у активности NADPH оксидазе, РМА није у стању да индукује експресију фосфатидил серина, односно да индукује апоптозу (Kasahara и сар., 1997). На основу ових података, може се закључити да 10-HDA испољава свој анти-апоптотски ефекат на РМА индуковану апоптозу хуманих неутрофила путем „сакупљања“ реактивних кисеоничних врста и смањења њихове концентрације.

Ми смо, такође, мерили апоптозу неутрофила после двадесетчетворочасовне инкубације са РМА у присуству или одсуству 10-HDA, флуороцитометријски, методом детектовања хиподиплоидног пика, бојењем ћелија PI. Резултати су показали да РМА узрокује појаву хиподиплоидног пика код 75%-80% неутрофила, без обзира на присуство или одсуство 10-HDA. Ово је било очекивано јер, као што је већ истакнуто, РМА изузетно снажно делује на неутрофиле изазивајући оксидативни прасак, NETозу и апоптозу. Наиме, показано је да не постоје вијабилни хумани неутрофили после само 6h инкубације са РМА (Takei и сар., 1996). Према томе 10-HDA током тако „дуге“ инкубације са РМА није у стању да инхибира ефекат овог фармаколошког агенса, већ доприноси бољем преживљавању ћелија само у првим сатима инкубације *in vitro* (у нашем систему 2h).

За разлику од РМА, fMLP није изазвао апоптозу неутрофила после 6h инкубације без обзира на присуство или одсуство 10-HDA. Ови резултати су у сагласности са налазима Kettritz и сар. (1997) који су показали да fMLP изазива апоптозу хуманих неутрофила у култури која је повезана са већом продукцијом $O_2^{\cdot-}$. Међутим, fMLP не изазива апоптозу неутрофила у првим сатима инкубације, као што је то случај са РМА и opZу, већ тек после 12h, а значајна разлика је показана тек након 24h. Бржи улазак у апоптозу „остарелих“ неутрофила је објашњен већом концентрацијом $O_2^{\cdot-}$, јер је показано да SOD инхибира улазак неутрофила у fMLP индуковану апоптозу (Kettritz и сар., 1997). Такође, други аутори су показали да N-ацетил цистеин који има способност „сакупљања“ $O_2^{\cdot-}$ (Westlin и Mullane, 1988, Villagrasa и сар., 1997, Allegra и сар., 2002, Stolarek и сар., 2002), инхибира апоптозу хуманих неутрофила изазвану fMLP (Milara и сар., 2012, Kose и Naziroglu, 2015).

Према томе, може се закључити да 10-HDA инхибира апоптозу хуманих неутрофила изазвану fMLP путем „сакупљања“ $O_2^{\cdot-}$.

Познато је да орZу стимулише апоптозу хуманих неутрофила већ у првим сатима након стимулације (Simons и сар., 2006, Schwartz и сар., 2012). Ово је један од примера апоптозе која је индукована фагоцитозом (Kobayashi и сар., 2002). Сохон и сар. (1996) су показали да фагоцитоза опсонизованих партикула узрокује апоптозу хуманих неутрофила која зависи од активности NADPH оксидазе, односно од продукције реактивних кисеоничних врста. Такође, хумани неутрофили подлежу апоптози и после ингестије *Escherichiae coli*, а N-ацетил-цистеин и редуковани глутатион инхибирају тај процес (Watson и сар., 1996, Fadeel и сар., 1998). Апоптоза неутрофила као последица фагоцитозе се не дешава код особа које болују од CGD (Kobayashi и Deleo, 2004, Kennedy и DeLeo, 2009). Све ово указује да су активност NADPH оксидазе и нагомилавање реактивних кисеоничних врста веома значајни за апоптозу која настаје као последица фагоцитозе (Savill и сар., 1989, Watson и сар., 1996, Kobayashi и сар., 2003a). Наши резултати су у сагласности са овим литературним подацима и показују да 10-HDA, највероватније утичући на смањење присуства реактивних кисеоничних врста, инхибира апоптозу хуманих неутрофила индуковану орZу, како у првим сатима (5h), тако и после 24h након стимулације.

Неутрофили ослобађају NET-ове у одговору на различите стимулусе као што су бројни микроорганизми и њихови продукти, хемијске супстанце и хемокини (Guimaraes-Costa и сар., 2012, Hahn и сар., 2013). Процес формирања NET-ова се назива NEToza, а овај процес је први описао Zilinsky (Brinkmann и сар., 2004). Често се под термином NEToza подразумева она форма која је повезана са ћелијском смрти тзв. суицидална NEToza (Steinberg и Grinstein, 2007). Осим ње, описана је и витална NEToza при којој не настаје лиза ћелија, већ су оне способне после избацивања једарног садржаја, да испољавају поједине функције карактеристичне за живе ћелије (Yipp и Kubes, 2013). NET-ови се састоје од мреже хроматина обогаћене бројним неутрофилним ензимима и протеинима (Urban и сар., 2009). Будући да ослобађање NET-ова најчешће зависи од активности NADPH оксидазе и продукције реактивних кисеоничних врста (Nishinaka и сар., 2011, Kirchner и сар., 2012, Palmer и сар., 2012), молекули који смањују њихову продукцију би могли да инхибирају

процес NEToze. Полазећи од ових претпоставки, а на основу претходно добијених резултата, у следећем низу експеримената смо испитали утицај 10-HDA на процес NEToze. Наши резултати су показали да 10-HDA, дозно-зависно, инхибира NETozi хуманих неутрофила периферне крви стимулираних РМА, што је било у складу са нашим очекивањима.

Процес NET-oze је веома важан механизам у одбрани домаћина од инфекције због тога што омогућава хватање и убијање микроорганизама (Brinkmann и сар., 2004). Међутим, појачано излагање сопствене DNK и оштећених протеина неутрофилних гранула имунском систему домаћина, може бити штетно. Наиме, NET-oza се повезује са етиопатогенозом појединих аутоиминских болести као што су васкулитис малих крвних судова, SLE, псоријаза и реуматоидни артритис (Kessenbrock и сар., 2009, Lande и сар., 2011, Brinkmann и Zychlinsky, 2012, Saffarzadeh и Preissner, 2013), али и других патолошких стања (Clark и сар., 2007, Narasaraju и сар., 2011, Caudrillier и сар., 2012). У овим болестима и стањима, 10-HDA би могла, инхибирањем NEToze, да допринесе корисним терапијским ефектима.

Механизам NEToze је сложен процес који зависи од различитих стимулуса. Будући да су описани бројни индуктори овог процеса претпоставља се да постоји више од једног пута који узрокује NETozi. До данас, већина стимулатора NEToze је показала зависност од активности NADPH оксидазе и продукције реактивних кисеоничних врста, као и активности MPO (Fuchs и сар., 2007, Papayannopoulos и Zychlinsky, 2009, Remijssen и сар., 2011, Keshari и сар., 2012, Kirchner и сар., 2012, Palmer и сар., 2012, Parker и сар., 2012, Parker и Winterbourn, 2012). Ово је показано у неколико студија у којима су коришћени инхибитори оксидазе, NADPH *knockout* мишеви или неутрофили пацијената са CGD чија NADPH оксидаза није функционална (Stasia и Li, 2008). Инхибиција продукције реактивних кисеоничних врста инхибитором NADPH оксидазе, коа што је DPI, спречава NETozi изазвану РМА (Fuchs и сар., 2007, Remijssen и сар., 2011, Kirchner и сар., 2012, Arazna и сар., 2015), бактеријама (Parker и сар., 2012), LPS (Yost и сар., 2009) и компонентом комплемента 5a (C5a) после преинкубације GM-CSF (Yousefi и сар., 2009). Осим тога, неутрофили пацијената са CGD не подлежу процесу NEToze после

стимулације РМА (Nishinaka и сар., 2011), бактеријама (Fuchs и сар., 2007) или горе наведеном комбинацијом GM-CSF и C5a (Yousefi и сар., 2009). Међутим, егзогено додавање H_2O_2 (Fuchs и сар., 2007) као и примена генске терапије, која враћа функцију NADPH оксидазе (Bianchi и сар., 2009), омогућава неутрофилима да формирају NET-ове. Такође, Ermert и сар. (2009) су, користећи генетски различите сојеве мишева (SJL/J, PL/J, CZECHII/EiJ, C57Bl/6, 129S2, CD1, BALB/c), показали да степен NEToze корелира са количином продукованих реактивних кисеоничних врста. Резултати неколико студија указују да је егзогено додавање H_2O_2 довољно да изазове NETozu (Fuchs и сар., 2007, Neeli и сар., 2009, Lim и сар., 2011). Међутим, само додавање оксиданса и мерење интензитета NEToze не даје довољно доказа да је искључиво H_2O_2 одговоран за овај процес. У активираним неутрофилима највећа количина H_2O_2 , веома брзо, под деловањем МРО, прелази у HOCl (Winterbourn и Kettle, 2013). Стога би важнији фактор за процес NEToze била нормална активност МРО и продукција HOCl што је и показано у бројним радовима (Metzler и сар., 2011, Akong-Moore и сар., 2012, Kirchner и сар., 2012, Palmer и сар., 2012, Parker и сар., 2012). Наиме, инхибиција МРО смањује степен формирања NET-ова индукованих РМА. Поред тога, неутрофили МРО-дефицијентних особа имају смањену способност формирања NET-ова после стимулације РМА. Metzler и сар. (2011) су показали да интензитет NEToze корелира са степеном МРО-дефицијенције и да хумани неутрофили комплетно дефицијентни у МРО не могу да формирају NET-ове. Међутим, додавање HOCl МРО-дефицијентним хуманим неутрофилима, као и неутрофилима у којима је инхибирана МРО, има за последицу формирање NET-ова (Akong-Moore и сар., 2012, Palmer и сар., 2012). На основу ових налаза, ми претпостављамо да 10-HDA инхибира процес NEToze тако што смањује количину реактивних кисеоничних врста у неутрофилима после стимулације РМА. Наша претпоставка о механизму деловања 10-HDA на NETozu је у сагласности са студијом Kirchner и сар. (2013) који су проучавали утицај неколико супстанци са антиоксидативним својствима на способност хуманих неутрофила стимулираних РМА да продукују реактивне кисеоничне врсте и да формирају NET-ове. Наиме, ови аутори су показали да флавоноиди (епикатехин, катехин хидрат, рутин трихидрат), 5-аминосалицилна киселина (5-ASA), N-ацетилцистеин и витамин С инхибирају NETozu хуманих неутрофила стимулираних РМА. Инхибиторни ефекат ових супстанци је био уско повезан са њиховом способношћу да смање продукцију

реактивних кисеоничних врста. С обзиром да је за све ове супстанце показано да имају способност да сакупљају поједине реактивне кисеоничне врсте попут $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $HOCl$ (Aruoma и сар., 1988, Aruoma и сар., 1989, Tamai и сар., 1991, Punchard и сар., 1992, Nielsen и сар., 1993, Allgayer и сар., 1994, Vanderbist и сар., 1996, Peskin и Winterbourn, 2001, Selloum и сар., 2001, Van Antwerpen и сар., 2005, Baltazar и сар., 2011), аутори су закључили да је то кључни механизам њиховог деловања на NETозу. Осим тога, супстанце као што су токоферол, уреа, ацетилсалицилна киселина, које нису показале значајан инхибиторни ефекат на продукцију реактивних кисеоничних врста нису испољиле ни инхибиторни ефекат на ослобађање NET-ова (Kirchner и сар., 2013).

Табела 6. Молекуларни механизми деловања 10-HDA

Имуномодулаторна активност	Молекуларни механизам	Референце
Инхибиција продукције индуковане LPS	IL-6 Инхибиција индукције IκB-ζ	(Sugiyama и сар., 2012b)
Инхибиција продукције оксида индуковане LPS	азот Инхибиција активације NF-κB	(Sugiyama и сар., 2013)
Инхибиција продукције оксида индуковане IFN-γ	азот Инхибиција индукција IRF-8	(Takahashi и сар., 2012)
Инхибиција пролиферације лимфоцита	T Инхибиција продукције IL-2 и експресије рецептора за IL-2	(Vucevic и сар., 2007)
Инхибиција продукције матриксних металопротеиназа индуковане са TNF-α	Инхибиција активације p38 и JNK	(Yang и сар., 2010)
Реактивација супримиране експресије Fas гена	епигенетски Инхибиција HDAC	(Spannhoff и сар., 2011)
Инхибиција пролиферације синовиоцита фибробластима	сличних Инхибиција PI3K–АКТ пута	(Wang и сар., 2015)

Ми смо показали да 10-HDA испољава антиоксидативна својства способношћу да „сакупља“ поједине реактивне кисеоничне врсте ($O_2^{\cdot-}$ и $HOCl$).

Међутим, ова масна киселина је средњеланчана (10 С атома) и као таква лако пролази све ћелијске мембране. Познато је да масне киселине имају своје рецепторе на површини ћелија и интрацелуларно и могу специфично или неспецифично да реагују са бројним сигналним молекулима и на тај начин мењају ћелијску функцију (Gearing и сар., 1994, Vocos и сар., 1995, Wolfrum, 2007, Brownlie и сар., 2008, Huang и сар., 2014, Tomita и сар., 2014). Вероватно да је „сакупљање“ реактивних кисеоничних врста кључни механизам којим ова масна киселина делује на неутрофиле, што не искључује постојање и других који су укључени у модулацију функције неутрофила и других ћелија. Ову претпоставку су потврдила наша истраживања на PBMNC и MoDC, а у складу са њом су и подаци из других научних радова (Табела 6). Управо ови додатни механизми би могли да објасне постојање дискретне разлике у ефекту 10-HDA на неутрофиле стимулисане различитим стимулусима (PMA, fMLP, opZy).

Имуномодулаторна активност 10-HDA

У даљем току истраживања проучавали смо ефекат 10-HDA на пролиферацију и продукцију цитокина од стране PBMNC стимулираних PNA *in vitro*. Желели смо да сагледамо како би 10-HDA могла да делује на стечени имунски одговор код људи, будући да се наши претходни резултати и литературни подаци односе на урођену имуност. Овај *in vitro* модел смо изабрали јер омогућава интеракцију различитих ћелија периферне крви и најверније одсликава оно што се дешава *in vivo*. С обзиром да смо у прелиминарним експериментима увидели да је максималан ефекат 10-HDA на пролиферацију PBMNC постигнут концентрацијом од 500 μ M, одлучили смо да ту концентрацију, као највећу, користимо у даљим истраживањима. Показали смо да 10-HDA у концентрацији од 500 μ M значајно инхибира пролиферацију PBMNC. Овај ефекат није био последица ћелијске апоптозе. Будући да је PNA познати митоген Т лимфоцита (Sofuni и Yoshida, 1992, Movafagh и сар., 2011), претпоставили смо да ова масна киселина, заправо, инхибира пролиферацију Т лимфоцита. Антипролиферативни ефекат компонената матичног млека, као и 10-HDA су већ описани (Gasic и сар., 2007, Vucevic и сар., 2007). Полазећи од ових сазнања, као следећи логичан корак наметнуло се мерење концентрације IL-2 у супернатантима PBMNC култура, с обзиром да је овај цитокин

главни фактор раста Т лимфоцита (Mookerjee и Pauly, 1990, Zhu и сар., 2010). У сагласности са очекивањима, показали смо да је инхибиција пролиферације PBMNC корелирала са смањеном продукцијом IL-2. Такође, поред смањене продукције овог цитокина, могуће је да 10-HDA инхибира и експресију рецептора за IL-2, као што је већ раније показано на пацовским Т лимфоцитима слезине (Vucevic и сар., 2007).

Иако су анти-инфламаторни ефекти матичног млека описани у неколико студија (Егет и сар., 2006, Manноог и сар., 2009, Караса и сар., 2010), мало се зна о доприносу масних киселина матичног млека у овим ефектима. До сада је описано да 10-HDA инхибира продукцију TNF- α индуковану IFN- β и IFN- γ (Takahashi и сар., 2012, Sugiyama и сар., 2013), као и продукцију IL-6 индуковану LPS од стране мишјих макрофага (Sugiyama и сар., 2012b). Ми смо у овом истраживању показали да висока концентрација 10-HDA (500 μ M) инхибира продукцију TNF- α и IL-1 β од стране хуманих PBMNC стимулираних PHA, а не утиче на продукцију IL-6. С обзиром да продукција и TNF- α и IL-1 β захтева активацију NF- κ B (Vallabhanagaru и Karin, 2009), чини се вероватним да 10-HDA модулира сигнални пут повезан са овим транскрипционим фактором. На основу резултата експеримената на мишјим макрофагима могло би се претпоставити да ова масна киселина инхибира пре NF- κ B зависне гене него целокупну активност овог транскрипционог фактора. У прилог овој хипотези иде чињеница да 10-HDA нема ефекта на LPS-индуковану експресију IFN- β у RAW264 ћелијама за коју је NF- κ B транскрипциони фактор неопходан (Sugiyama и сар., 2012b, Sugiyama и сар., 2013). Sugiyama и сар. (2012b) су показали да 10-HDA инхибира LPS-индуковану продукцију IL-6, али не и TNF- α од стране мишјих макрофага тако што инхибира I κ B- ζ експресију (члан I κ B фамилије који је део активног NF- κ B комплекса (Li и Verma, 2002)), а последично и транскрипцију оних gena који зависе од I κ B- ζ . Ово неслагање у односу на наше резултате (инхибирана продукција TNF- α и непромењена продукција IL-6) би се могло објаснити разликама које постоје између врста (миш и човек), као и различитим ћелијама које су присутне у PBMNC, а које могу додатно да утичу на продукцију ових цитокина. На пример, иако су моноцити/макрофаги главни извор IL-6, доказано је и да одређене поткласе Т лимфоцита (нпр. Th2 лимфоцити) могу да секретују овај цитокин (Zubiaga и сар., 1990).

Следећи циљ истраживања у овом сегменту је био да осим утицаја на пролиферацију и продукцију проинфламаторних цитокина сагледмо и ефекте 10-HDA на Th поларизацију имунског одговора. Описано је неколико типова Th лимфоцита као што су Th1, Th2, Th17 и Treg. Главни цитокин Th1 лимфоцита је IFN- γ , док Th2 лимфоцити продукују IL-4, IL-5 и IL-13. Трећа ефекторска популација CD4⁺ T лимфоцита, Th17 лимфоцити, секретује IL-17A и IL-22. Th1 лимфоцити имају важну улогу у одбрани организма од интрацелуларних микроорганизама, док Th2 лимфоцити штите од хелмината. Th17 лимфоцити су значајни у борби против гљивица и екстрацелуларних бактерија. Поред ових корисних ефеката, сматра се да су Th1 и Th17 лимфоцити укључени у настанак многих аутоимунских болести, док Th2 лимфоцити учествују у патогенези алергијских реакција. Treg лимфоцити, који доминантно продукују IL-10 и TGF- β , су важни у одржавању толеранције на сопствене антигене, као и у модулацији имунског одговора у току инфламације (Romagnani и сар., 2009, Zhu и сар., 2010). У нашим истраживањима смо показали да висока концентрација 10-HDA (500 μ M) значајно инхибира Th1 и Th2 имунски одговор за разлику од ниске концентрације (50 μ M) која не испољава значајан модулаторни ефекат на Th имунски одговор. Инхибиторни ефекат високе концентрације 10-HDA на Th1 и Th2 имунски одговор може бити последица директног деловања на T лимфоците, али и индиректног деловања на антиген-презентујуће ћелије, међу којима су DC кључне у покретању и регулацији Th имунског одговора (Banchereau и Steinman, 1998). У прилог овој претпоставци је и наш налаз да ова масна киселина делује инхибиторно на Th1 и Th2 имунски одговор у ко-култури MoDC, претходно третираних са 500 μ M 10-HDA, и алогених CD4⁺ T лимфоцита.

У наредном делу ове студије смо, имајући у виду претходне резултате, на моделу хуманих PBMNC, хтели детаљније да испитамо имуномодулаторну активност 10-HDA. Користили смо хумане MoDC будући да представљају *in vitro* еквивалент мијелоидним DC које су најпотентнији регулатори имунског одговора (Colic и сар., 2003, Conti и Gessani, 2008, Buckwalter и Albert, 2009). DC покрећу и усмеравају стечени имунски одговор и чине спону између урођене и стечене имуности (Guermonprez и сар., 2002, Steinman и Hemmi, 2006, Buckwalter и Albert, 2009). Најпре смо испитали утицај 10-HDA на преживљавање, вијабилност и

апоптозу МоDC и показали да 10-HDA у концентрацији од 50-500 μ М не утиче на наведене процесе.

За испитивање матурационе и алостимулаторне способности МоDC користили смо незреле МоDC. Ове ћелије се одликују ниском експресијом HLA-DR и ко-стимулаторних молекула, као и одсуством CD83 молекула. Такође, успешан процес диференцијације праћен је „нестанком“ CD14 молекула (који је обележје моноцита) (Banchereau и Steinman, 1998, Steinman и Hemmi, 2006, Conti и Gessani, 2008). Процес матурације је веома важан за адекватну функцију МоDC. Многи стимулуси могу да индукују матурацију ових ћелија *in vitro* као што су проинфламаторни медијатори (IL-1 β , PGE2, IL-6, TNF- α) и бактеријски продукти попут LPS (De Smedt и сар., 1996, Steinman и Hemmi, 2006). Такође, показано је и да лигација CD40 молекула додавањем CD40L може да стимулише матурацију ових ћелија (Fujii и сар., 2004). Зреле МоDC се карактеришу повећаном мембранском експресијом MHC молекула класе II, ко-стимулаторних (CD80, CD86) и адхезивних молекула (CD40, CD54), као и појавом CD83 молекула (Steinman и Hemmi, 2006, Dalod и сар., 2014). У нашем експерименталном моделу третман МоDC са 10-HDA (500 μ М) током процеса матурације спречава пораст експресије MHC молекула класе II, CD40, CD86 и CD83 молекула. Истовремено, ниска концентрација ове масне киселине (50 μ М) не мења значајно експресију ни једног испитиваног молекула. Ови резултати указују да 10-HDA у концентрацији од 500 μ М спречава процес сазревања МоDC који је изузетно важан за ко-стимулаторну активност ових ћелија укључујући стимулацију пролиферације и клонску експанзију антиген-специфичних Т лимфоцита (Guermontprez и сар., 2002, Savina и Amigorena, 2007). CD40 молекул је неопходан за финалну матурацију МоDC у присуству Т лимфоцита, у чему кључну улогу има интеракција CD40–CD40L (Fujii и сар., 2004). Полазећи од наведеног, претпостављамо да би смањена пролиферација алогених CD4⁺ Т лимфоцита у ко-култури са 10-HDA-претретираним МоDC могла бити последица утицаја ове масне киселине на ко-стимулаторну функцију МоDC.

Наши резултати који се односе на Th поларизациону способност МоDC су показали да МоDC третиране ниском концентрацијом 10-HDA (50 μ М) стимулишу Th1 имунски одговор. Овај закључак се намеће на основу повећане концентрације

IFN- γ , а смањене концентрације IL-4 у супернатантима ко-култура 10-HDA-третираних MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита у односу на контролне ко-културе. Међутим, стимулација Th1 имунског одговора није била праћена повећаном продукцијом IL-12, цитокина који је изузетно важан за диференцијацију Th1 лимфоцита, од стране MoDC (Snijders и сар., 1998). Једно од објашњења овог, наизглед нелогичног налаза, би могла бити могућност да је MoDC за секрецију IL-12 потребна стимулација, односно активација у контакту са Т лимфоцитима која се дешава интеракцијом CD40–CD40L. У сагласности са овом претпоставком је налаз Dzopalic и сар. (2010) да MoDC које слабо продукују IL-12, а добри су стимулатори IFN- γ , након апликација CD40L тј. активације CD40–CD40L сигналног пута значајно више продукују IL-12 и додатно стимулишу продукцију IFN- γ у ко-културама са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима. Истовремено, смањена концентрација IL-4 би могла бити последица инхибиторног ефекта IFN- γ на Th2 лимфоците (Schroder и сар., 2004) и реципрочне регулације Th1 и Th2 имунског одговора (Glimcher и Murphy, 2000). Ми смо показали да висока концентрација 10-HDA (500 μ M) значајно инхибира продукцију IL-12, IL-18 и TNF- α од стране LPS-стимулисаних MoDC. Инхибиција продукције ових цитокина је допринела смањењу алостимулаторне (инхибиција пролиферације) и Th поларизационе (смањена продукција IFN- γ , IL-2 и IL-4 у ко-културама MoDC и CD4⁺ Т лимфоцитима) способности MoDC третираних са 10-HDA.

Занимљиво је да 10-HDA, како у ниским тако и у високим концентрацијама, смањује продукцију IL-10 у културама хуманим MoDC. Овај резултат није у сагласности са резултатима добијеним у експериментима на DC слезине пацова који показују да 10-HDA стимулише продукцију IL-10 у културама ових ћелија (Vucevic и сар., 2007). Ова разлика би могла да се објасни друкчијим сигналним путевима који учествују у продукцији овог цитокина у пацовским и хуманим DC или специфичним ефектом 10-HDA на продукцију IL-10.

Генерално, механизам којим 10-HDA испољава своју имуномодулаторну активност није довољно јасан. Предходне студије су показале да су транскрипциони фактор NF- κ B (Sugiyama и сар., 2012b, Takahashi и сар., 2012, Sugiyama и сар., 2013), као и p38-AP-1, JNK-AP-1 (Yang и сар., 2010) и PI3K–AKT (Wang и сар., 2015)

сигнални путеви укључени у ове процесе. Ова масна киселина не инхибира LPS индуковану деградацију I κ B α и фосфорилацију I κ B киназе алфа (IKK α), али блокира продукцију I κ B- ζ , компоненту активног NF- κ B комплекса у RAW264 ћелијама (Sugiyama и сар., 2012b). Овај феномен је праћен значајним смањењем продукције IL-6, липокалина 2 и G-CSF. NF- κ B је транскрипциони фактор који има кључну улогу у урођеној и стеченој имуности (Li и Verma, 2002, Liou, 2002, Vallabhanurari и Karin, 2009). Он је укључен у регулацију експресије различитих цитокина укључујући IL-12 и TNF- α (Li и Verma, 2002). Показано је да је инхибиција активације NF- κ B један од најважнијих механизма антиинфламаторних активности различитих природних производа (Park и сар., 2013, Vo и Kim, 2013). У намери да испитамо улогу ових путева у сигнаlima који се покрећу након деловања 10-HDA на хумане MoDC користили смо инхибиторе BAY 11-7082 и LY294002. Показали смо да BAY 11-7082, специфични инхибитор I κ B α фосфорилације (Lee и сар., 2012) смањује продукцију IL-12 за 80%, а TNF- α за 85%. Додавањем 10-HDA додатно је смањена продукција оба цитокина, што указује да и други молекули у NF- κ B сигналном путу могу бити укључени у овај процес. Један од њих би могао бити I κ B- ζ који регулише експресију појединих NF- κ B зависних гена укључујући гене за IL-12, IL-18, IL-6, као и IFN- γ (Kannan и сар., 2011). Изгледа да I κ B- ζ није укључен у транскрипцију гена за TNF- α (Sugiyama и сар., 2012b), међутим описано је да TNF- α пролонгира експресију I κ B- ζ у хуманим NK ћелијама (Kannan и сар., 2011). Takahashi и сар. (2012) су показали да 10-HDA инхибира продукцију азот оксида и TNF- α у RAW264 ћелијама стимулираним IFN- γ и установили да је регулаторни фактор интерферона 8 (IRF-8) укључен у овај процес. Према томе, остаје нејасно да ли 10-HDA користи сличне механизме за смањење продукције IL-12 и TNF- α у присуству LPS као и BAY 11-7082, и да ли постоји посебан молекул у оквиру NF- κ B сигналног пута на који ова масна киселина специфично делује или је по среди неспецифична интеракције са више молекула. Pollet и сар. (2002) су показали да дериват 10-HDA (diHDA-glycerol) подстиче пренос сигнала у NF- κ B путу у мијелоидној ћелијској линији U397 тако што стимулише протеолизу I κ B α . Ефекат ниске концентрације 10-HDA на MoDC у нашем истраживању је у сагласности са овим резултатима. Блокирање NF- κ B сигналног пута може се такође повезати са инхибицијом експресије ко-стимулаторних молекула на MoDC (Grohmann и сар., 1998, Kojima и сар., 1999).

Недавно су Wang и сар. (2015) показали да 10-HDA супримира пролиферацију синовиоцита сличних фибробластима пацијената са реуматоидним артритисом тако што инхибира експресију седам гена укључених у PI3K–АКТ сигнални пут. Аутори су овај ефекат 10-HDA повезали са њеном способношћу да инхибира ензим HDAC (Spannhoff и сар., 2011). Овај ензим има веома важну улогу у регулацији транскрипције гена тако што каталише уклањање ацетилне групе са лизинских остатака хистона, чиме доприноси кондензацији хроматина (Gillespie и сар., 2012). Наши резултати су показали да инхибиција PI3K делимично супримира продукцију IL-12 и TNF- α у LPS-третираних MoDC. Међутим, додавање 10-HDA у потпуности неутралише овај ефекат. Могуће је да ова масна киселина, инхибирајући HDAC неутралише дејство инхибитора PI3K или стимулише друге сигналне путеве. То ће бити предмет наших будућих истраживања. Инхибиција HDAC се може повезати и са ефектима 10-HDA у нашим експерименталним моделима. Наиме, Gillespie и сар. (2012) су показали да трихостатин А, познати инхибитор HDAC, инхибира продукцију TNF- α , IL-6 и IFN- γ у хуманим PBMNC стимулираним LPS. Осим тога, још један инхибитор HDAC, сулфорафан, инхибира матурацију свињских LPS-стимулисаних MoDC, смањујући експресију CD80, CD86 и CD40 молекула. Сулфорафан, такође, инхибира и продукцију TNF- α и IL-1 β у овим ћелијама (Mukhopadhyay и сар., 2015).

У нама доступној литератури нема података који показују директно везивање 10-HDA за појединачни молекул. Добро је познато да масне киселине испољавају већину својих активности делујући као природни лиганди за рецепторе повезане са G протеином (GPR40, GPR43, GPR84 и GPR120), као и за неколико транскрипционих фактора као што су PPARs (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptors*), SREBPs (енгл. *sterol regulatory element-binding proteins*) и X рецептори јетре (Georgiadi и Kersten, 2012). PPAR γ је члан породице једарних рецептора који се активирају различитим ендогеним и егзогеним масним киселинама (da Rocha Junior и сар., 2013). Malaraка и сар. (2012) су показали да је деканоична киселина директни лиганд PPAR γ молекула и делимично активира овај рецептор. PPAR γ агонисти смањују продукцију проинфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6) у хуманим моноцитима стимулираним PMA (Jiang и сар., 1998) и инхибирају експресију TNF- α и активацију NF- κ B у свињским PBMNC (Kim и сар., 2011). Лигација PPAR γ такође

супримира продукцију IL-2, IFN- γ , IL-4 и IL-5 у Т лимфоцитима (da Rocha Junior и сар., 2013). На основу ових резултата ми претпостављамо да 10-HDA испољава своју имуномодулаторну активност делујући претежно преко PPAR γ . Међутим, у нашем истраживању није дошло до промене у продукцији IL-6 и IL-17A иако PPAR γ агонисти узрокују смањење секреције ових цитокина (Jiang и сар., 1998, Klotz и сар., 2009, da Rocha Junior и сар., 2013). Ово би могло да се објасни налазима да су средњеланчане масне киселине ниско-потентни агонисти PPAR γ (Liberato и сар., 2012), па је и нето ефекат различит од других агониста. Осим тога, посматрајући ефекат 10-HDA на функцију неутрофила, претрагом доступне литературе, нисмо успели да пронађемо везу између лигације PPAR γ молекула и функције неутрофила. Због тога би било веома значајно да се испита директан ефекат 10-HDA на активност PPAR γ у наредним истраживањима, али и веза овог молекула са различитим функцијама неутрофила. С друге стране, постоји могућност да 10-HDA испољава свој ефекат на MoDC и PBMNC тако што смањује количину реактивних кисеоничних врста који могу да настану при хелијској активацији. Наиме, Rutault и сар. (1999) су показали да реактивне кисеоничне врсте стимулишу матурацију MoDC, као и њихову алостимулаторну способност. Сви ови ефекти су били успешно блокирани антиоксидансом N-ацетил цистеином.

Очигледно је да објашњење имуномодулаторних ефеката 10-HDA није лако и да ће бити потребно још много истраживања како би се објаснили молекуларни механизми деловања не само ове масне киселине, већ и осталих, структурно различитих, средњеланчаних масних киселина.

Закључак

На основу добијених резултата можемо закључити да:

А) 10-HDA у концентрацијама од 1mM до 2mM

- смањује степен оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA, fMLP и opZy
- одлаже спонтану и PMA-, fMLP- и opZy-индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви
- испољава инхибиторни ефекат на NETozi хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA
- испољава директно антиоксидативно дејство неутралишући ефекте $O_2^{\bullet-}$ и HOCl

Б) 10-HDA у концентрацији од 0,5mM

- инхибира пролиферацију хуманих PBMNC стимулираних PMA
- смањује продукцију проинфламаторних цитокина, IL-1 β и TNF- α , у култури PBMNC стимулираних PMA
- инхибира Th1 и Th2 имунски одговор у култури PBMNC стимулираних PMA

В) 10-HDA у концентрацији од 0,5mM

- инхибира матурацију и алостимулаторну способност LPS-стимулираних MoDC, као и продукцију IL-12, IL-18 и TNF- α од стране ових ћелија
- супримира Th1 и Th2 имунски одговор у ко-култури MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита

Г) 10-HDA у концентрацији од 50 μ M

- испољава благо имуностимулаторно дејство подстичући Th1, а инхибирајући Th2 имунски одговор у ко-култури MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита

Литература

- Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr* 1999; 81 Suppl 1:S1-27.
- Akong-Moore, K., Chow, O. A., Von Kockritz-Blickwede, M. & Nizet, V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS One* 2012; 7:e42984.
- Albert, S. & Klaudiny, J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology* 2004; 50:51-9.
- Allegra, L., Dal Sasso, M., Bovio, C., Massoni, C., Fonti, E. & Braga, P. C. Human neutrophil oxidative bursts and their in vitro modulation by different N-acetylcysteine concentrations. *Arzneimittelforschung* 2002; 52:669-76.
- Allen, L.-a. H. Immunofluorescence and Confocal Microscopy of Neutrophils. 2014; 1124:251-268.
- Allgayer, H., Rang, S., Klotz, U., Bohne, P., Retey, J., Kruis, W. & Gugler, R. Superoxide inhibition following different stimuli of respiratory burst and metabolism of aminosalicylates in neutrophils. *Dig Dis Sci* 1994; 39:145-51.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:459-89.
- Antinelli, J.-F., Zeggane, S., Davico, R., Rognone, C., Faucon, J.-P. & Lizzani, L. Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chemistry* 2003; 80:85-89.
- Arazna, M., Pruchniak, M. P. & Demkow, U. Reactive Oxygen Species, Granulocytes, and NETosis. *Adv Exp Med Biol* 2015; 836:1-7.
- Arruda, M. A. & Barja-Fidalgo, C. NADPH oxidase activity: In the crossroad of neutrophil life and death. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14:4546-56.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. & Butler, J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988; 256:251-5.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. & Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:593-7.
- Askenasy, N., Kaminitz, A. & Yarkoni, S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7:370-5.
- Aslan, A., Cemek, M., Buyukokuroglu, M. E., Altunbas, K., Bas, O. & Yurumez, Y. Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:2554-9.
- Aune, T. M., Collins, P. L. & Chang, S. Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology* 2009; 126:299-305.

- Azab, K. S., Bashandy, M., Salem, M., Ahmed, O., Tawfik, Z. & Helal, H. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. *N Am J Med Sci* 2011; 3:268-76.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D. & Nauseef, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397:342-4.
- Bailey, S. R., Nelson, M. H., Himes, R. A., Li, Z., Mehrotra, S. & Paulos, C. M. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 2014; 5:276.
- Ballali, S. & Lanciari, F. Functional food and diabetes: a natural way in diabetes prevention? *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63 Suppl 1:51-61.
- Baltazar, M. T., Dinis-Oliveira, R. J., Duarte, J. A., Bastos, M. L. & Carvalho, F. Antioxidant properties and associated mechanisms of salicylates. *Curr Med Chem* 2011; 18:3252-64.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B. & Palucka, K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 2000; 18:767-811.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A. & Henriques-Normark, B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006; 16:401-7.
- Berenson, L. S., Ota, N. & Murphy, K. M. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunol Rev* 2004; 202:157-74.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A. & Reichenbach, J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009; 114:2619-22.
- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C. A., Luengo, M. B. & Queiroz, M. L. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:679-88.
- Bocos, C., Gottlicher, M., Gearing, K., Banner, C., Enmark, E., Teboul, M., Crickmore, A. & Gustafsson, J. A. Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53:467-73.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. & Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:64-76.
- Bogdanov, S. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids* 2011; 3:8-19.
- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33:657-70.

- Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89:3503-21.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Lollike, K. & Sengelov, H. Ca(2+)-dependent translocation of cytosolic proteins to isolated granule subpopulations and plasma membrane from human neutrophils. *FEBS Lett* 1992; 304:195-7.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Diamond, M. S., Springer, T. A., Anderson, H. C., Kishimoto, T. K. & Bainton, D. F. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1994; 56:80-7.
- Borregaard, N., Sorensen, O. E. & Theilgaard-Monch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007; 28:340-5.
- Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:180-90.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532-5.
- Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198:773-83.
- Brownlie, R., Mayers, R. M., Pierce, J. A., Marley, A. E. & Smith, D. M. The long-chain fatty acid receptor, GPR40, and glucolipotoxicity: investigations using GPR40-knockout mice. *Biochem Soc Trans* 2008; 36:950-4.
- Buchanan, J. T., Simpson, A. J., Aziz, R. K., Liu, G. Y., Kristian, S. A., Kotb, M., Feramisco, J. & Nizet, V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006; 16:396-400.
- Buckwalter, M. R. & Albert, M. L. Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr Biol* 2009; 19:R355-61.
- Bullock, R. J., Rohan, A. & Straatmans, J. A. Fatal royal jelly-induced asthma. *Medical Journal of Australia* 1994; 160:44.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. & Erler, S. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2014; 89:255-69.
- Campanelli, D., Detmers, P. A., Nathan, C. F. & Gabay, J. E. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* 1990; 85:904-15.

- Canny, G. & Levy, O. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and BPI homologs at mucosal sites. *Trends Immunol* 2008; 29:541-7.
- Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B. M., Nguyen, J. X., Marques, M. B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z. & Looney, M. R. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012; 122:2661-71.
- Çavuşoğlu, K., Yapar, K. & Yalçın, E. Royal Jelly (Honey Bee) Is a Potential Antioxidant Against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice. *Journal of Medicinal Food* 2009; 12:1286-1292.
- Cemek, M., Aymelek, F., Büyükkuroğlu, M. E., Karaca, T., Büyükben, A. & Yılmaz, F. Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48:2827-2832.
- Chen, Y. & Junger, W. G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; 844:115-24.
- Cherniack, E. P. Bugs as drugs, Part 1: Insects: the "new" alternative medicine for the 21st century? *Altern Med Rev* 2010; 15:124-35.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., Mcavoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H. & Kuberski, P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13:463-9.
- Colic, M., Jandric, D., Stojic-Vukanic, Z., Antic-Stankovic, J., Popovic, P., Vasilijic, S., Milosavljevic, P. & Balint, B. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro using granulocyte-macrophage colony stimulating factor and low concentration of interleukin-4. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60:531-8.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. & Mantovani, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80:2012-20.
- Conti, L. & Gessani, S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 2008; 213:859-70.
- Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J. & Skaar, E. P. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 2008; 319:962-5.
- Cossarizza, A., Ferraresi, R., Troiano, L., Roat, E., Gibellini, L., Bertoncelli, L., Nasi, M. & Pinti, M. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced

-
- glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc* 2009; 4:1790-7.
- Coxon, A., Rieu, P., Barkalow, F. J., Askari, S., Sharpe, A. H., Von Andrian, U. H., Arnaout, M. A. & Mayadas, T. N. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* 1996; 5:653-66.
- Crome, S. Q., Wang, A. Y. & Levings, M. K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 159:109-19.
- Da Rocha Junior, L. F., Dantas, A. T., Duarte, A. L., De Melo Rego, M. J., Pitta Ida, R. & Pitta, M. G. PPARgamma Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us? *PPAR Res* 2013; 2013:519724.
- Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H. & Simon, M. C. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 2003; 4:1029-36.
- Dahlgren, C. & Stendahl, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1983; 39:736-41.
- Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* 2014; 33:1104-16.
- De Jong, E., Suddason, T. & Lord, G. M. Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin Exp Immunol* 2010; 159:148-58.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O. & Moser, M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:1413-24.
- Doering, D. C., Borowicz, J. L. & Crockett, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 2003; 3:3.
- Dzopalic, T., Dragicevic, A., Vasilijic, S., Vucevic, D., Majstorovic, I., Bozic, B., Balint, B. & Colic, M. Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability. *Int Immunopharmacol* 2010; 10:1428-33.
- Erem, C., Deger, O., Ovali, E. & Barlak, Y. The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves' disease. *Endocrine* 2006; 30:175-83.

- Ermert, D., Urban, C. F., Laube, B., Goosmann, C., Zychlinsky, A. & Brinkmann, V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun* 2009; 1:181-93.
- Fadeel, B., Ahlin, A., Henter, J. I., Orrenius, S. & Hampton, M. B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* 1998; 92:4808-18.
- Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5:1317-27.
- Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., Cesar, L. M., Malaspina, O. & Palma, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004; 25:919-28.
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C. & Rossi, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2010; 2:216-27.
- Freitas, M., Costa, V. M., Ribeiro, D., Couto, D., Porto, G., Carvalho, F. & Fernandes, E. Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils. *Toxicol Lett* 2013; 219:170-7.
- Freitas, M., Lima, J. L. & Fernandes, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 2009; 649:8-23.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176:231-41.
- Fujii, A., Kobayashi, S., Kuboyama, N., Furukawa, Y., Kaneko, Y., Ishihama, S., Yamamoto, H. & Tamura, T. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 1990; 53:331-7.
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J. & Steinman, R. M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 2004; 199:1607-18.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V. & Reizis, B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:566-77.
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J. & Pascual, V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3:73ra20.
- Gasic, S., Vucevic, D., Vasilijic, S., Antunovic, M., Chinou, I. & Colic, M. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2007; 29:521-36.

- Gearing, K. L., Gottlicher, M., Widmark, E., Banner, C. D., Tollet, P., Stromstedt, M., Rafter, J. J., Berge, R. K. & Gustafsson, J. A. Fatty acid activation of the peroxisome proliferator activated receptor, a member of the nuclear receptor gene superfamily. *J Nutr* 1994; 124:1284S-1288S.
- Georgiadi, A. & Kersten, S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr* 2012; 3:127-34.
- Gillespie, J., Savic, S., Wong, C., Hempshall, A., Inman, M., Emery, P., Grigg, R. & Mcdermott, M. F. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64:418-422.
- Glimcher, L. H. & Murphy, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000; 14:1693-711.
- Gomes, A., Fernandes, E., Silva, A. M., Santos, C. M., Pinto, D. C., Cavaleiro, J. A. & Lima, J. L. 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorg Med Chem* 2007; 15:6027-36.
- Grad, B., Kral, V. A. & Berenson, J. Toxic and protective effects of royal jelly in normal and diseased mice. *Can J Biochem Physiol* 1961; 39:461-76.
- Grohmann, U., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M. C. & Puccetti, P. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 1998; 9:315-23.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-67.
- Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Wardini, A. B., Pinto-Da-Silva, L. H. & Saraiva, E. M. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res* 2012; 2012:929743.
- Guo, H., Kouzuma, Y. & Yonekura, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry* 2009; 113:238-245.
- Haase, C., Michelsen, B. K. & Jorgensen, T. N. CD40 is necessary for activation of naive T cells by a dendritic cell line in vivo but not in vitro. *Scand J Immunol* 2004; 59:237-45.
- Hahn, S., Giaglis, S., Chowdhury, C. S., Hosli, I. & Hasler, P. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin Immunopathol* 2013; 35:439-53.
- Hakim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E. & Zychlinsky, A. Impairment of neutrophil extracellular

- trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:9813-8.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92:3007-17.
- Han, B., Li, C., Zhang, L., Fang, Y., Feng, M. & Li, J. Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59:10346-55.
- Hashimoto, M., Kanda, M., Ikeno, K., Hayashi, Y., Nakamura, T., Ogawa, Y., Fukumitsu, H., Nomoto, H. & Furukawa, S. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2005; 69:800-5.
- Haslett, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S5-11.
- Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., Jr. & Henson, P. M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1985; 119:101-10.
- Haslett, C., Lee, A., Savill, J. S., Meagher, L. & Whyte, M. K. Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest* 1991; 99:6S.
- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S. & Furukawa, S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomed Res* 2007; 28:261-6.
- Henry, C. J. Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition* 2010; 64:657-659.
- Hirsch, J. G. Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 1958; 108:925-44.
- Ho, I. C., Tai, T. S. & Pai, S. Y. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:125-35.
- Homburg, C. H., De Haas, M., Von Dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P. & Roos, D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; 85:532-40.
- Huang, H., Dai, M. H. & Tao, Y. X. Physiology and therapeutics of the free fatty acid receptor GPR40. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 121:67-94.
- Hwang, E. S. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med J* 2010; 51:484-91.

- Inoue, S., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Experimental Gerontology* 2003; 38:965-9.
- Ito, S., Nitta, Y., Fukumitsu, H., Soumiya, H., Ikeno, K., Nakamura, T. & Furukawa, S. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic Acid, a unique unsaturated Fatty Acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:139140.
- Izuta, H., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Mishima, S. & Hara, H. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2009; 6:489-94.
- Jesaitis, A. J., Buescher, E. S., Harrison, D., Quinn, M. T., Parkos, C. A., Livesey, S. & Linner, J. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest* 1990; 85:821-35.
- Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391:82-6.
- Kaczorowski, M. & Jutel, M. Human T regulatory cells: on the way to cognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013; 61:229-36.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20:561-7.
- Kamakura, M. Signal transduction mechanism leading to enhanced proliferation of primary cultured adult rat hepatocytes treated with royal jelly 57-kDa protein. *J Biochem* 2002; 132:911-9.
- Kamakura, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 2011; 473:478-83.
- Kamakura, M., Suenobu, N. & Fukushima, M. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 282:865-74.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, B. C., Altinordulu, S. & Atasever, A. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009; 61:123-32.
- Kannan, Y., Yu, J., Raices, R. M., Seshadri, S., Wei, M., Caligiuri, M. A. & Wewers, M. D. IkappaBzeta augments IL-12- and IL-18-mediated IFN-gamma production in human NK cells. *Blood* 2011; 117:2855-63.
- Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M. S., Uslu, S., Comba, B. & Mis, L. Effect of royal jelly on experimental colitis Induced by acetic acid and alteration of mast

- cell distribution in the colon of rats. *European Journal of Histochemistry* 2010; 54:e35.
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., Kisa, F., Emre, H. & Turkeli, M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2011; 2011:981793.
- Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T. & Taniguchi, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 1997; 89:1748-53.
- Kataoka, M., Arai, N., Yoshifumi, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Analysis of anti-allergic function of royal jelly. *Natural Medicine* 2001; 55:174-180.
- Katayama, M., Aoki, M. & Kawana, S. Case of anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *Journal of Dermatology* 2008; 35:222-4.
- Kennedy, A. D. & Deleo, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 2009; 43:25-61.
- Keshari, R. S., Jyoti, A., Kumar, S., Dubey, M., Verma, A., Srinag, B. S., Krishnamurthy, H., Barthwal, M. K. & Dikshit, M. Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. *Cytometry A* 2012; 81:238-47.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Grone, H. J., Brinkmann, V. & Jenne, D. E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15:623-5.
- Kettritz, R., Falk, R. J., Jennette, J. C. & Gaido, M. L. Neutrophil superoxide release is required for spontaneous and FMLP-mediated but not for TNF alpha-mediated apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1091-100.
- Kim, D. I., Kim, K. H., Kang, J. H., Jung, E. M., Kim, S. S., Jeung, E. B. & Yang, M. P. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid modulates NF-kappaB activation and TNF-alpha production in porcine peripheral blood mononuclear cells via a PPARgamma-dependent pathway. *British Journal of Nutrition* 2011; 105:1329-36.
- Kirchner, T., Hermann, E., Moller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T. & Behnen, M. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:710239.
- Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T. & Behnen, M. The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation* 2012; 2012:1-10.
- Kjeldsen, L., Bainton, D. F., Sengelov, H. & Borregaard, N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils:

- identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 1993; 82:3183-91.
- Kjeldsen, L., Bjerrum, O. W., Askaa, J. & Borregaard, N. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem J* 1992; 287 (Pt 2):603-10.
- Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77:598-625.
- Klotz, L., Burgdorf, S., Dani, I., Saijo, K., Flossdorf, J., Hucke, S., Alferink, J., Nowak, N., Beyer, M., Mayer, G., Langhans, B., Klockgether, T., Waisman, A., Eberl, G., Schultze, J., Famulok, M., Kolanus, W., Glass, C., Kurts, C. & Knolle, P. A. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206:2079-89.
- Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Voyich, J. M., Schwan, T. G., Musser, J. M. & Deleo, F. R. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003a; 100:10948-53.
- Kobayashi, S. D. & Deleo, F. R. An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:474-6.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Buhl, C. L., Stahl, R. M. & Deleo, F. R. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:6901-6.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M. & Deleo, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003b; 5:1337-44.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68:138-45.
- Kojima, H., Aizawa, Y., Yanai, Y., Nagaoka, K., Takeuchi, M., Ohta, T., Ikegami, H., Ikeda, M. & Kurimoto, M. An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. *J Immunol* 1999; 162:5063-9.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:159-75.
- Kose, S. A. & Naziroglu, M. N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Free Radic Res* 2015; 49:338-46.
- Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal

- jelly and its possible mechanism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2004; 68:767-73.
- Koya-Miyata, S., Takei, Y., Ushio, S., Iwaki, K. M. & Kurimoto, M. Royal Jelly and Ascorbic Acid 2-O- α -glucoside (AA-2G) Increase Collagen Synthesis in Normal Hamster Skin Fibroblast Cultures. *Natural Medicines* 2002; 56:191-194.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S. & Maleszka, R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 2008; 319:1827-30.
- Lacy, P. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacol Ther* 2005; 107:358-76.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y. J. & Gilliet, M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3:73ra19.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y. H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J. M., Liu, Y. J. & Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449:564-9.
- Lee, J., Rhee, M. H., Kim, E. & Cho, J. Y. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets. *Mediators Inflamm* 2012; 2012:416036.
- Leon, B. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 2008; 86:320-4.
- Lercker, G., Savioli, S., Vecchi, M. A., Sabatini, A. G., Nanetti, A. & Piana, L. Carbohydrate determination of Royal Jelly by high resolution gas chromatography (HRGC). *Food Chemistry* 1986; 19:255-264.
- Leung, R., Ho, A., Chan, J., Choy, D. & Lai, C. K. Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clinical and Experimental Allergy* 1997; 27:333-6.
- Leung, R., Thien, F. C., Baldo, B. & Czarny, D. Royal jelly-induced asthma and anaphylaxis: clinical characteristics and immunologic correlations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1995; 96:1004-7.
- Ley, K., Smith, E. & Stark, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 2006; 34:229-42.
- Li, L. & Boussiotis, V. A. Molecular and functional heterogeneity of T regulatory cells. *Clin Immunol* 2011; 141:244-52.

- Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:725-34.
- Li, X., Huang, C. & Xue, Y. Contribution of lipids in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly to health. *J Med Food* 2013; 16:96-102.
- Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvorovic, A., Silveira, R. L., Martinez, L., Souza, P. C., Saidenberg, D., Deng, T., Amato, A. A., Togashi, M., Hsueh, W. A., Phillips, K., Palma, M. S., Neves, F. A., Skaf, M. S., Webb, P. & Polikarpov, I. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS ONE* 2012; 7:e36297.
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K. J., Basu, S., Zhan, Y. F. & Dunn, A. R. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; 84:1737-46.
- Lim, M. B., Kuiper, J. W., Katchky, A., Goldberg, H. & Glogauer, M. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol* 2011; 90:771-6.
- Liou, H. C. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35:537-46.
- Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L. S. & Peng, C. C. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J Agric Food Chem* 2008; 56:11447-52.
- Liu, L. S., Xiao, X. M. & Zheng, R. C. Therapeutic effect of royal jelly on radiation injury in mice and its possible mechanism. *Chung Hua Fang She I Hsueh Yu Fang Hu Tsa Chih* 1984; 4:25-26.
- Lombardi, C., Senna, G. E., Gatti, B., Feligioni, M., Riva, G., Bonadonna, P., Dama, A. R., Canonica, G. W. & Passalacqua, G. Allergic reactions to honey and royal jelly and their relationship with sensitization to compositae. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1998; 26:288-90.
- Maianski, N. A., Maianski, A. N., Kuijpers, T. W. & Roos, D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111:56-66.
- Majtan, J., Kovacova, E., Bilikova, K. & Simuth, J. The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNFalpha release. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:269-78.
- Majtan, J., Kumar, P., Majtan, T., Walls, A. F. & Klaudiny, J. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Experimental Dermatology* 2010; 19:e73-9.
- Makni-Maalej, K., Chiandotto, M., Hurtado-Nedelec, M., Bedouhene, S., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Dang, P. M.-C. & El-Benna, J. Zymosan induces NADPH

- oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: Involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochemical Pharmacology* 2013; 85:92-100.
- Malapaka, R. R., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J. H., Zhou, X. E., Xu, Y., Gong, Y., Li, J., Yong, E. L., Chalmers, M. J., Chang, L., Resau, J. H., Griffin, P. R., Chen, Y. E. & Xu, H. E. Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287:183-95.
- Mannoor, M. K., Shimabukuro, I., Tsukamotoa, M., Watanabe, H., Yamaguchi, K. & Sato, Y. Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus* 2009; 18:44-52.
- Martin-Fontecha, A., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol* 2009:31-49.
- Martin, C., Burdon, P. C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Williams, T. J. & Rankin, S. M. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19:583-93.
- Mecklenburgh, K. I., Walmsley, S. R., Cowburn, A. S., Wiesener, M., Reed, B. J., Upton, P. D., Deighton, J., Greening, A. P. & Chilvers, E. R. Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood* 2002; 100:3008-16.
- Melliou, E. & Chinou, I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *J Agric Food Chem* 2005; 53:8987-92.
- Melliou, E. & Chinou, I. 2014. Chapter 8 - Chemistry and Bioactivities of Royal Jelly. *In: ATTA UR, R. (ed.) Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier.
- Merad, M. & Manz, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009; 113:3418-27.
- Mestas, J. & Hughes, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172:2731-8.
- Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011; 117:953-9.
- Milara, J., Juan, G., Peiro, T., Serrano, A. & Cortijo, J. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy. *Respiration* 2012; 83:147-58.
- Mildner, A. & Jung, S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 2014; 40:642-56.

- Mishima, S., Suzuki, K. M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M. & Miyata, T. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2005; 101:215-20.
- Miyata, T. & Fan, X. A second hit for TMA. *Blood* 2012; 120:1152-4.
- Mookerjee, B. K. & Pauly, J. L. Mitogenic effect of interleukin-2 on unstimulated human T cells: an editorial review. *J Clin Lab Anal* 1990; 4:138-49.
- Mori, Y., Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S., Ooshima, T. & Kawabata, S. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *J Biol Chem* 2012; 287:10472-81.
- Moutsatsou, P., Papoutsis, Z., Kassi, E., Heldring, N., Zhao, C., Tsiapara, A., Melliou, E., Chrousos, G. P., Chinou, I., Karshikoff, A., Nilsson, L. & Dahlman-Wright, K. Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions. *PLoS ONE* 2010; 5:e15594.
- Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S. A. & Azargashb, E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharm Res* 2011; 10:895-903.
- Mukhopadhyay, P., Qu, X., Pröll, M., Neuhoﬀ, C., Zhang, R., Cinar, M. U., Hossain, M. M., Tesfaye, D., Große-Brinkhaus, C., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Hölker, M., Schellander, K. & Uddin, M. J. Sulforaphane Epigenetically Regulates Innate Immune Responses of Porcine Monocyte-Derived Dendritic Cells Induced with Lipopolysaccharide. *Plos One* 2015; 10:e0121574.
- Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:933-44.
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H. & Fonnum, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichloroﬂuorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:1575-82.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N. & Nagashima, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry* 2006; 97:256-262.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yuki-yoshi, A., Tachibana, H. & Yamada, K. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2007; 71:253-5.
- Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R. P., Ng, H. H., Poh, W. P., Liew, A. A., Phoon, M. C., Van Rooijen, N. & Chow, V. T. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol* 2011; 179:199-210.

- Narayanan, A. S., Page, R. C. & Swanson, J. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem J* 1989; 260:463-9.
- Nash, J. A., Ballard, T. N., Weaver, T. E. & Akinbi, H. T. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. *J Immunol* 2006; 177:519-26.
- Nauseef, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219:88-102.
- Nauseef, W. M. & Borregaard, N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15:602-11.
- Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. & Radic, M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun* 2009; 1:194-201.
- Nerlov, C. & Graf, T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 1998; 12:2403-12.
- Nielsen, O. H., Bouchelouche, P. N., Berild, D. & Ahnfelt-Ronne, I. Effect of 5-aminosalicylic acid and analogous substances on superoxide generation and intracellular free calcium in human neutrophilic granulocytes. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28:527-32.
- Nishinaka, Y., Arai, T., Adachi, S., Takaori-Kondo, A. & Yamashita, K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413:75-9.
- Nusse, O. & Lindau, M. The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol* 1988; 107:2117-23.
- O'dowd, Y., Driss, F., Dang, P. M., Elbim, C., Gougerot-Pocidalo, M. A., Pasquier, C. & El-Benna, J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:2003-8.
- O'garra, A. & Arai, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2000; 10:542-50.
- O'garra, A. & Robinson, D. Development and function of T helper 1 cells. *Adv Immunol* 2004; 83:133-62.
- Oka, H., Emori, Y., Kobayashi, N., Hayashi, Y. & Nomoto, K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:521-32.
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci* 2003; 73:2029-45.

- Okoye, I. S. & Wilson, M. S. CD4+ T helper 2 cells--microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. *Immunology* 2011; 134:368-77.
- Orsolich, N. [Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardisation]. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013; 64:445-61.
- Orsolich, N., Knezevic, A., Sver, L., Terzic, S., Hackenberger, B. K. & Basic, I. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Vet Comp Oncol* 2003; 1:216-26.
- Orsolich, N., Sacases, F., Du-Sert, P.-P. & Basic, I. Antimetastatic ability of honey bee products. *Periodicum Biologorum* 2007; 109:173-180.
- Oršolić, N., Terzić, S., Šver, L. & Bašić, I. Honey-bee products in prevention and/or therapy of murine transplantable tumours. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005; 85:363-370.
- Palmer, L. J., Cooper, P. R., Ling, M. R., Wright, H. J., Huissoon, A. & Chapple, I. L. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol* 2012; 167:261-8.
- Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009; 30:513-21.
- Park, E., Lee, S.-M., Lee, J. E. & Kim, J.-H. Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- κ B. *Journal of Functional Foods* 2013; 5:178-186.
- Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol* 2012; 92:841-9.
- Parker, H. & Winterbourn, C. C. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 2012; 3:424.
- Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B. S., Keshari, R. S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M. K., Krishnamurthy, H., Bajpai, V. K. & Dikshit, M. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide* 2010; 22:226-34.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Şapcaliu, A., Radoi, I. & Mădaş, M. N. Biological Activities of Royal Jelly-Review. *Lucrări Ştiinţifice-Zootehnie şi Biotehnologii, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară a Banatului Timişoara* 2011; 44:108-118.
- Peacock, S., Murray, V. & Turton, C. Respiratory distress and royal jelly. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 1995; 311:1472.
- Peli, J., Schroter, M., Rudaz, C., Hahne, M., Meyer, C., Reichmann, E. & Tschopp, J. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J* 1999; 18:1824-31.

- Peskin, A. V. & Winterbourn, C. C. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:572-9.
- Placek, K., Coffre, M., Maiella, S., Bianchi, E. & Rogge, L. Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. *Immunology* 2009; 127:155-62.
- Pollet, S., Bottex-Gauthier, C., Li, M., Potier, P., Favier, A. & Vidal, D. Insight into some of the signaling pathways triggered by a lipid immunomodulator. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002; 24:527-46.
- Punchard, N. A., Greenfield, S. M. & Thompson, R. P. Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid. *Mediators Inflamm* 1992; 1:151-65.
- Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006; 1:3159-65.
- Ramadan, M. F. & Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods* 2012; 4:39-52.
- Remijsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J. & Vandenabeele, P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 2011; 21:290-304.
- Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L. & Annunziato, F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology* 2009; 47:3-7.
- Rosmilah, M., Shahnaz, M., Patel, G., Lock, J., Rahman, D., Masita, A. & Noormalin, A. Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*. *Trop Biomed* 2008; 25:243-51.
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M. & Katz, D. R. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:232-8.
- Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. & Geginat, J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:331-44.
- Sabatte, J., Maggini, J., Nahmod, K., Amaral, M. M., Martinez, D., Salamone, G., Ceballos, A., Giordano, M., Vermeulen, M. & Geffner, J. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18:5-17.
- Saffarzadeh, M. & Preissner, K. T. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol* 2013; 20:3-9.

- Sato, K. & Fujita, S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 2007; 56:183-91.
- Sato, T., Hongu, T., Sakamoto, M., Funakoshi, Y. & Kanaho, Y. Molecular Mechanisms of N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced Superoxide Generation and Degranulation in Mouse Neutrophils: Phospholipase D Is Dispensable. *Molecular and Cellular Biology* 2013; 33:136-145.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M. & Haslett, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83:865-75.
- Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 2007; 219:143-56.
- Scarselli, R., Donadio, E., Giuffrida, M. G., Fortunato, D., Conti, A., Balestreri, E., Felicioli, R., Pinzauti, M., Sabatini, A. G. & Felicioli, A. Towards royal jelly proteome. *Proteomics* 2005; 5:769-76.
- Scheel-Toellner, D., Wang, K., Craddock, R., Webb, P. R., McGettrick, H. M., Assi, L. K., Parkes, N., Clough, L. E., Gulbins, E., Salmon, M. & Lord, J. M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 2004; 104:2557-64.
- Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J. & Simuth, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998; 54:1020-30.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A. K., Mygind, P. H., Raventos, D. S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A. M., De Maria, L., Andersen, A. S., Gammelgaard, L. K., Sahl, H. G. & Kristensen, H. H. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* 2010; 328:1168-72.
- Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L. & Amigorena, S. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* 2008; 28:258-70.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75:163-89.
- Schroeder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E. F. & Wehkamp, J. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 2011; 469:419-23.
- Schwartz, J. T., Barker, J. H., Kaufman, J., Fayram, D. C., Mccracken, J. M. & Allen, L. A. *Francisella tularensis* inhibits the intrinsic and extrinsic pathways to delay

-
- constitutive apoptosis and prolong human neutrophil lifespan. *J Immunol* 2012; 188:3351-63.
- Segal, B. H., Leto, T. L., Gallin, J. I., Malech, H. L. & Holland, S. M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79:170-200.
- Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L. & Arnhold, J. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 2001; 395:49-56.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L. & Borregaard, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 1993; 150:1535-43.
- Serafini, M., Stanzione, A. & Foddai, S. Functional foods: traditional use and European legislation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2012; 63:7-9.
- Sharma, O. P. & Bhat, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009; 113:1202-1205.
- Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
- Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:19-30.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5:415-8.
- Simons, M. P., Nauseef, W. M., Griffith, T. S. & Apicella, M. A. *Neisseria gonorrhoeae* delays the onset of apoptosis in polymorphonuclear leukocytes. *Cell Microbiol* 2006; 8:1780-90.
- Simuth, J., Bilikova, K., Kovacova, E., Kuzmova, Z. & Schroder, W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52:2154-8.
- Skoberne, M., Beignon, A. S. & Bhardwaj, N. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* 2004; 10:251-7.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M. & Kapsenberg, M. L. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10:1593-8.
- Sofuni, T. & Yoshida, M. C. Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. *J Radiat Res* 1992; 33 Suppl:222-30.
- Spannhoff, A., Kim, Y. K., Raynal, N. J. M., Gharibyan, V., Su, M.-B., Zhou, Y.-Y., Li, J., Castellano, S., Sbardella, G., Issa, J.-P. J. & Bedford, M. T. Histone deacetylase

-
- inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO reports* 2011; 12:238-243.
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S. & Ley, K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; 22:285-94.
- Stasia, M. J. & Li, X. J. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008; 30:209-35.
- Steinberg, B. E. & Grinstein, S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* 2007; 2007:pe11.
- Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449:419-426.
- Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-62.
- Steinman, R. M. & Hemmi, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:17-58.
- Stevens, P., Winston, D. J. & Van Dyke, K. In vitro evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol-dependent chemiluminescence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states. *Infect Immun* 1978; 22:41-51.
- Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:281-6.
- Stolarek, R., Bialasiewicz, P. & Nowak, D. N-acetylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15:385-92.
- Sugiyama, T., Takahashi, K., Kuzumaki, A., Tokoro, S., Neri, P. & Mori, H. Inhibitory mechanism of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid (royal jelly acid) against lipopolysaccharide- and interferon-beta-induced nitric oxide production. *Inflammation* 2013; 36:372-8.
- Sugiyama, T., Takahashi, K. & Mori, H. Royal jelly acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, as a modulator of the innate immune responses. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders Drug Targets* 2012a; 12:368-76.
- Sugiyama, T., Takahashi, K., Tokoro, S., Gotou, T., Neri, P. & Mori, H. Inhibitory effect of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid on LPS-induced IL-6 production via reducing IkappaB-zeta expression. *Innate Immun* 2012b; 18:429-37.

- Suzuki, K. M., Isohama, Y., Maruyama, H., Yamada, Y., Narita, Y., Ohta, S., Araki, Y., Miyata, T. & Mishima, S. Estrogenic activities of Fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5:295-302.
- Sver, L., Orsolich, N., Tadic, Z., Njari, B., Valpotic, I. & Basic, I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1996; 19:31-8.
- Swinbanks, D. & O'brien, J. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* 1993; 364:180.
- Takahama, H. & Shimazu, T. Food-induced anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *Journal of Dermatology* 2006; 33:424-6.
- Takahashi, K., Sugiyama, T., Tokoro, S., Neri, P. & Mori, H. Inhibition of interferon-gamma-induced nitric oxide production by 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid through inhibition of interferon regulatory factor-8 induction. *Cell Immunol* 2012; 273:73-8.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. & Sendo, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol* 1996; 59:229-40.
- Tamai, H., Kachur, J. F., Grisham, M. B. & Gaginella, T. S. Scavenging effect of 5-aminosalicylic acid on neutrophil-derived oxidants. Possible contribution to the mechanism of action in inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 1991; 41:1001-6.
- Tamura, T., Fujii, A. & Kuboyama, N. [Antitumor effects of royal jelly (RJ)]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 1987; 89:73-80.
- Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology* 2003; 3:1313-24.
- Terada, Y., Narukawa, M. & Watanabe, T. Specific hydroxy fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59:2627-35.
- Thien, F. C., Leung, R., Baldo, B. A., Weiner, J. A., Plomley, R. & Czarny, D. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. *Clinical and Experimental Allergy* 1996; 26:216-22.
- Thornton, A. M. T regulatory cells. *Curr Biol* 2005; 15:R582.
- Tomita, T., Hosoda, K., Fujikura, J., Inagaki, N. & Nakao, K. The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5:152.

- Torchinsky, M. B. & Blander, J. M. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:1407-21.
- Townsend, G. F. & Lucas, C. C. Chemical Examination of the Lipid Fraction of Royal Jelly. *Science* 1940; 92:43.
- Townsend, G. F., Morgan, J. F. & Hazlett, B. Activity of 10-hydroxydecanoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. *Nature* 1959; 183:1270-1.
- Townsend, G. F., Morgan, J. F., Tolnai, S., Hazlett, B., Morton, H. J. & Shuel, R. W. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. I. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly. *Cancer Research* 1960; 20:503-10.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K. & Banchereau, J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; 219:118-42.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000639.
- Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* 2009; 27:693-733.
- Van Antwerpen, P., Boudjeltia, K. Z., Babar, S., Legssyer, I., Moreau, P., Mogueilevsky, N., Vanhaeverbeek, M., Ducobu, J. & Neve, J. Thiol-containing molecules interact with the myeloperoxidase/H₂O₂/chloride system to inhibit LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337:82-8.
- Van Zandbergen, G., Gieffers, J., Kothe, H., Rupp, J., Bollinger, A., Aga, E., Klinger, M., Brade, H., Dalhoff, K., Maass, M., Solbach, W. & Laskay, T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 2004; 172:1768-76.
- Vanderbist, F., Maes, P. & Neve, J. In vitro comparative assessment of the antioxidant activity of n-acetylcystein against three reactive oxygen species. *Arzneimittelforschung* 1996; 46:783-8.
- Villagrasa, V., Cortijo, J., Marti-Cabrera, M., Ortiz, J. L., Berto, L., Esteras, A., Bruseghini, L. & Morcillo, E. J. Inhibitory effects of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49:525-9.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C. J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M. F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A. T. & Kaplan, M. J. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose

- immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 187:538-52.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. A. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science* 2008; 73:R117-R124.
- Vo, T.-S. & Kim, S.-K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. *Journal of Functional Foods* 2013; 5:16-27.
- Vong, L., Sherman, P. M. & Glogauer, M. Quantification and visualization of neutrophil extracellular traps (NETs) from murine bone marrow-derived neutrophils. *Methods Mol Biol* 2013; 1031:41-50.
- Vucevic, D., Melliou, E., Vasilijic, S., Gasic, S., Ivanovski, P., Chinou, I. & Colic, M. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:1211-20.
- Wang, J. & Arase, H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1319:66-81.
- Wang, J., Zhang, W., Zou, H., Lin, Y., Lin, K., Zhou, Z., Qiang, J., Lin, J., Chuka, C. M., Ge, R., Zhao, S. & Yang, X. 10-Hydroxy-2-decenoic acid inhibiting the proliferation of fibroblast-like synoviocytes by PI3K–AKT pathway. *International Immunopharmacology* 2015; 28:97-104.
- Watanabe, K., Shinmoto, H., Kobori, M., Tsushida, T., Shinohara, K., Kanaeda, J. & Yonekura, M. Growth stimulation with honey royal jelly DIII protein of human lymphocytic cell lines in a serum-free medium. *Biotechnology Techniques* 1996; 10.
- Watanabe, K., Shinmoto, H., Kobori, M., Tsushida, T., Shinohara, K., Kanaeda, J. & Yonekura, M. Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. *Cytotechnology* 1998; 26:23-7.
- Watson, R. W., Redmond, H. P., Wang, J. H., Condrón, C. & Bouchier-Hayes, D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol* 1996; 156:3986-92.
- Weinberg, E. D. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA* 1975; 231:39-41.
- Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S. D., Weiss, J. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 2002; 417:91-4.
- Westlin, W. & Mullane, K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 1988; 77:I30-9.
- Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008; 4:278-86.

- Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H. & Kettle, A. J. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem* 2006; 281:39860-9.
- Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18:642-60.
- Witko-Sarsat, V., Pederzoli-Ribeil, M., Hirsch, E., Sozzani, S. & Cassatella, M. A. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol* 2011; 32:117-24.
- Wolfrum, C. Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:2465-76.
- Wolfson, M., Mcphail, L. C., Nasrallah, V. N. & Snyderman, R. Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol* 1985; 135:2057-62.
- Xu, Y., Loison, F. & Luo, H. R. Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:2950-5.
- Yanagita, M., Kojima, Y., Mori, K., Yamada, S. & Murakami, S. Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomed Res* 2011; 32:285-91.
- Yang, X. Y., Yang, D. S., Wei, Z., Wang, J. M., Li, C. Y., Hui, Y., Lei, K. F., Chen, X. F., Shen, N. H., Jin, L. Q. & Wang, J. G. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: a potential medicine for RA. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 128:314-21.
- Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; 122:2784-94.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytniuk, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., De Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J. & Kubes, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 2012; 18:1386-93.
- Yost, C. C., Cody, M. J., Harris, E. S., Thornton, N. L., McInturff, A. M., Martinez, M. L., Chandler, N. B., Rodesch, C. K., Albertine, K. H., Petti, C. A., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* 2009; 113:6419-27.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16:1438-44.
- Zheng, J., Lai, W., Zhu, G., Wan, M., Chen, J., Tai, Y. & Lu, C. 10-Hydroxy-2-decenoic acid prevents ultraviolet A-induced damage and matrix metalloproteinases

- expression in human dermal fibroblasts. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2012.
- Zhou, L. J. & Tedder, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:2588-92.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annual Review of Immunology 2010; 28:445-89.
- Zubiaga, A. M., Munoz, E., Mellow, M. & Huber, B. T. Regulation of interleukin 6 production in T helper cells. International Immunology 1990; 2:1047-54.

Прилози

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:
РБ

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације:
ТД

Монографска публикација

Тип записа:
ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:
ВР

Докторска дисертација

Аутор:
АУ

Душан А. Михајловић

Ментор/коментор:
МН

Академик проф. др Миодраг Чолић

Наслов рада:
НР

Имуномодулаторна и
антиоксидативна својства 10-
хидрокси-2-деканоишне киселине

Језик публикације:
ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:
ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања:
ЗП

Србија

Уже географско подручје:
УГП

Србија

Година: 2015.
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

Место и адреса: Светозара Марковића 69
МС 34000 Крагујевац, Србија

Физичи опис рада: Дисертација има 149 страна, садржи 6
ФО табела, 4 слике, 37 графикона и 324 библиографских јединица

Научна област: Медицина

Научна дисциплина: Имунологија и биохемија
ДИ

Предметна одредница/ кључне речи 10-хидрокси-2-деcanoична киселина,
ПО неутрофили, мононуклеарне ћелије периферне крви, дендритске ћелије моноцитног порекла, имуномодулаторна активност, антиоксидативна активност

УДК

Чува се: У библиотеци Факултета
ЧУ медицинских наука у Крагујевцу

Важна напомена:

МН

Извод:
ИД

10-хидрокси-2-деcanoична киселина (10-HDA) је јединствена и најзаступљенија незасићена масна киселина матичног млеча. Иако први научни радови о овој масној киселини датирају још од педесетих година прошлог века, досадашња истраживања, углавном на *in vitro* анималним моделима, су показала њено анти-инфламаторно својство. Међутим, веома мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози. Стога смо ми у овој студији испитивали ефекат 10-HDA на функције хуманих ћелија имунског система *in vitro*, као и њено потенцијално антиоксидативно својство.

Добијени резултати су показали да је 10-HDA у милимоларним концентрацијама (1mM и 2mM) инхибирала оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA), N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланином (fMLP) или опсонизованим

зимозаном (opZy) у култури. Осим тога, ова масна киселина је у истим концентрацијама инхибирала како спонтану, тако и PMA, fMLP и opZy индуковану апоптозу, али и интензитет PMA узроковане NEToze (енгл. Neutrophil Extracellular Traps) хуманих неутрофила.

У културама хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMNC) стимулираним фитохемаглутинином (PHA) 10-HDA је у концентрацији од 500 μ M испољила претежно супресивни ефекат на пролиферацију PBMNC. Овај процес је био праћен смањеном продукцијом интерлеукина (IL)-2. У истој концентрацији, 10-HDA је инхибирала секрецију IL-1 β и фактора некрозе тумора (TNF)- α . Анализирајући цитокински Т „helper“ (Th) профил у овим културама показано је да је 10-HDA, у концентрацији од 500 μ M, инхибирала Th1 и Th2 поларизацију имунског одговора, а није значајније модулисала Th17 имунски одговор.

Такође, у овој студији је испитиван утицај 10-HDA на матурацију и функцију хуманих дендритских ћелија моноцитног порекла (MoDC). 10-HDA је, у концентрацији од 500 μ M, инхибирала матурацију MoDC стимулираних липополисахаридом (LPS). Овако стимулисане MoDC су продуковале мање количине IL-12, IL-18 и TNF- α , и инхибирале Th1 и Th2 поларизацију имунског одговора, што је закључено на основу смањења концентрације интерферона (IFN)- γ и IL-4 у супернатантима ко-култура 10-HDA-третираних MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита периферне крви. Насупрот овим резултатима, 10-HDA је, у ниској концентрацији (50 μ M), стимулисала Th1, а инхибирала Th2 имунски одговор.

Испитујући антиоксидативно својство 10-HDA, на експерименталним моделима без ћелија, у којима се реактивне кисеоничне врсте продукују чисто хемијским путем, показано је да ова масна киселина, у милимоларним концентрацијама (1mM-4mM), има способност да „сакупља“, односно реагује са супероксид анјон радикалом и хипохлорном киселином и тако смањује њихово реактивно деловање.

На основу добијених резултата може се закључити да 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на одговор хуманих имунских ћелија *in vitro*, при чему у високим концентрацијама (0,5mM-2mM) делује инхибиторно, а у ниским концентрацијама (50 μ M) благо стимулаторно. Такође, показано је да 10-HDA у милимоларним концентрацијама (1mM-4mM) испољава директно антиоксидативно својство.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 26.02.2014. год.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан
3. Проф. др Драгана Вучевић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Dušan A. Mihajlović

Menthor/co-mentor

MN

Academician prof. Dr. Miodrag Čolić

Title:

TI

Immunomodulatory and antioxidant properties of 10-hydroxy-2-decanoic acid

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

Serbia

Publication year:

PY

2015.

Publisher:

PU

Author reprint

Publication place: Svetozara Markovica 69,
PP 34000 Kragujevac, Serbia

Физичи опис рада: Thesis contains 149 pages, 6 tables, 4
ФО figures, 37 charts and 324 references

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Immunology and Biochemistry
SD

Subject/key words: 10-hydroxy-2-decanoic acid, neutrophils,
SKW peripheral blood mononuclear cells,
monocyte-derived dendritic cells,
immunomodulatory activities,
antioxidant properties

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences
Svetozara Markovica 69
34000 Kragujevac, Serbia

Note:
N

Abstract:
AB

10-hydroxy-2-decanoic acid (10-HDA) is unique and the most common fatty acid of royal jelly. Although the first scientific papers about this fatty acid originate from fifties of the last century, very little is known about its immunomodulatory and antioxidative activity. Therefore, we examined the effects of 10-HDA on the function of human immune cells *in vitro*, as well as its potential antioxidative properties.

The obtained results showed that 10-HDA at millimolar concentrations (1mM and 2mM) inhibited oxidative burst of human peripheral blood neutrophils stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) or opsonized zymosan (opZy) and neutrophil extracellular traps formation induced by PMA. In addition, 10-HDA at the same concentrations inhibited spontaneous apoptosis, as well as PMA-, fMLP- and opZy-induced apoptosis of neutrophils.

10-HDA, at concentration of 500 μ M, inhibited the proliferation of phytohaemagglutinin-activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs), and the process was followed by a decrease in the production of interleukin 2 (IL-2). At the same concentration, 10-HDA inhibited the production of IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by stimulated PBMNCs. Regarding T helper (Th) cytokine profile, higher concentration of 10-HDA (500 μ M), in contrast to the lower one (50 μ M), inhibited both Th1 and Th2 responses, whereas the Th17 response was not significantly modulated,

as judged by the levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-5 and IL-17A in culture supernatants, respectively.

The effect of 10-HDA on maturation and functions of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) was also investigated. A lower dose (50 μ M) stimulated T helper (Th)1 and down-regulated Th2 immune responses, as judged by the levels of IFN- γ and IL-4, respectively, in supernatants of 10-HDA-treated MoDCs cultivated with allogeneic CD4⁺ T cells. In contrast, a higher dose of 10-HDA (500 μ M) inhibited maturation of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated MoDCs. Such treated MoDCs produced lower levels of IL-12, IL-18 and TNF- α and down-regulated both Th1 and Th2 immune responses. Examining the antioxidant properties by using cell-free systems, we demonstrated that 10-HDA at millimolar concentrations is a scavenger of superoxide anion radical and HOCl.

In conclusion, our results suggest that 10-HDA exerts different activity on human immune cells, depending on applied concentrations, which is important when considering its therapeutic immunomodulatory property. In addition, it was shown that 10-HDA, at millimolar concentrations, exerts direct antioxidant properties.

Accepted by the Scientific Board on: 26.02.2014
ASB

Defended on:
DE

Thesis defended board
(Degree/name/surname/title/faculty)
DB

1. Prof. Dr. Miodrag Lukić, Professor Emeritus of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, President
2. Prof. Dr. Ivanka Zelen, Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member
3. Prof. Dr. Dragana Vučević, Professor of Immunology, Medical Faculty of the MMA, University of Defence in Belgrade, member

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Душан Михајловић је рођен 30. априла 1983. године. На Медицинском факултету у Нишу дипломирао је 2010. године са просечном оценом 9,43 и тиме стекао звање доктора медицине. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина, подподручје Имунологија, инфламација и инфекција, је уписао 2010. године. Усмени докторски испит положио је 24.04.2013. године са оценом 10 (десет). Од октобра 2010. године ангажован је као сарадник у настави на предмету Медицинска биохемија на Медицинском факултету Војномедицинске академије (ВМА), Универзитета одбране у Београду. Активно се бави научноистраживачким радом на Институту за медицинска истраживања ВМА. Сарадник је на пројекту ВМА под називом: „Регулаторни механизми у запаљенским и имунским реакцијама“ (МФВМА/4/12-15).

Научни радови објављени у целини:

1. **Mihajlovic D**, Rajkovic I, Chinou I, Colic M. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Functional Foods* 2013;5:838-846. **M21**
2. **Mihajlovic D**, Vucevic D, Chinou I, Colic M. Royal jelly fatty acids modulate proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Food Res Technol* 2014;238:881–887. **M22**
3. Čolić M, **Mihajlović D**, Mathew A, Naseri N, Kokol V. Citocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;22:763-778. **M21**
4. Thorne A, Tomić S, Pavlović B, **Mihajlović D**, Džopalić T, Čolić M. Tumour necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of Poly (I:C)-treated dendritic cells, but impairs their Th1- and Th17 polarizing capability. *Cytotherapy* 2015;17:633-646. **M21**
5. Zivancevic-Simonovic S, Mihaljevic O, Majstorovic I, Popovic S, Markovic S, Milosevic-Djordjevic O, Jovanovic Z, Mijatovic-Teodorovic L, **Mihajlovic D**, Colic M. Cytokine production in patients with papillary thyroid cancer and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:1011-1019. **M21**

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Душан А. Михајловић
Датум и место рођења: 30.04.1983. год.
Садашње запослење: Војномедицинска академија, Београд
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоичне киселине
Број страница: 149
Број слика: 47
Број библиографских података: 324
Установа и место где је рад израђен: Војномедицинска академија, Институт за медицинска истраживања
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Академик проф. др Миодраг Чолић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 28.06.2013. год.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 01-1619/3-11 од 26.02.2014.год.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Академик проф. др Миодраг Чолић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 3. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан 3. Проф. др Драгана Вучевић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан
3. Проф. др Драгана Вучевић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Душан А. Михајловић _____
број уписа _____ 32/2010 _____

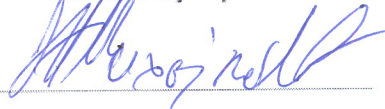
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Имуномодулаторна и антиоксидативна својства
10-хидрокси-2-деcanoичне киселине

- 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.

У Крагујевцу, _____ 24.09.2015. год. _____

Потпис аутора



ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Душан А. Михајловић
Број уписа 32/2010
Студијски програм Молекулска медицина, подподручје Имунологија, инфламација и инфекција
Наслов рада Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине
Ментор Академик проф. др Миодраг Чолић

Потписани Душан А. Михајловић

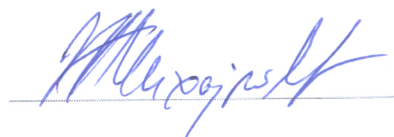
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

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 Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 24.09.2015. год.



ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоничне киселине
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 Крагујевцу 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, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 24.09.2015. год.

