



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Душан Михајловић

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

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015. година

Сажетак

10-хидрокси-2-деcanoична 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 су, углавном на моделима животињских ћелија, показала њено анти-инфламаторно својство. Међутим, веома мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози. Стога смо ми у овој студији, на основу литературних података, 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 (1 mM и 2mM) инхибирала оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних са форбол-12-миристанат-13-ацетатом (PMA), N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланином (fMLP) или опсонизованим зимозаном (opZy) у култури. Поред тога, ова масна киселина је у истим концентрацијама смањила како спонатну, тако и PMA, fMLP и opZy индуковану апоптозу, али и интензитет PMA узроковане NEToze (енгл. Neutrophil Extracellular Traps) хуманих неутрофила.

На хуманим мононуклеарним ћелијама периферне крви (PBMNC) стимулираних са фитохемаглутинином (PHA) 10-HDA је испољила претежно супресивни ефекат. Ова масна киселина је, у концентрацији од 500 μ M, инхибирала пролиферацију PBMNC; овај процес је био праћен смањеном продукцијом интерлеукина (IL)-2 у овим културама. У истој концентрацији 10-HDA је инхибирала секрецију IL-1 β и фактора некрозе тумора (TNF)- α . Такође, посматрајући цитокински T helper (Th) профил у овим културама, већа концентрација (500 μ M) је инхибирала Th1 и Th2 имунске одговоре, док Th17 није био значајније модулисан.

У овој студији је, такође, испитиван утицај 10-HDA на матурацију и функцију хуманих дендритских ћелија моноцитног порекла (MoDC). Већа концентрација ове масне киселине (500 μ M) је инхибирала матурацију MoDC стимулираних са липополисахаридом. Овако стимулисане MoDC су продуковале мање количине IL-12, IL-18 и TNF- α , али и инхибирале Th1 и Th2 имунске одговоре, што је закључено на основу смањене концентрације интерферона (IFN)- γ и IL-4 у супернатантима ко-култура 10-HDA-третираних MoDC и алогених CD4+ Т лимфоцита. Насупрот овим резултатима, ниска доза 10-HDA (50 μ M) је стимулисала Th1, а инхибирала Th2 имунски одговор.

На крају, испитујући антиоксидативно својство 10-HDA, ми смо показали, користећи експерименталне моделе без ћелија у којима се реактивне кисеоничне врсте продукују чисто хемијским путем, да у ова масна киселина, у милимоларним концентрацијама, има способност да „хвата“, односно реагује са супероксидним анјоном и хипохлорном киселином и тако смањује њихово реактивно деловање.

Може се закључити да 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro*, при чему у високим концентрацијама делује инхибиторно, а у мањим благо стимулаторно. Такође, 10-HDA у опсегу имуносупресивних концентрација испољава директно антиоксидативно својство.

Увод

Последњих година забележен је изразит пораст броја истраживача и научних часописа који се баве проучавањем хране и како она утиче 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 поспешује здравље и смањује ризик од развоја болести. Таква храна се назива „функционална храна“ (енг. 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 посебно промовише 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 савремена, већ потичу још из древних Ведских текстова из Индије и традиционалне кинеске медицине, у којима се наводи 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 који дефинише функционалну храну као „прехранбени 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 Lanciai, 2012).

Функционална храна, са својим специфичним здравственим ефектима, представља нови начин размишљања о односима између хране и здравља у

свакодневном животу (Ballali и Lanciai, 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 комбинација претходних (Henry, 2010).

Храна, која неоспорно поседује елементе функционалности документоване у бројним научним часописима и која је део вишевековне традиционалне медицине је матични млеч.

The page features a decorative graphic consisting of three overlapping circles in shades of blue, arranged in a descending diagonal line from the top right towards the bottom right. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles and the text.

Преглед литературе

Матични млеч

Матични млеч (ММ) 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 ММ храни 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, ММ је главни фактор који узрокује диференцијацију ларве у матицу, а не у пчелу радилицу (Bogdanov, 2011, Pavel и сар., 2011, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012, Orsolich, 2013). Kamakura (2011) је јасно показао да диференцијацију ларви пчела у матицу узрокује протеин ројалактин (молекулске масе 57 kDa), присутан у матичној млечи. Ројалактин повећава величину тела и подстиче развој јајника тако што повећава активност митогеном активираних протеин киназе повећавајући титар јувенилних хормона.

Хемијске особине ММ

ММ је делимично растворљив у води са густином од 1,1 g/ml и киселе рН вредности (рН 3,4-4,5). Хемијски састав ММ је веома сложен и однос супстанци умногоме зависи од регионалних и сезонских услова. Свеж ММ 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, Orsolich, 2013). Поред тога у ММ су пронађени неки ензими (каталаза, амилаза, инвертаза, кисела фосфатаза), неуротрансмитери (ацетилхолин, холин) и полни хормони (естрадиол, тестостерон, прогестерон) (Orsolich, 2013). Лиофилизирани ММ садржи мање од 5% воде, 27-41% протеина, 22-31% угљених хидрата и 15-30 % масти (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

Протеини представљају једну од најзначајнијих компоненти ММ. Више од 80% протеина ММ су солубилни протеини (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012). Прво-откривени протеин ММ, 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 ММ, тако да је до сада идентификовано девет протеина (MRJP1-9). Поред ових “главних“ протеина, у ММ су откривени бројни други протеини (укупно 37) који углавном имају улогу у транспорту липида, као и ензимску улогу. MRJP1-5 чине око 90% протеина ММ и имају углавном нутритивну улогу. Приликом синтезе ови протеини подлежу различитим посттранслационим модификацијама (фосфорилација, метилација, гликозилација) што им одређује функцију. Стога, постоје различите изоформе протеина који се разликују по молекулској маси, што је довело до тога да исти протеин има већи број назива у литератури. MRJP1 је 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 (Bogdanov, 2011, Pavel и сар., 2011, Ramadan и Al-Ghamdi, 2012, Orsolic, 2013, Buttstedt и сар., 2014).

У липидној фракцији ММ највећи удео имају масне киселине, углавном у слободној форми, а ређе у облику естара (Li и сар., 2013). Масне киселина ММ се могу класификовати према молекулској структури на шест субкласа: 1) праволанчане масне киселине, као што је валеријанска; 2) незасићене масне киселине, као што је 2-деценична киселина; 3) хидрокси масне киселине, као што је 10-хидрокси-2-деканска киселина; 4) оксо-масне киселине, као што је 11-оксо додеканска 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 слободне масне киселине у ММ, а најзаступљенија је 10-хидрокси-2-деканска киселина (10-HDA) са уделом од око 70% у укупној липидној фракцији ММ (Li и сар., 2013). 10-HDA није до сада нигде у природи откривена, чак ни у другим пчелињим производима, па се може сматрати јединственом за ММ (Mellou и

Chinou, 2014). Поред 10-HDA, још шест масних киселина су у већем проценту заступљене и то: 8-хидрокси октаноична киселина (~4.9% од липидног екстракта ММ), 3-хидроксидеканоична киселина (1.2%), 3,10-дихидроксидеканоична киселина (5.9%), 9-хидрокси-2-деценична (1.7%), 1,10-деканедиоична киселина (3.3%), и 2-децен(-1,10-)диоична киселина (4.1%). Већина масних киселина у ММ 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 засићени или мононезасићене у позицији 2 (Li и сар., 2013).

Поред слободних масних киселина из ММ 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 хетреодимера и хетерополимера (Li и сар., 2013).

ММ садржи и мале количине стерола. Укупно је у ММ детектовано око 22 слободна и естерификована стеерола. Стероли из ММ могу се класификовати у три подкласе: (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 чини око 30% суве материје ММ. 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 је могуће присуство олигосахарида као што су трехалоза, малтоза, гентибиоза, изомалтоза, рафиноза, ерлоса и мелезитоза (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

Имуномодулаторни и антиоксидативни ефекти ММ и његових компоненти

Имуномодулаторни ефекти ММ 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 ММ појачава имунски одговор посредован ћелијама код озрачених мишева. Сличан имуностимулаторни ефекат је показан и на мишевима имунизованим са овчијим еритроцитима (Sver и сар., 1996). ММ је стимулисао продукцију антитела и пролиферацију имунокомпетентних ћелија код имунизованих мишева. Међутим, ови аутори су показали и имуносупресиван ефекат ММ на продукцију антитела посредовану Т лимфоцитима. Kohno и сар. (2004) су проучавајући утицај ММ на мишје макрофаге стимулисане са липополисахаридом (LPS) и интерфероном (IFN)- γ закључили да ММ инхибира продукцију проинфламаторних цитокина (фактор туморске некрозе (TNF)- α , интерлеукин (IL)-6, IL-1) без утицаја на вијабилност ових ћелија. Они су такође сугерисали да ММ директно реагује на смањење продукције проинфламаторних цитокина с обзиром да ММ није имао ефекат на продукцију IL-10, главног инхибиторног цитокина (Sabat и сар., 2010). Гашић и сар. (2007) су испитивали имуномодулаторни ефекат различитих компоненти ММ користећи *in vitro* модел конканавалином А (Con A) индуковане пролиферације пацовских Т лимфоцита. Они су показали да водени екстракт ММ у ниским концентрацијама од 5 μ g/ml - 25 μ g/ml стимулише пролиферацију Т лимфоцита (спленоцита). 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 ММ (75 μ g/ml и 100 μ g/ml) су инхибирале пролиферацију Т лимфоцита индуковану са Con A. Овај инхибиторни ефекат је био праћен смањењем секреције IL-2, као и смањењем продукције азот оксида.

Да би сагледали ефекте ММ на аутоимуност, Manpoor 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 лупусом еритематозусом (SLE). Орална примена ММ у ових мишева одложила је појаву болести што је закључено на основу степена оштећења бубрега, али и значајно продужила

њихов животни век. Такође, ММ је узроковао смањен ниво IL-10 у серуму ових мишева, смањен број аутореактивних В лимфоцита у слезини као и нижу концентрацију аутоантитела усмерених на једноланчану (ssDNA) и дволанчану (dsDNA) дезоксирибонуклеинску киселину. Ови резултати указују да ММ може бити од користи за особе у ризику за развој SLE, као и за пацијенте у раним фазама болести. Kagasa и сар. (2010) су показали да ММ може да спречи настанак колитиса код пацова користећи експериментални модел за акутни улцеративни колитис где се запаљење изазива сирћетном киселином. У овој студији, орално давање ММ је смањило број мастоцита и површину ерозије колона. Поред анималних *in vivo* модела, анти-инфламацијски ефекти ММ су показани и *in vitro*, на ћелијама као што је ћелијска линија периодонталног лигамента (MPDL22 ћелије) (Yanagita и сар., 2011). ММ је инхибирао продукцију IL-6 и хемокинског лиганда CXCL10 од стране MPDL22 стимулираних са LPS порекла *Porphyromonas gingivalis*. У истој студији је показано да ММ смањује експресију CD54 молекула на овим ћелијама. Ефекти ММ на аутоимуност у Гравесовој болести, орган специфичној аутоимунској болести, испитивани су на периферним лимфоцитима добијених из шест пацијената са Гравесовом болешћу (Erem и сар., 2006). ММ је узроковао повећање концентрације IFN- γ и смањење количине TNF- α у супернатантима ћелијских култура лимфоцита. Такође је наглашено да је ММ смањено ниво антитела усмерених на рецептор за тиростимулишући хормон (TSH) у овим супернатантима.

Дејство ММ је до сада испитивано на неколико врста тумора као што су Ерлихов тумор, леукемија АКР мишева, 6С₃НЕД лимфосарком, сарком 180, ТА₃ карцином дојке, L1210 и P388 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 ММ 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 ММ није утицао на формирање метастаза карцинома дојке и фибросаркома индукованог метилхолантrenom код СВА мишева, када се даје интраперитонеално или субкутано. Међутим, истовремено интравенско давање ММ и туморских ћелија је инхибирало формирање метастаза. Такође, ММ је ефикасно инхибрирао раст два мишја тумора: Ерлиховог солидног тумора анд 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 ММ су алергијске реакције (Pavel и сар., 2011). Срећом, тешке алергијске реакције на ММ су ретке; до сада је објављено само око 20 случајева у свету (Katayama и сар., 2008). Након оралне примене ММ, 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 преваленција позитивних кожных тестова на ММ је присутна међу особама које су атопијске конституције (Leung и сар., 1997). Истражујући главне алергене ММ користећи серуме преосетљивих пацијената Rosmilah и сар. (2008) су показали да су главни имуноглобулин (Ig) Е везујући протеини млека MRJP1 и MRJP2. Они су, такође, показали да су испитаници са клиничком сликом алергије на ММ имали у серуму IgE антитела на 15 протеина ММ.

Упркос томе што може код предиспонираних особа да изазове алергијске реакције, показано је да ММ испољава антиалергијски ефекат на животињским моделима алергијских болести (Oka и сар., 2001, Taniguchi и сар., 2003). Oka и сар. (2001) су проучавали антиалергијски ефекат оралне примене ММ на DNP-KLH

имунизованим мишевима (Dinitrophenol-Keyhole Limpet Hemocyanin). MM је смањио продукцију антиген-специфичних IgE и инхибирао ослобађање хистамина из мастоцита, што је довело да изостанка реакција I типа преосетљивости на кожи ува. Осим тога, ова студија је показала да је MM усмерио имунски одговор са T helper (h) 2 на Th1 путем повећања продукције IFN- γ и смањене IL-4 у CD4 + T лимфоцитима добијених из DNP-KLH мишева. Поред тога, MM је смањио експресију информационе рибонуклеинске киселине (mRNK) за IL-12p40 и инхибирао продукцију простагландина (PG) E2 у макрофагима DNP-KLH мишева. Орална примена MM код NC/Nga мишева третираних са пицирил хлоридом је спречила развој кожных лезија сличних атопијском дерматитису и инхибирала TNP-специфичну продукцију IFN- γ од стране спленоцита (Taniguchi и сар., 2003). Интраперитонеална апликација MM 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 из OVA/Alum-имунизованих BALB/c мишева (Kataoka и сар., 2001).

MM утиче на апоптозу и степен оксидативног стреса у ћелијама јетре и бубрага пацова третираних хемотерапеутиком цисплатином (Karadeniz и сар., 2011). Профилактичко давање MM значајно смањује количину малондиалдехида (MDA) у ћелијама јетре и бубрага цисплатином третираних пацова. Позитивни ефекат MM на антиоксидативни заштиту видљив је и у повећању количине глутатиона (GSH), као и већој активности глутатион пероксидазе (GSH-Px), глутатион-S-трансферазе (GST) и супероксид дисмутаза (SOD) (Karadeniz и сар., 2011). MM, такође, смањује токсичност угљентетрахлорида, кадмијума и парацетамола *in vivo* инхибирајући липидну пероксидацију, губитак флуидности биолошких мембрана, промену мембранског потенцијала и пермеабилност ћелијске мембране (Çavuşoğlu и сар., 2009, Kanbur и сар., 2009, Semek и сар., 2010).

Неутрофили

Неутрофили се константно стварају у костној сржи из мијелоидних прекурсора. Њихова дневна производња може достићи и до 2×10^{11} ћелија (Vorregaard, 2010). Процес синтезе неутрофила је контролисан фактором стимулације колоније гранулоцита (G-CSF) (Lieschke и сар., 1994), који се производи у одговору на ИЛ-17А кога синтетишу Т лимфоцити (Ley и сар., 2006). С друге стране, ослобађање ИЛ-17А је под контролом ИЛ-23 који потиче из резидентних макрофага и дендритских ћелија. Током инфламације број неутрофила у ткивима се повећава, а временом ћелије умиру апоптозом и бивају уклоњене макрофагима и дендритским ћелијама. Овај процес узрокује нисходну регулацију синтезе ИЛ-23 у макрофагима и дендритским ћелијама, што за последицу има смањење G-CSF (Stark и сар., 2005, Ley и сар., 2006, Amulic и сар., 2012, Kolaczkowska 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: миелобласт, промиелоцит, миелоцит, метамиелоцит и, на крају, полиморфонуклеарне (сегментиране) ћелије (Vorregaard, 2010). Неутрофилне грануле се формирају током сазревања од промиелоцитне фазе.

Број циркулишућих неутрофила се разликује код људи и мишева. Код људи, 50-70% циркулишућих леукоцита су неутрофили, док је код мишева само 10-25 % (Hampton и сар., 1998, Doeing и сар., 2003, Mestas и Hughes, 2004, Amulic и сар., 2012). У циркулацији, зрели неутрофили 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 (MPO) (Nusse и Lindau, 1988, Lacy, 2005). Ове грануле такође садрже дефензине, лизозиме, BPI (енгл. bactericidal/permeability-increasing protein) и серин протеазе: неутрофилну еластазу (NE), протеиназу 3 (PR3) и катепсин G (CG) (Faurischou и Borregaard, 2003). Други тип гранула, специфичне (или секундарне) грануле, су мање (пречника 0,1 μm), не садрже MPO, 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 Borregaard, 2003, Lacy, 2005). Трећи тип, желатиназне (терцијарне) грануле, такође су MPO-негативне, мање су од специфичних гранула и садрже бројне металопротеиназе, попут желатиназе и леуколизина. Оне се најкасније формирају у току развоја неутрофила (Borregaard 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 (Borregaard и сар., 2007).

При активацији неутрофила настаје мобилизација гранула и оне фузионишу или са плазма мембраном или са фагозомом, ослобађајући притом њихов садржај (Borregaard и Cowland, 1997). Различите врсте гранула показују различиту склоност за мобилизацију у одговору на инфламацијске сигнале. Најтеже се мобилишу азурофилне, а затим специфичне и желатиназне грануле, и коначно, секреторне везикуле (Borregaard и сар., 1992, Kjeldsen и сар., 1992, Kjeldsen и сар., 1993, Sengelov и сар., 1993, Borregaard 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 (ROS) (Jesaitis и сар., 1990). Дегранулације

примарних и секундарних гранула доприноси стварању антимикубног амбијента на месту запаљења.


Неутрофили произведе велики број пептида и протеина који директно или индиректно убијају микроорганизме. Ове антимикубне супстанце се могу сврстати у три групе: (а) катјонски пептиди и протеини који се везују за мембране микроорганизма; (б) ензими; (в) протеини који онемогућавају микроорганизме да користе есенцијалне хранљиве материје. У групу катјонских антимикубних пептида спадају дефензини и кателицидини, док су најзначајнији катјонски протеини ВР1 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 антимикубне активности, могу да потенцирају активацију дендритских ћелија (DC) (Lande и сар., 2007). ВР1 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 микроорганизма и представљају једну од првоописаних антимикубних супстанци (Hirsch, 1958). Друга класа неутрофилних антимикубних супстанци обухвата велики број протеолитичких ензима који учествују у убијању микроорганизма. Ту спадају лизозим, који уништава бактеријски зид (Nash и сар., 2006) и неколико серин протеаза као што су PR3, CG, NE; познате као серпроцидини (Weinrauch и сар., 2002). Поред ових ензима постоји још један протеин који припада овој групи. То је азуроцидин, који не испољава протеолитичку активност, али има антимикубно дејство (Campanelli и сар., 1990). Трећу класу неутрофилних антимикубних супстанци чине протеини који имају способност да хелирају есенцијалне матале 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).

Након активације, неутрофили производе реактивне кисеоничне врсте (енгл. Reactive Oxidative Species, ROS) у процесу који се зове респираторни прасак. Први корак у настајању ROS је склапање комплекса NADPH оксидазе на плазма мембрани и мембрани фагозома. NADPH оксидаза редукује молекулски кисеоник до супероксида ($O^{\bullet-}$) који процесом дисмутације прелази у водоник-пероксид (H_2O_2). Супероксид такође може да реагује и са азот-оксидом (NO), који је присутан у високим концентрацијама на месту запаљења, формирајући пероксинитрит, јак оксидант. Након дегранулације у фагозома, MPO реагује са H_2O_2 при чему настаје хипохлорна киселина (HOCl) која је реактивнија од супероксида и има антимикуробно дејство *in vitro*. Стога се претпоставља да има директан антимикуробан ефекат у фагозомима (Hampton и сар., 1998, Bogdan и сар., 2000, Winterbourn и сар., 2006, Winterbourn, 2008). ROS су веома важни за антимикуробну активност неутрофила. Наиме, неутрофили особа са хроничном грануломатозном болешћу (CGD) показују слабу антимикуробну активност, што чини ове пацијенте осетљивим на многе инфекције (Segal и сар., 2000). Иако је MPO важна за микробицидну активност неутрофила *in vitro*, парадоксално је да већина MPO-дефицијентних особа имају наизглед нормалан имунски одговор, без клиничких манифестација имунодефицијенције (Klebanoff, 2005, Nauseef, 2007). Ово указује да MPO није есенцијална за антимикуробну активност неутрофила и да, у одсуству MPO, други ROS (супероксид, водоник-пероксид, хидропероксил радикал, пероксинитрит) могу обављати антимикуробну активност (Winterbourn и сар., 2006).

Неутрофили могу након снажне активације да уђу у NETozu (енгл. neutrophil extracellular traps), активну форму ћелијске смрти која доводи до ослобађања декондензованог хроматина у екстрацелуларни простор (Brinkmann и сар., 2004, Fuchs и сар., 2007, Amulic и сар., 2012). Влакнасте структуре које се називају NET-ови садрже

хистоне, као и антимикробне протеине пореклом из цитоплазме и из гранула (лактоферин, CG, дефензини, LL37, неутрофилна еластаза, PR3, MPO и желатиназа) (Urban и сар., 2009, Kolaczowska и Kubes, 2013). *Ex vivo* је показано да NET-ови могу да “хватају” и убијају многе микроорганизме излажући их локално високим концентрацијама антимикробних супстанци (Parasannopoulos и Zychlinsky, 2009). Механизам којим се NET-ови формирања није у потпуности разјашњен. Међутим, показано је да је за процес NEToze неопходна нормална функција NADPH оксидазе и MPO, односно синтеза ROS (Fuchs и сар., 2007, Patel и сар., 2010, Metzler и сар., 2011). Може се рећи да је за све познате активаторе NEToze до сада, била неопходна продукција ROS. Важност NEToze у одбрани од патогених микроорганизама потврђује и податак да се бактерије које испољавају ензим који разграђује DNA као фактор вируленције лакше шире у организму и показују већу патогеност. Настанак овог ензима код ових 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, формирање NET-ова и убијање ћелија овог микроорганизма посредовано NET-овима *ex vivo*, али не фагоцитозом (Bianchi и сар., 2009). С друге стране, предпоставља се да NET-ови имају веома важну улогу у борби против инфекција изазваним великим микроорганизмима, који 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. Наиме, све се више истражује улога NET-ова у патогенези SLE, аутоимусног обољења које се одликује појавом аутоантитела претежно на компоненте хроматина и неутрофила (Kessenbrock и сар., 2009, Nakkim и сар., 2010, Garcia-Romo и сар., 2011, Lande и сар., 2011, Villanueva и сар., 2011).

The background features a decorative graphic consisting of three overlapping blue circles of varying sizes, arranged in a triangular pattern. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The text is centered within this 'V' shape.

Хипотезе и циљеви истраживања

Иако први научни радови о 10-HDA датирају још од педесетих година прошлог века (Townsend и Lucas, 1940, Townsend и сар., 1959) мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози. Досадашња истраживања углавном на моделима животињских ћелија су показала њено анти-инфламаторно својство. Две новије 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, Yung и сарадници су показали да 10-HDA супримира продукцију матриксних металопроотеиназа 1 и 3 порекла фибробласта изолованих од пацијената са реуматоидним артритисом (Yang и сар., 2010). Истраживања спроведена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије су показала да водени екстракт матичног млеча и 10-HDA имају имуномодулаторна својства на ћелијама пацова (Gasic и сар., 2007, Vucevic и сар., 2007). С друге стране, 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 са овом масном киселином смањује степен оксидативног стреса индукованог ултравиолетним А зрачењем (Zheng и сар., 2012).

На основу 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 на интеракцији дендритских ћелија и Т лимфоцита, поставили смо следеће

Хипотезе

1. 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro* при чему у високим концентрацијама делује инхибиторно, а у мањим концентрацијама стимулаторно
2. 10-HDA у опсегу имуносупресивних концентрација 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 са фобол-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 са PMA
4. Испитати способност 10-HDA да „хвата“, односно да реагује са реактивним кисеоничним врстама користећи системе без ћелија
5. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на пролиферацију мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMNC) стимулираних

фитохемаглутинином (РНА) и алогених $CD4^+$ Т лимфоцита у кокултури са дендритским ћелијама моноцитног порекла (MoDC)

6. Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина у култури PBMNC стимулираних са РНА
7. Испитати дозно-зависан ефекат 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора (Th1, Th2, Th17, Т регулаторни) на моделу интеракције MoDC и $CD4^+$ Т лимфоцита, као и РНА стимулираних PBMNC

The page features a decorative graphic consisting of three overlapping circles in shades of blue, arranged in a diagonal line from the top right to the bottom right. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles and the text.

Материјал и методе

Медијуми и реагенси

RPMI 1640 медијум

RPMI 1640 медијум (Sigma, 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, Аустрија), 50 μM 2-меркаптоетанола (2-ME, Sigma), 50 i.j/ml пеницилина (Галеника) и 50mg/ml стрептомицина (Галеника) коришћен је за култивацију мононуклеарних ћелија периферне крви и дендритских ћелија и представља комплетан RPMI медијум. За изолацију мононуклеарних ћелија периферне крви 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)

HBSS је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,26mM CaCl_2 (Merck, Немачка), 5,37mM KCl (Serva, Немачка), 0,81mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (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). pH 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 0,05% FCS (PAA Laboratories) и 10nM HEPES-ом (Flow Laboratories, Irvine, Scotland). Овај медијум је коришћен за култивацију неутрофила периферне крви у појединим експериментима.

PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline), pH 7,4

PBS је направљен коришћењем следећих супстанци: 1,06 mM KH_2PO_4 (Merck), 155,17 mM NaCl (Merck), 2,97 mM Na_2HPO_4 (Merck).

PBS1

PBS1 је PBS са 0,01% NaN_3 (Sigma)

PBS2

PBS2 је PBS1 са 2% FCS-ом (PAA Laboratories).

Калијум-PBS

K-PBS је направљен коришћењем следећих супстанци: 137 mM NaCl (Merck), 2,7 mM KCl (Serva), 8,1 mM Na_2HPO_4 (Merck), 1,5 mM KH_2PO_4 (Merck). Овај пуфер је коришћен за ELISA тестове.

Хипотони пуфер са пропидијум јодидом (PI)

Хипотони пуфер са PI је направљен на следећи начин: 250 μL PI штока (10 mg/mL у H_2O , Sigma), 2,2 mL натријум цитрата (2,2g у 10 mL H_2O , Merck), 50 μL Triton X-100 (Serva); допунити са H_2O до 50ml. Овај пуфер се чува на $+4^\circ\text{C}$ у мраку.

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

Лизинг пуфер је направљен десет пута концентрован на следећи начин: 8,02g NH_4Cl (Merck), 0,84g NaHCO_3 (Merck), 0,037g Na_2EDTA (Sigma); све ово растворити у

100ml дестиловане воде. Овај пуфер, разблажен десет пута са дестилованом водом, је коришћен за лизирање контаминирајућих еритроцита у току изолације неутрофила.

Фосфатни пуфер, 19mM, pH 7,4

Фосфатни пуфер је направљен помоћу следећих супстанци: 3,943g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 0,592g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck); све растворити у 1000ml дестиловане воде.

Фосфатни пуфер, 100mM, pH 7,4

Фосфатни пуфер је направљен помоћу следећих супстанци: 20,755g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,117g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; све растворити у 1000ml дестиловане воде.

Рекомбинантни хумани GM-CSF

Рекомбинантни хумани GM-CSF (rh GM-CSF; Leucotax, специфичне активности 4.44×10^6 U; Sandoz-Schering Plough, Швајцарска). Растворен је под стерилним условима у дестилованој води у концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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, Немачка). Растворен је под стерилним условима у дестилованој води у концентрацији од 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ и чуван на -80°C до употребе. У експериментима је коришћен у финалној концентрацији од 20 ng/ml.

10-HDA

У експериментима је коришћена комерцијална 10-HDA (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Јапан). 10-HDA је растворена у DMSO у концентрацији од 2M, аликвотирана и чувана на -40°C.

LPS

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

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

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 зависности од експеримената коришћен је у концентрацијама од 16nM, 32nM и 48nM.

N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланин (fMLP)

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

Опсонизовани зимозан (opZy) је припремљен на следећи начин (Allen, 2014): 50 mg зомозана (Sigma) је помешано са 5 ml стерилног PBS-а и сонификовано 5 минута у

ултразвучном купатилу, а затим инкубирано у кључалом воденом купатилу 10мин. После инкубације, уследило је центрифугирање (400g, 10 минута) при чему су партикуле зимозана пале на дно епрувете. Супернатант је одбачен, а пелет 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 250 μ l (5 mg) и чуван на -40°C . Радни раствор зимозана је добијен разблаживањем са HBSS-ом до концентрације од 1mg/ml. opZу 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 пелетиране центрифугирањем (3 минута, 16000g) и испране два пута са HBSS. Овако припремљене партикуле opZу 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 са PBS-ом до концентрације од 1mM, аликвотиран и чуван на -20°C .

Луминол

Луминол (Fluka, Немачка) је растворен у свеже припремљеном 0,1M NaOH (из 5M штока) до концентрације од 50 mM. Раствор луминола добијен на овај начин је стабилан неколико месеци ако се чува на собној температури заштићено од светлости. У експериментима је коришћена концентрација од 50 μ M, добијена разблаживањем штока непосредно пре експеримената.

2',7'-дихлородихидро-флуоресцеин диацетат

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

p-Нитроблутетразолијум хлорид (NBT)

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

Изолација и култивација ћелија

Изолација неутрофила

Неутрофили периферне крви су изоловани из крви добровољних давалаца којој је као антикоагуланс додат K₃EDTA. У 10 ml крви је додато 3 ml 5% декстрана и након седиментације ћелија на собној температури 35 минута издвојила се плазма обogaћена леукоцитима. Таква плазма је пажљиво сакупљена и нанета на површину Limforger градијента (PAA Laboratories, gustine 1.077g/ml) како би се добиле две фазе. После центрифугирања (2200 rpm, 20 минута на собној температури) издвојио се прстен моноклеарних ћелија, а на дну су се исталожили неутрофили и веома мали број еритроцита. Затим је на супернатант сипано 3 ml лизинг пуфера како би се лизирали преостали еритроцити у трајању од 2 минута уз лагано мешање аутоматском пипетом. После лизирања ћелије су испране и ресуспендоване у HBSS-у. Чистоћа ћелијске суспензије је одређивана бојењем ћелија Türk-овим раствором, а вијабилност утврђена бројањем ћелија у 0.2% раствору Трипан плавог. Овако добијени неутрофили су коришћени према потребама експеримента.

Изолација мононуклеарних ћелија периферне крви

Мононуклеарне ћелије периферне крви (PBMNC) су изоловане из леукоцитног концентрата (енгл. buffy coat) центрифугирањем на Limforprep градијенту. Леукоцитни концентрат, добијен од крви добровољних давалаца је обезбедио Институт за трансфузиологију Војномедицинске академије. Леукоцитни инфилтрат је разблажен три пута са медијумом за изолацију, а затим је у стаклене епрувете запремине 12 ml у којима се налази 2,5 ml градијента пажљиво нанет тако да се формирају две фазе течности. Епрувете су потом центрифугиране на 2200 rpm, 20 минута на собној температури при чему се издваја прстен који садржи мононуклеарне ћелије периферне крви. Прстени из свих епрувета су сакупљени, а затим су мононуклеарне ћелије испране од градијента центрифугирањем на 1400 rpm 8 минута на собној температури. Преостали тромбоцити су уклањени понављаним центрифугирањем и испирањем на 800 rpm 8 минута на собној температури минимум 3 пута. Ћелије су затим ресуспендоване у комплетном медијуму и бројане. Овако добијене ћелије су коришћене за изолацију моноцита и Т лимфоцита, али и за постављање културе.

Изолација моноцита

Моноцити су изоловани из PBMNC на основу њихове способности да адхерирају на површину пластичних фласкова. Засејано је 30×10^6 ћелија/фласку величине T25 у 5ml комплетног медијума. Након једночасовне инкубације на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO₂, неадхерентна фракција ћелија је одстрањена испирањем са PBS-ом, а адхерентна (моноцитна) фракција даље култивисана према потребама експеримента.

Добијање и култивација MoDC

Моноцити добијени на описан начин су култивисани 6 дана у пластичним фласковима на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO₂ у комплетном

медијуму уз додатак GM-CSF (100 ng/ml) и IL-4 (20 ng/ml). По истеку шестог дана култивације, један мали део незрелих MoDC је сакупљен и анализирана им је експресија CD1a и CD14 молекула методом цитофлуориметрије, док је други знатно већи део стимулисан LPS-ом у одсуству или присуству 10-HDA (50 μ M и 500 μ M). Након 48 сати инкубације, ћелије су сакупљене и даље коришћене у фенотипским и функционалним тестовима. 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 помоћу имуномагнетног сортирања

За поставку културе мешане леукоцитне реакције (енгл. mixed leukocyte reaction, MLR) и одређивање способности MoDC за поларизацију имунског одговора Th лимфоцита коришћени су CD4⁺T 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, Немачка). Прво су 1x10⁷ PBMNC инкубирани 15 минута на хладном, у пуферу за магнетно сортирање (2 mM EDTA; 0,5% FCS (Sigma, Немачка)), 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 и инкубирани 15 минута на хладном са анти-биотин антителима за која су везане магнетне партикуле. Након инкубације, ћелије су испране, ресуспендоване у 500 μ l пуфера 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 коњугованих флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC, fluorescein isothiocyanate) (Serotec, Oxford, UK).

Бројање ћелија

У циљу сагледавања броја изолованих ћелија, мали део ћелија је обојен 0.1% раствором Трипан плавог. Обојене ћелије су нанете на Neubauer-ову комору за бројање уобличених елемената крви и посматране на светлосном микроскопу. Током бројања нису рачунате ћелије које су обојене плаво.

Процена ћелијске вијабилности

Мерење апоптозе бојењем раствором Türk-a

Апоптоза ћелија одређивана је морфолошком анализом свежих ћелија обојених раствором Türk-a (2×10^5 ћелија у 50 μ l медијума или HBSS + 100 μ l Türk-овог раствора). На мултиспот плочицу је стављено 10 μ l ћелијске суспензије, а затим покривено покровним стакалцем. Узорци су анализирани на светлосном микроскопу (OLYMPUS CX31) бројањем најмање 500 ћелија по препарату.

Мерење апоптозе и вијабилности коришћењем пропидијум јодида

Мерење апоптозе помоћу пропидијум јодида је рађено тако што је након култивације у 50 μ l ћелијске суспензије додато 250 μ l раствора пропидијум јодида у хипотонном цитратном пуферу. После 15 минута инкубације на леду ћелије су анализирани на проточном цитофлуориметру (Cube 6, Partec, Немачка), а обрада података је урађена помоћу програма FCS Express 4 (De Novo Software, Glendale, CA). Апоптотичне ћелије су се сматрале оне са хиподиплоидним пиком. За процену вијабилности, ћелијама је додат раствор PI у PBS-у, а после 10 минута ћелије су анализирани на цитофлуориметру. Вијабилност је одређивана по формули $100\% - \% PI^+$ ћелија.

Фенотипска анализа ћелија

Степен матурације и активације MoDC одређивана је на основу испољавања карактеристичних површинских молекула. За ову методу су коришћена мишја

моноклонска антитела (mAt) (доле побројана) која су специфична за хумане антигене и коњугована флуоресцентним бојама (FITC и фикоеритрин (PE, phycoerythrin)).

Моноклонска антитела коришћена у фенотипској анализи MoDC:

анти-CD40 (FITC)	1:10	BD Biosciences, USA
анти-CD54 (PE)	1:10	Serotec, UK
анти-CD83 (FITC)	1:10	BD Biosciences, USA
анти-CD86 (PE)	1:10	Serotec, UK
анти-HLA-DR (PE)	1:10	Serotec, UK
анти-CD1a (PE)	1:10	Serotec, UK

Непосредно пре додавања mAt ћелије су испране и ресуспендоване у хладном PBS1 у концентрацији од 1×10^5 ћелија/50 μ l. У ћелијске суспензије су додата mAt у финалним разблажењима приказаним горе. Ћелије су инкубиране 30 минута на +4°C, испране у PBS1 (центрифугирањем на 1400 rpm, 8 минута, на +4°C) и фиксиране у 4% формалину. Као контролни узорци коришћена су ирелевантна анти-мишја mAt коњугована FITC-ом или PE. 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 по узорку. Резултати су приказани у облику средњих вредности интензитета флуоресценце (енгл. mean fluorescence intensity, MFI).

Процена функционалних карактеристика ћелија

Тест пролиферације PBMNC

PBMNC (3×10^5 по базену у финалној запремини од 250 μ l) су култивисане у плочи од 96 места (Sarstedt, Немачка) у комплетном медијуму, у одсуству или присуству различитих концентрација 10-HDA. За стимулацију пролиферације је коришћен фитохемаглутинин (PHA, 30 μ g/ml). Културе су инкубиране у термостату са 5% CO₂ на 37°C, током 72h. Последњих 18 сати култивације ћелијама је додат [³H]-тимидин (Amersham International, Велика Британија, специфичне активности 6.7 Ci/mmol) у концентрацији од 1 μ Ci по базену. Ћелије су сакупљене аутоматским скидачем култура (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, USA), а уградња [³H]-тимидина је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача (LKB-1219 Rackbeta, Finland).

Алостимулаторна способност MoDC

Алостимулаторна способност третираних MoDC одређивана је према степену пролиферације алогених CD4⁺ Т лимфоцита у ко-култури са MoDC. У плочу од 96 места (Sarstedt, Germany) додате су MoDC (stimulatori) у двоструко опадајућим концентрацијама ($0,5 \times 10^4$ - $0,125 \times 10^4$ по базену) и CD4⁺Т лимфоцити (респондери) у константној концентрацији од 1×10^5 по базену у финалној запремини од 200 μ l. Ћелије су култивисане 5 дана у комплетном медијуму на 37°C и 5% CO₂. Током последњих 18 сати култивације ћелијама је додат [³H]-тимидин у концентрацији од 1 μ Ci по базену. Након 5 дана, ћелије су сакупљене аутоматским скидачем култура, а уградња [³H]-тимидина је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача (LKB-1219 Rackbeta, Финска).

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила методом хемилуминисценције помоћу луминола

Неутрофили ($2,5 \times 10^5$ /200 μ l HBSS; у црној плочи од 96 места са равним дном (Costar 96-Well Black, MA, USA) су после тридесетоминутне пре-инкубације са

растућим концентрацијама 10-HDA (0,05mM -2mM) и луминолом (50 μ M) стимулисане са PMA (16nM), OpZy (10 μ g/ml) или fMLP-ом (1 μ M); Одмах након стимулације помоћу хемилуминисцентног спектрометра (Synergy HT, BIO-ТЕК, Vermont, USA) почело је мерење интензитета емитоване светлости који је пропорционалан синтетисаним реактивним кисеоничним врстама.

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила колориметријски помоћу NBT теста

Потенцијал стварања супероксида у ћелијама је праћен NBT тестом. Ћелије (2 x 10⁵/200 μ l медијума; у плочи од 96 места са равним дном (Sarstedt)) су после тридесетоминутне пре-инкубације са различитим концентрацијама 10-HDA (0,25mM - 2mM) стимулисане са PMA (16nM), fMLP (10 μ M) или opZy (10 μ g/ml). Истовремено са стимулусима у ћелијске културе је додат NBT у финалној концентрацији од 0.5 mg/ml. Ћелије су затим инкубирани наредних 90 минута у термостату на 37°C. У току инкубације настала је редукција жуто обојеног NBT-а у дифорамазан. Реакција редукције NBT-а је заустављена 1% раствором HCl-SDS (Serva) у којој се настали диформазон раствара. Интезитет растворене боје који је директно сразмеран активности NADPH оксидазе, мерен је на спектрофотометру на таласној дужини од 570 nm (референтна 650 nm).

Одређивање продукованих цитокина

Концентрације свих доле наведених цитокина је одређивана употребом комерцијалних сендвич ELISA китова према упутствима произвођача.

Утицај 10-HDA на функцију PBMNC сагледана је на основу продукције цитокина у супернатантима 72h култура ових ћелија са различитим концентрацијама 10-HDA и фитохемаглутинаином PHA (30 μ g/ml, Serva) као стимулусом. Одређиване су

концентрације IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-6 и TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Утицај 10-HDA на функцију МоDC процењиван је на основу продукције цитокина у супернатантима култура МоDC третираних различитим концентрацијама 10-HDA са LPS-ом (Sigma) (1 μ g/ml) као стимулусом у трајању од 48 сати. Одређивана је концентрација IL-12p70, IL-18, IL-10 и TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Способност МоDC у усмеравању Т ћелијског имунског одговора одређивана је мерењем концентрација карактеристичних цитокина из супернатаната ко-култура МоDC и алогених CD4⁺T лимфоцита: IFN- γ , IL-2, IL-10 (R&D Systems), IL-4 (Invitrogen Biosource, Carlsbad, USA).

Статистичка обрада података

Најпре је испитивана правилност расподеле добијених вредности. За упоређивање вредности које су имале правилну расподелу, на основу Kolmogorov-Smirnov теста, коришћени су параметарски тестови: Student-ов t тест и једноструки ANOVA тест са Dunnett пост тестом. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски Mann-Whitney тест. 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., USA). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) из најмање три независна експеримента.

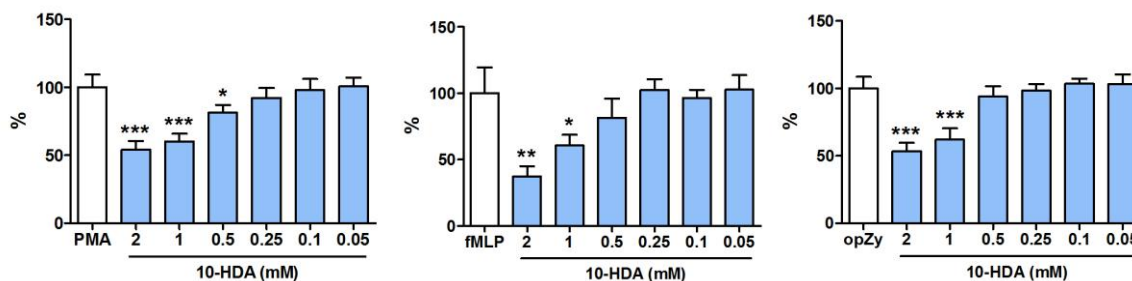
The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a gradient from dark blue to light blue. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The circles are positioned in the upper right and lower right areas of the page.

Результати

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, који може да детектује интрацелуларну и екстрацелуларну продукцију различитих ROS. Добијени резултати су показали да 10-HDA у високим концентрацијама (1mM и 2mM) смањује продукцију ROS у неутрофилима стимулираним са PMA, fMLP и opZy. Такође, статистички значајна инхибиција је присутна и при концентрацији од 0,5 mM када се као стимулус користио PMA, док код остала два стимулуса није било разлике у односу на контролу при овој концентрацији 10-HDA (Графикон 1).

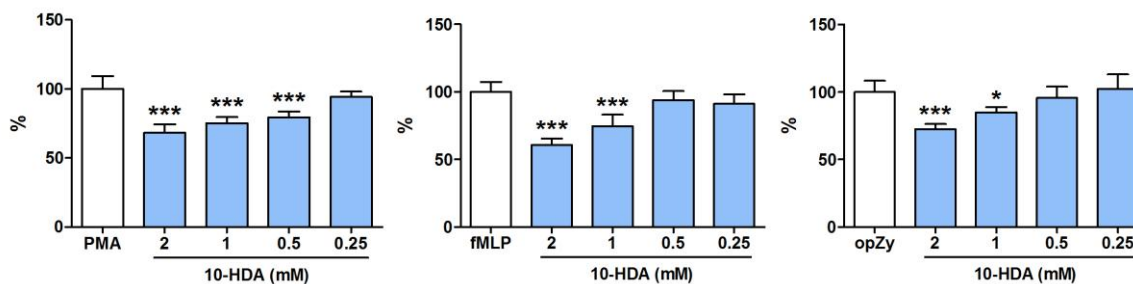


Графикон 1. Ефекат 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила.

Неутрофили ($1 \times 10^6/\text{ml}$ у HBSS) су после тридесето-минутне пре-инкубације са различитим концентрацијама 10-HDA (0,05mM-2mM) и луминолом ($50\mu\text{M}$) биле стимулиране са PMA (16nM), fMLP ($1\mu\text{M}$) и opZy ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Одмах након стимулације почело је мерење интензитета емитоване светлости која је пропорционална синтетисаним ROS. Приказана је средња вредност релативног интензитета продукције ROS у односу на контролу ($100\% \pm \text{SD}$) из три експеримента. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

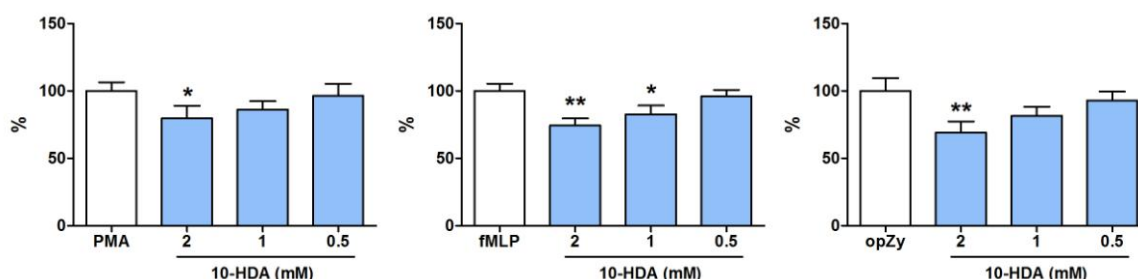
С обзиром да луминол неспецифично реагује са различитим ROS, желели смо да видимо како 10-HDA утиче на продукцију појединачних ROS у неутрофилима, као што су $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HOCl$. Стога смо користили различите методе детекције ROS, а које су специфичне за појединачне ROS. Интрацелуларну продукцију супероксидног ањона смо мерили колориметријски помоћу NBT теста.

Резултати приказани на графикону 2. показују да је 10-HDA (1mM и 2mM) дозно зависно смањила интрацелуларну продукцију $O_2^{\cdot-}$ у неутрофилима стимулираним са PMA, fMLP и opZy. Такође, 10-HDA у концентрацији од 0,5mM је имала статистички значајан ефекат на продукцију $O_2^{\cdot-}$ само код неутрофила стимулираних са PMA, док остале примењене концентрације нису модулисале стварање $O_2^{\cdot-}$ у неутрофилима после стимулације.

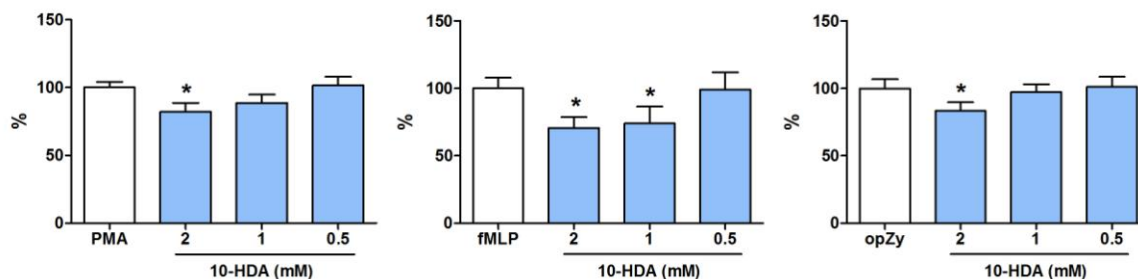


Графикон 2. Ефекат 10-HDA на продукцију супероксида од стране хуманих неутрофила. Неутрофили ($1 \times 10^6/ml$ у HBSS) су се инкубирали 30 минута са 10-HDA (0,25mM-2mM), а затим су им додати стимулуси PMA (16nM), fMLP (1 μ M) или opZy (10 μ g/ml) и NBT (0,5 mg/ml). Након двочасовне инкубације и центрифугирања микротитарске плоче, супернатант је сакупљен, а на пелет је сипан SDS-HCl како би се дифорамазан растворио. Интезитет растворене боје је мерен на спектрофотометру на таласној дужини од 570 nm (референтна 650 nm). На графикону су приказане средње вредности продукције $O_2^{\cdot-}$ у односу на контролу (100%) \pm SD из три експеримента. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Даљи увид у ефекат 10-HDA на продукцију осталих ROS спроведен је цитофлуориметријом помоћу DCF-DA, флуоресцентне боје којом се интрацелуларно могу детектовати H_2O_2 и хидроксилни радикал (HO^\bullet), као и поједине реактивне врсте азота. Као што се може уочити на графикону 3, 10-HDA је само у највећој примењеној концентрацији (2 mM) смањила количину продукованих ROS у хуманим неутрофилима стимулираних са PMA и opZy, док остале примењене концентрације нису имале ефекта. Такође, 10-HDA је потентније инхибирала продукцију ROS, који се детектују овом методом, код неутрофила стимулираних са fMLP, јер је и мања концентрације (1mM) имала статистички значајан ефекат. Готово исти резултати су добијени применом цитофлуориметријске методе са другом флуоресцентном бојом DHR која специфично реагује са H_2O_2 и $HOCl$ (графикон 4).



Графикон 3. Ефекат 10-HDA на продукцију H_2O_2 и HO^\bullet од стране хуманих неутрофила. Неутрофили ($1 \times 10^6/ml$ у HBSS) су инкубирани 30 минута у присуству DCFH-DA ($1\mu M$). После испирања у HBSS, ћелије су преинкубирани 30 минута са 10-HDA (0,5mM -2mM), а затим стимулиране са PMA (16nM), fMLP ($1\mu M$) или opZy ($10\mu g/ml$). Након инкубације од 30 мин ћелије су испране у хладном PBS, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом. Приказане су средње вредности интензитета флуоресценце у односу на контролу (100%) $\pm SD$ из три експеримента. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



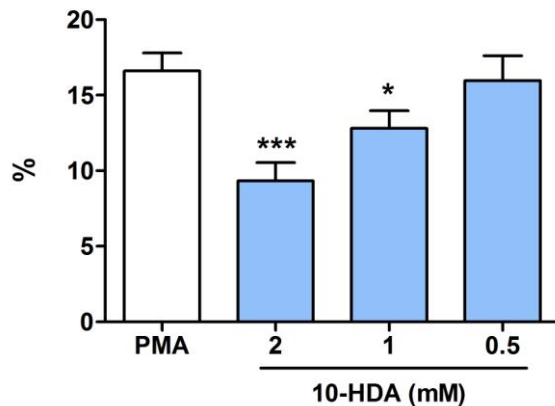
Графикон 4. Ефекат 10-HDA на продукцију H₂O₂ и HOCl од стране хуманих неутрофила. Неутрофили (1 x 10⁶/ml у HBSS) су после тридесетоминутне преинкубације са 10-HDA (0,5mM -2mM) третиране са DHR (10 μM) и различитим стимулусима PMA (16nM), fMLP (1μM) или opZy (10μg/ml). После 15 (PMA и fMLP), односно 30 минута (opZy) ћелије су стављене на лед током 10 минута, испрене у хладном PBS и фиксирани у 0,5% формалдехиду, а интензитет флуоресценце је мерен проточном цитофлуориметријом. Приказане су средње вредности интензитета флуоресценце у односу на контролу (100%) ±SD из три експеримента. *p<0.05; **p<0.01

Утицај 10-HDA на процес NEToze хуманих неутрофила периферне крви

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

Хумани неутрофили су инкубирани 30 минута са различитим концентрацијама 10-HDA (0,5mM-2mM), а затим стимулирани са PMA (48 nM), најпознатијим индуктором NEToze. Ослобађење NETova је квантификовано после 4h инкубације мерењем интензитета флуоресценце PI. Као што се може видети на графикону 8

претретман неутрофила са 10-HDA (1mM и 2mM) значајно редукује ослобађање NETова од стране хуманих неутрофила.



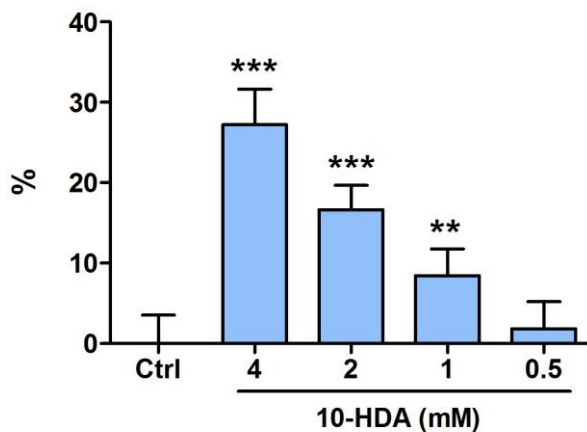
Графикон 5. Утицај 10-HDA на интензитет NETоге неутрофила. Неутрофили су преинкубирани у присуству или одсуству различитих концентрација 10-HAD (0,5mM-2mM) у трајању од 30 минута, а затим стимулирани са PMA (48nM). Интензитет NETоге је процењен на основу односа количине екстрацелуларне DNK и укупне количине DNK, користећи флуоресцентну боју Sytox Green, као што је то детаљно описано у делу Метеријал и методе. Резултати су приказани као средња вредност процента ћелија у NETоzi ±SD из три експеримента. *p<0.05; ***p<0.001

Антиоксидативна својства 10-HDA

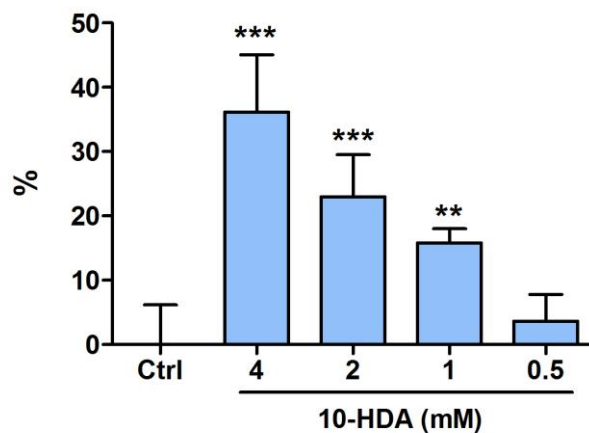
Способност 10-HDA да “хвата” реактивне кисеоничне врсте

У циљу испитивања способности 10- HDA да “хвата” реактивне кисеоничне врсте, ми смо користили системе без ћелија у којима су реактивне кисеоничне врсте хемијски продукване. Резултати су показали да 10-HDA у концентрацијама од 1mM-4mM има способност да реагује са супероксидним ањоном (графикон 5) и HOCl (графикон 6) испољавајући директни антиоксидативни ефекат. С друге стране, 10-HDA није реаговала са H₂O₂ у раствору што је показано на основу истог интензитета

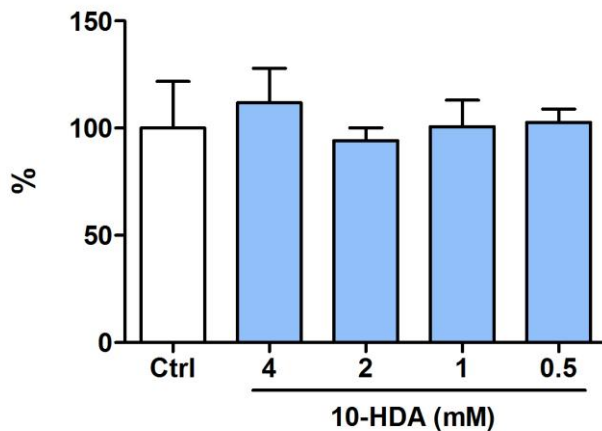
оксидације луминола од стране H_2O_2 без обзира на присуство или одсуство 10-HDA (графикон 7).



Графикон 6. Способност 10-HDA да хвата супероксидни анјон. $\text{O}_2^{\cdot-}$ је синтетисан помоћу NADH/PMS система. Способност 10-HDA да хвата овај слободни радикал кисеоника је квантификована спектрофотометријски мерењем интензитета редукције NBT. Витамин С је коришћен као позитивна контрола. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) редукције NBT до диформаза \pm SD из три експеримента. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Графикон 7. Способност 10-HDA да 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 микроплоча 5 минута по додавању HOCl, а витамин C је коришћен као позитивна контрола. Резултати су приказани као средња вредност инхибиције (у процентима) HOCl-индуковане оксидације DHR \pm SD из три експеримента. **p<0.01; ***p<0.001

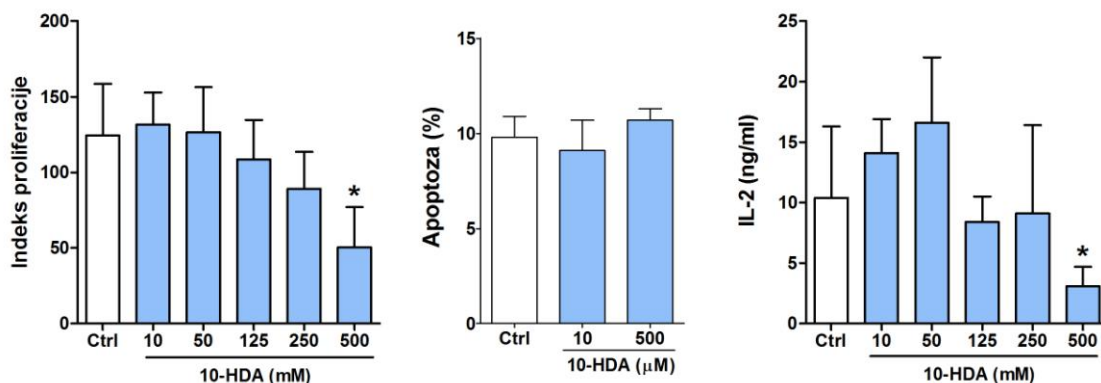


Графикон 8. Способност 10-HDA да хвата водоник пероксид. Реакциона смеше се састојала од следећих реагенаса у финалној запремини од 250 μ l: фосфатни пуфер (100mM, pH 7.4), луминол (50 μ M), 10-HDA (0,5mM-4mM) и 1% H₂O₂. Промена у интензитету хемилуминисцентног сигнала је мерена 15 минута по додавању H₂O₂ на читачу за микроплоче, а витамин С је коришћен као позитивна контрола. Резултати су приказани као средња вредност релативног интензитета оксидације луминола у односу на контролу (100%) \pm SD из три експеримента.

Ефекат 10-HDA на функцију хуманих мононуклеара периферне крви

Ефекат 10-HDA на пролиферацију хуманих лимфоцита

PBMNC су стимулисане са PHA (30 μ g/ml) и различитим концентрацијама 10-HDA (10 μ M-500 μ M). PBMNC стимулисане само са PHA су служиле као контрола. Резултати приказани на графикону 9A показују да је 10-HDA у концентрацији од 500 μ M инхибирала пролиферацију лимфоцита. Инхибирана пролиферација није била последица апоптозе ћелија (графикон 9B), али је била повезана са смањеном продукцијом IL-2 (графикон 9C).

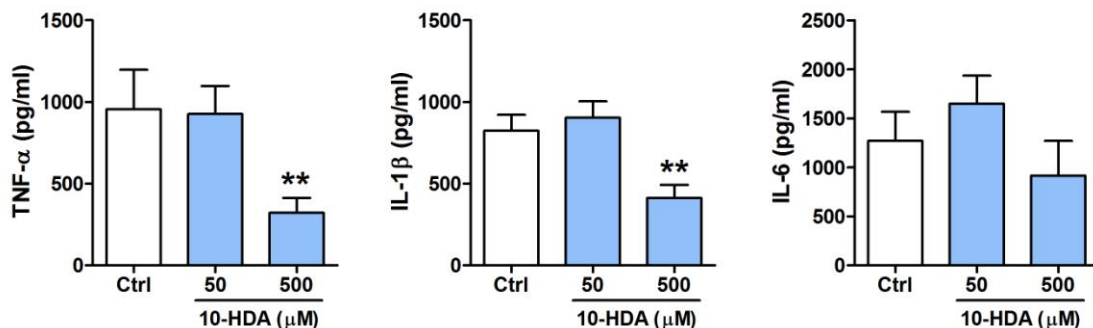


Графикон 9. Ефекат 10-НДА на пролиферацију (А), апоптозу (В) и продукцију IL-2 (С) од стране PBMNC. Ћелије су култивисане три дана са РНА или са РНА и различитим концентрацијама 10-НДА. А) Последњих 18 сати култивације ћелијама је додат [³H]-тимидин, а његова уградња је мерена помоћу сцинтилационог бета бројача. Резултати су приказани као средња вредност индекса пролиферације ±SD из пет експеримената. В) Ћелије су сакупљене, испране у PBS, обојене са PI у хипотонном цитратном пуферу и анализиране на проточном цитометру. Апоптотичним ћелијама су се сматрале оне са хиподиплоидним једром. Резултати су приказани као средња вредност процента апоптотичних ћелија ±SD (n=5). С) Супернатанти из ћелијских култура су сакупљени и коришћени за одређивање концентрације IL-2 помоћу ELISA методе. Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина ± SD (n = 5). *p < 0.05

Ефекат 10-НДА на продукцију про-инфламаторних цитокина

На основу педходних резултата пролиферације лимфоцита, ми смо одлучили да испитамо утицај две концентрације 10-НДА (50μM и 500μM) на продукцију цитокина од стране РНА-активираних PBMNC. Ми смо прво мерили продукцију три главна проинфламаторна цитокина (IL-1β, IL-6 и TNF-α). Резултати су приказани на

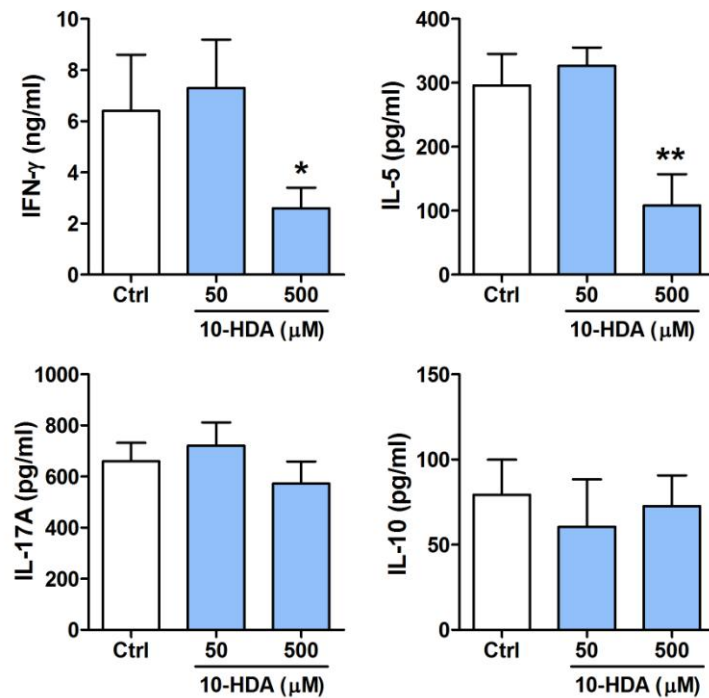
графикону 10. Може се видети да је 10-HDA у концентрацији од 500 μM значајно супримирала продукцију IL-1 β и TNF- α .



Графикон 10. Ефекат 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина од стране PBMNC. Супернатанти PBMNC култура стимулираних са РНА, у одсуству или присуству 10-HDA, су сакупљени после тродневне култивације и коришћени за одређивање концентрација IL-1 β , IL-6 и TNF- α помоћу ELISA методе. Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина \pm SD ($n = 5$). ** $p < 0.01$

Ефекат 10-HDA на цитокински Th профил

У супернатантима култура стимулираних 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 11, ниска концентрација 10-HDA не модулира продукцију ових цитокина, док већа примењена доза ове масне киселине (500 μM) инхибира продукцију IFN- γ и IL-5.

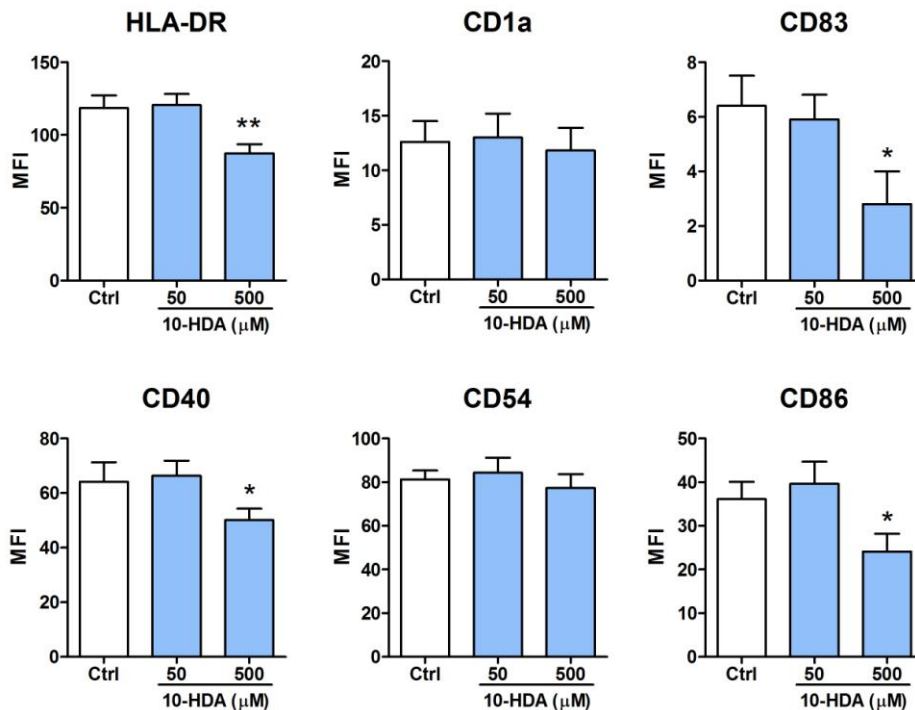


Графикон 11. Th поларизациона способност 10-HDA. Хумане PBMNC су третиране само са PHA или са PHA и различитим концентрацијама 10-HDA у трајању од 72h. Концентрације IFN- γ , IL-5, IL-17A и IL-10 су мерене из супернатаната култура користећи ELISA методу. Нивои цитокина су приказани као средња вредност \pm SD (n = 5). *p < 0.05; **p < 0.01

Ефекат 10-HDA на хумане дендритске ћелије моноцитног порекла

Ефекат 10-HDA на матурацију MoDC

Као што се може видети на графикону 12, ниска концентрација 10-HDA (50 μ M) није значајно утицала на матурацију MoDC у поређењу са контролом. Насупрот томе, већа концентрација (500 μ M) је инхибирала матурацију MoDC што је закључено преко смањене експресије HLA-DR, CD83, CD40 и CD86 молекула. Испољавање CD54 и CD1a молекула није се значајно променило код MoDC третираних са 10-HDA у односу на контролу.

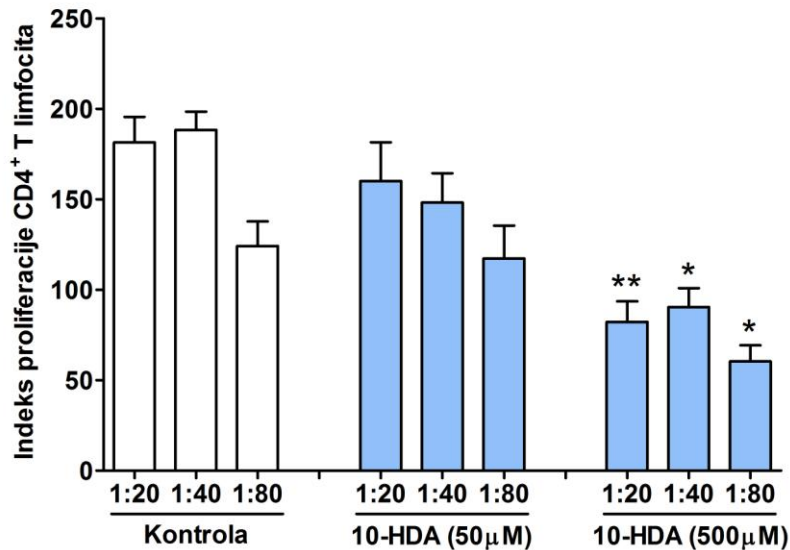


Графикон 12. Ефекат 10-HDA на фенотипске карактеристике хуманих МоDC. Незреле МоDC су 48h третиране са LPS, у одсуству или присуству 10-HDA (50μM или 500μM). Матурација је процењена цитофлуориметријски на основу мерења експресије следећих молекула: HLA-DR, CD1a, CD83, CD40, CD54 и CD86. Резултати су приказани као средње вредности интензитета флуоресценце (MFI) ± SD из три експеримента. *p < 0.05, **p < 0.01

Ефекат 10-HDA на алоstimулацијску способност МоDC

На графикону 13 се може видети да 10-HDA у концентрацији од 50μM није утицала на алоstimулацијску активност МоDC у поређењу са контролом. Међутим, 10-HDA у концентрацији од 500μM је значајно смањила способност МоDC да стимулишу пролиферацију алогених CD4⁺ Т лимфоцита у односу на контролу.

Odnos MoDC/CD4⁺ T limfociti

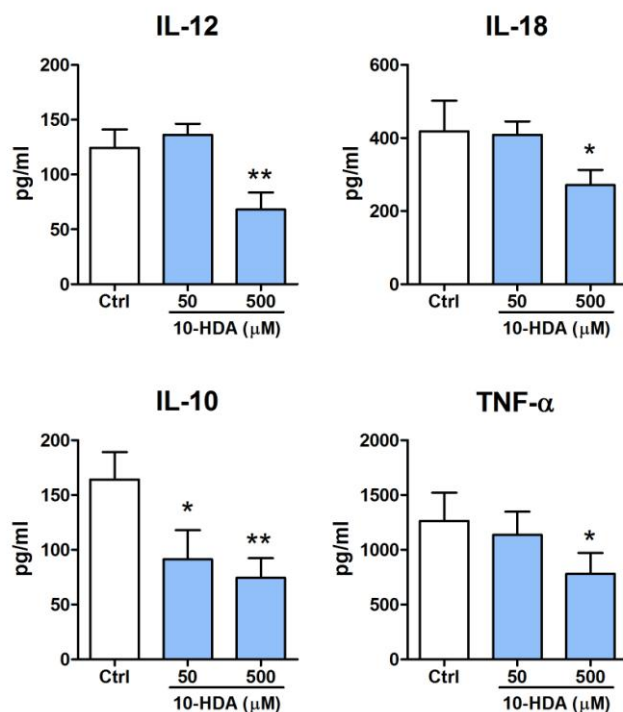


Графикон 13. Ефекат 10-HDA на алостимулаторну активност МоDC. Двострукооппадајуће концентрације МоDC су ко-култивисане са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима (1×10^5 ћелија/базену), као што је описано у секцији Материјал и методе. Пролиферација је мерена на основу количине везаног [³H]-тимидина који је ћелијама додат 18 сати пре истека петодневне култивације. Резултати су приказани као средња вредност индекса пролиферације ± SD из три експеримента. *p < 0.05, **p < 0.01

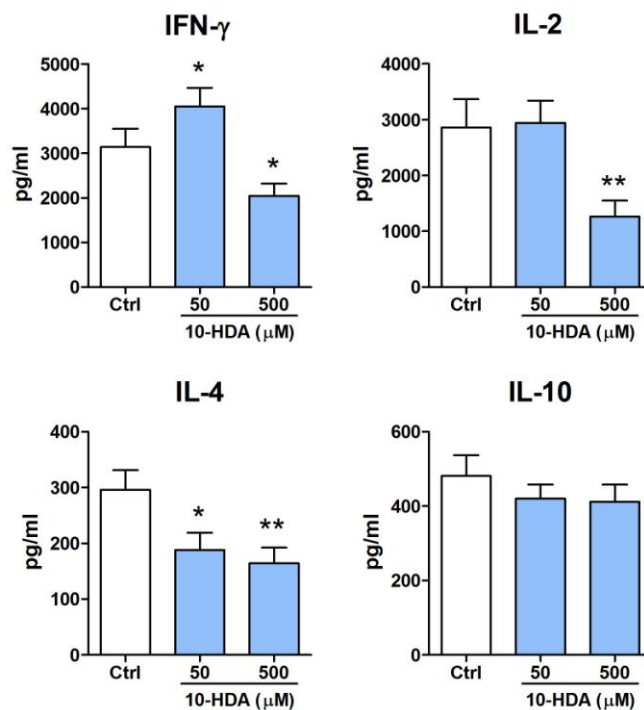
Ефекат 10-HDA на продукцију цитокина од стране МоDC и на њихову Th поларизацијску способност

Ниска концентрација 10-HDA (50 μM) није модулирала значајно продукцију IL-12, IL-18 и TNF-α од стране МоDC, али је редуковала продукцију IL-10 (графикон 14), 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. МоDC култивисане са већом концентрацијом 10-HDA (500 μM) су продуковале ниже концентрације свих испитиваних цитокина (IL-12, IL-18, IL-10, TNF-α) и слабије активирале алогене CD4⁺ Т лимфоците да продукују

IFN- γ , IL-2 и IL-4. Насупрот томе, концентрација IL-10 у ко-културама MoDC са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима се није значајно променила (графикони 14 и 15).



Графикон 14. Ефекат 10-HDA на продукцију цитокина од стране MoDC. Из супернатаната култура MoDC третираних LPS-ом, са или без присуства 10-HDA (50 μ M или 500 μ M), су одређиване концентрације IL-12, IL-18, IL-10 и TNF- α ELISA тестовима. Резултати су представљени као средње вредности концентрација испитиваних цитокина \pm SD (n=3). *p<0.05, **p <0.01



Графикон 15. Th поларизациона способност MoDC третираних са 10-HDA. MoDC које су матурирале у присуству LPS, са или без 10-HDA су ко-култивисане са алогеним CD4⁺ Т лимфоцитима. Осам сати пре истека петодневне инкубације ћелије су третиране са PMA и јономицином. Затим је из супернатаната ових ко-култура мерен ниво IFN- γ , IL-2, IL-4 и IL-10 ELISA тестом. Резултати су приказани као средње вредности концентрација цитокина \pm SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a darker blue center and a lighter blue outer ring. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large angle that frames the circles. The word "Дискусија" is centered in the lower half of the page.

Дискусија

ММ је продукт субмандибуларних и хипофарингеалних жлезда пчела радилица, којим се матица и њене ларве хране. Познато је да ММ због свог благотворног дејства заузима важно место у традиционалној медицини. Поред тога, његови многобројни фармаколошки и биолошки ефекти су последних двадесет година и научно потврђени. Наиме, у бројним радовима је показано да ММ има антиоксидативни, имуномодулаторни, хипогликемијски, хипохолестеролемијски, хипотензивни, антибиотски, неуротрофични и многе друге ефекте (Pavel и сар., 2011). С обзиром да ММ има веома комплексан састав (протеини, липиди, угљени хидрати, слободне аминокиселине, масне киселине, минерали, витамини и тд) није познато која је компонента (или више њих) одговорна за одређено својство. Досадашња истраживања су углавном била усмерена на ефекте протеинских и у значајно мањој мери липидних компоненти ММ, јер су то биолошки и фармаколошки посматрано најважније супстанце. Највећи део липида ММ чине масне киселине и то углавном у слободној форми, док око 70% укупне липидне компоненте ММ чини 10-HDA. Ова хидрокси мононезасићена масна киселина, поред тога што је најзаступљенија, је и јединствена јер је у природи пронађена само у ММ. Због тога су различите истраживачке групе претпоставиле да је 10-HDA одговорна за поједине ефекте ММ. Наиме, показано је да 10-HDA испољава различита биолошка дејства као што су: антитуморско, антибактеријско, естрогено, проколагено, антидепресивно и тд (Zheng и сар., 2012, Li и сар., 2013). Будући да је показано антиоксидативно и имуномодулаторно деловање ММ ми смо у овој студији хтели да испитамо да ли и 10-HDA испољава ова својства као саставни део ММ.

Неутрофили су ћелије урођене имуности које су једне од најважнијих у току акутног 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 екстрацелуларних замки (NEToza) (Kolaczkowska и Kubes, 2013). Оксидативни прасак, процес при коме неутрофили продукују слободне кисеоничне врсте, представља

најупечатљивији показатељ активације неутрофила. Стога смо ми у овом делу истраживању хтели да сагледамо да ли 10-HDA утиче на оксидативни прасак неутрофила активираних са PMA, opZу или fMLP, користећи методу хемилуминисценце помоћу луминола. Луминол неспецифично реагује са различитим слободним кисеоничним и азотним врстама које продукују неутрофили ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, $^{\cdot}NO$, $ONOO^-$), 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 слободних реактивних врста. Ми смо показали да 10-HDA дозно-зависно инхибира оксидацију луминола од стране неутрофила активираних са PMA, opZу или fMLP. Такође, треба нагласити да концентрације 10-HDA од 1mM и 2 mM при којима се ови ефекти јављају могу бити достигнуте у серуму при уобичајеном конзумирању MM (Sugiyama и сар., 2012a).

Литературни подаци о деловању 10-HDA на продукцију ROS су веома оскудни. Наиме, постоји само један рад у коме је показано да претретман хуманих дермалних фибробласта са 10-HDA смањује количину ROS у овим ћелијама, чија је продукција индукована ултравиолетним А зрачењем (Zheng и сар., 2012).

На месту инфламације, односно по комплетној активацији неутрофила настаје мобилизација азурофилних и специфичних гранула. Фузија специфичних гранула са плазма мембраном или са мембраном фагозома узрокује склапање комплекса NADPH оксидазе при чему отпочиње продукција реактивних кисеоничних врста (Amulic и сар., 2012). NADPH оксидаза редукује молекуларни кисеоник до супероксидног ањона који или спонтано или под утицајем супероксид дизмутаза прелази у водоник пероксид. Супероксид може такође 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 супероксидног ањона и H_2O_2 (Amulic и сар., 2012). Да би утврдили који је од ових ROS укључен у процес

инхибиције оксидативног праска помоћу 10-HDA, ми смо користили различите пробе специфичне за поједине ROS. Прво смо користили NBT, специфичну пробу за интрацелуларну детекцију супероксидног аниона. Показали смо да 10-HDA дозно-зависно инхибира редукцију NBT до формазана у неутрофилима стимулираним са PMA, opZy или fMLP. С обзиром да не постоје пробе које високо специфично детектују интрацелуларну продукцију H_2O_2 и HOCl, ми смо користили 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 са PMA и opZy, док код активације са fMLP постоји статистички значајна инхибиција и при концентрацији од 1mM.

Такође, проба са луминолом може индиректно да покаже продукцију HOCl у неутрофилима под деловањем MPO. Наиме показано је да MPO-дефицијентни 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 Mynre и сар. (2003) показавши да третирање 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 површини ћелијске мембране и активира неутрофиле преко

различитих интрацелуларних сигналних путева посредованих преко фосфатидилинозитол-специфичне фосфолипазе C, фосфатидилинозитол 3-киназе, протеин киназа активираних митогеном (MAPK) и фосфолипазе A₂ (Sato и сар., 2013). Партике зимозана представљају делове ћелијског зида гљиве *Saccharomyces cerevisiae*, због чега се често користи углавном у опсонизованом облику у проучавању имунског одговора неутрофила и моноцита на гљиве. Зимозан је познати лиганд за TLR2 (енгл. Toll-Like Receptor 2) и дектин који се налазе на површини неутрофила, а унутарћелијски сигнал се преноси углавном посредством Rac2 сигналног молекула (Makni-Maalej и сар., 2013). Будући да PMA, fMLP и opZу индукују оксидативни прасак различитим сигналним путевима, а у складу са нашим резултатима, може се закључити да 10-HDA не модулише ову функцију неутрофила делујући на специфични сигнални пут, већ путем хватања реактивних кисеоничних врста. Стога смо, имајући у виду да су главне ROS које неутрофили продукују O₂^{•-} (са последичним формирањем H₂O₂) и HOCl, испитали способност 10-HDA да реагује са овим ROS користећи системе без ћелија. Резултати које смо добили су показали да 10-HDA има способност да „хвата“ O₂^{•-} и HOCl, али нема утицаја на концентрацију H₂O₂. Литературних података о антиоксидативном ефекту 10-HDA готово да нема (осим већ споменутог рада), тако да је ово први пут да је показан директни антиоксидативни ефекат 10-HDA, што значи да и ова најзаступљенија масна киселина учествује у антиоксидативним активностима ММ, а не само фенолне компоненте као што се то до сада сматрало (Melliou и Chinou, 2005, Viuda-Martos и сар., 2008, Guo и сар., 2009).

Под нормалним условима, циркулишући неутрофили имају кратак животни век у трајању од 7-12h, *in vivo*. Сматра се да неутрофили или одлазе до слезине, јетре, па и натраг до костне сржи и тамо бивају уништени (Martin и сар., 2003, Fox и сар., 2010) или напуштају циркулацију и настају се у ткивима (Fox и сар., 2010). По обављању своје функције у ткиву, неутрофили подлежу спонтаној апоптози, која спречава неконтролисано цурење токсичног ћелијског садржаја (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*) значајно продужавају животни век неутрофила (van Zandbergen и сар., 2004). С друге стране, добро је познато да РМА, као и инфекција *Streptococcus-om pneumoniae* драстично смањују животни век неутрофила, изазивајући апоптозу и NEToзу (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 ради побољшања имунског одговора (Haslett, 1999).

Ми смо показали да 10-HDA одлаже спонтану апоптозу неутрофила. Овај резултат такође потврђује антиоксидативна својства 10-HDA с обзиром да су ROS одговорни 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 ROS 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-ацетилцистеин и десфериоксамин спречавају спонтану апоптозу неутрофила, што само потврђује улогу ROS у овом процесу. Такође, неутрофили дефицијентни у NADPH оксидази спорије подлежу апоптози (Kasahara и сар., 1997), а и инкубација неутрофила у хипоксичним условима инхибира апоптозу (Mecklenburgh и сар., 2002).

Наши резултати су показали да 10-HDA поред спонтане инхибира и апоптозу индуковану са РМА, fMLP и opZy. Сматра се да и код индуковане апоптозе главну улогу играју ROS (Simon и сар., 2000, Maianski и сар., 2004, Witko-Sarsat и сар., 2011). Сва три примењена стимулуса на различите начине и у различитим временским

интервалима стимулишу апоптозу неутрофила (Colotta и сар., 1992, Takei и сар., 1996, Kettritz и сар., 1997, Schwartz и сар., 2012) Takei и сар. (1996) су показали да РМА у првим сатима стимулације индукује смрт неутрофила која се у одређеном проценту разликује од класичне апоптозе и некрозе, а праћена је појавом екстензивне 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 са РМА. Стога је, према литературним подацима (Fadeel и сар., 1998, Freitas и сар., 2013), најбољи показатељ апоптозе неутрофила стимулираних са РМАрано испољавање фосфатидил серина. Ми смо експресију овог молекула на површини неутрофила после двочасовне инкубације са РМАдетектовали цитофлуориметријски користећи aneksin V alexa fluor 488/PI. Показали смо да 10-HDA дозно зависно инхибира експресију фосфатидил серина индуковану деловањем РМА, при чему највећа примењена концентрација смањује испољавање овог молекула за око 30%. РМА изазива апоптозу неутрофила механизмом који зависи од продукције ROS (Fadeel и сар., 1998). Наиме, показано је да антиоксиданси: пиридинтиокарбамат, N-ацетилцистеин, редуковани глутатион и диметилтиоуреја (Takei и сар., 1996, Fadeel и сар., 1998), као и специфични инхибитор NADPH оксидазе, дифенилен-јодонијум, инхибирају апоптозу неутрофила стимулираних са РМА (Fadeel и сар., 1998). Код особа које болују од хроничне грануломатозне болести где постоји урођени поремећај у активности NADPH оксидазе, РМА није у стању да индукује експресију фосфатидил серина, односно да индукује апоптозу (Kasahara и сар., 1997). Према томе, може се рећи да 10-HDA испољава свој ефекат на РМА индуковану апоптозу неутрофила путем сакупљања ROS и смањења њихове концентрације.

Ми смо, такође, мерили апоптозу неутрофила после 24h инкубације са РМА у присуству или одсуству 10-HDA, морфолошким методом помоћу светлосног

микроскопа бојењем ћелија раствором Türk-a и флуороцитометријски методом детектовања хиподиплоидног пика бојењем ћелија PI. Резултати су показали да је PMA после 24h инкубације индуковао скоро 100% апоптозу неутрофила, без обзира на присуство или одсуство 10-HDA. Ово је било очекивано јер PMA изузетно снажно делује на неутрофиле изазивајући оксидативни прасак, NETozu и апоптозу. Наиме, показано је да не постоје вијабилни неутрофили после само 6h инкубације са PMA (Takei и сар., 1996). Према томе 10-HDA током тако дуге инкубације са PMA није у стању да инхибира ефекат овог фармаколошког агенса, већ доприноси бољем преживљавању ћелија у првим сатима инкубације *in vitro*.

За разлику од PMA, fMLP није изазвао апоптозу неутрофила после 4-6h инкубације без обзира на присуство или одсуство 10-HDA. Ови резултати су у сагласности са Kettritz и сар. (1997) који су показали да fMLP изазива апоптозу неутрофила у култури која је повезана са већом продукцијом супероксидног анјона. Међутим, fMLP не изазива апоптозу неутрофила у првим сатима инкубације, као што је то случај са PMA и opZy, већ разлика у апоптози између стимулираних и нестимулисаних неутрофила почиње тек после 12h, а значајна је тек након 24h. Бржи улазак у апоптозу “остарелих“ неутрофила је објашњен већом концентрацијом супероксида, јер је показано да SOD инхибира улазак neutrofila у fMLP индуковану апоптозу (Kettritz и сар., 1997). Такође, други аутори су показали да N-ацетил цистеин који има способност сакупљања супероксидног анјона (Villagrasa и сар., 1997, Allegra и сар., 2002, Stolarek и сар., 2002), инхибира апоптозу неутрофила изазвану са fMLP (Milara и сар., 2012, Kose и Naziroglu, 2015). Према томе, може се рећи да 10-HDA инхибира апоптозу неутрофила изазвану fMLP преко сакупљања супероксидног анјона.

Закључак

На основу добијених резултата можемо закључити да 10-HDA:

- смањује степен оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви стимулираних са PMA, fMLP и opZy
- одлаже како спонтану, тако и PMA, fMLP и opZy индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви
- испољава инхибиторни ефекат на NETozu хуманих неутрофила периферне крви стимулираних са PMA
- у милимоларним концентрацијама, испољава директно антиоксидативно дејство путем способности да реагује и неутралише супероксид и HOCl
- у већој концентрацији инхибира пролиферацију хуманих PBMNC стимулираних са PMA, као и пролиферацију алогених CD4⁺ Т лимфоцита у кокултури са MoDC
- у већој концентрацији инхибира продукцију проинфламаторних цитокина, IL-1 β и TNF- α , у култури PBMNC стимулираних са PMA
- у већој концентрацији (500 μ M) инхибира матурацију MoDC стимулираних са LPS, као и продукцију IL-12, IL-18 и TNF- α од стране ових ћелија
- у нижој концентрацији (50 μ M) стимулише Th1, а инхибира Th2 имунски одговор на моделу интеракције MoDC и CD4⁺ Т лимфоцита. Међутим, у већој концентрацији супримира Th1 и Th2 имунски одговор, на истом моделу као и на моделу PMA стимулираних PBMNC

The page features a decorative graphic consisting of three overlapping blue circles of varying sizes, arranged in a vertical line. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The circles are composed of concentric layers of different shades of blue, creating a 3D effect.

Литература

Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr* 1999; 81 Suppl 1:S1-27.

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.

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.

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.

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.

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.

Bogdan, C., Rollingshoff, 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. Ca²⁺-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.
- 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.
- Bullock, R. J., Rohan, A. & Straatmans, J. A. Fatal royal jelly-induced asthma. *Med J Aust* 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.

- Çavuşoğlu, K., Yapar, K. & Yalçın, E. Royal Jelly (Honey Bee) Is a Potential Antioxidant Against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice. *J Med Food* 2009; 12:1286-1292.
- Cemek, M., Aymelek, F., Büyükokuroğlu, 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 Chem Toxicol* 2010; 48:2827-2832.
- 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.
- 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.
- 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.
- Doeing, 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.
- Erem, C., Deger, O., Ovali, E. & Barlak, Y. The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves' disease. *Endocrine* 2006; 30:175-83.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Guo, H., Kouzuma, Y. & Yonekura, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry* 2009; 113:238-245.
- 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.

- 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.
- Henry, C. J. Functional foods. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64:657-659.
- Hirsch, J. G. Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 1958; 108:925-44.
- 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.
- Kamakura, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 2011; 473:478-83.
- 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. *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61:123-32.
- 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. *Eur J Histochem* 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. *Oxid Med Cell Longev* 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. *J Dermatol* 2008; 35:222-4.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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. *Clin Exp 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. *J Allergy Clin Immunol* 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, X., Huang, C. & Xue, Y. Contribution of lipids in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly to health. *J Med Food* 2013; 16:96-102.

- 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.
- 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.
- Makni-Maalej, K., Chiandotto, M., Hurtado-Nedelec, M., Bedouhene, S., Gougerot-Pocidalò, 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.
- Mannoor, M. K., Shimabukuro, I., Tsukamoto, 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:253-5.
- 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.

- Nerlov, C. & Graf, T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 1998; 12:2403-12.
- 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.
- 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.
- Orsolíc, N. [Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardisation]. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013; 64:445-61.
- Orsolíc, N., Knezevic, A., Sver, L., Terzić, S., Hackenberger, B. K. & Basic, I. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Vet Comp Oncol* 2003; 1:216-26.
- Orsolíc, 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. *J Sci Food Agric* 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.
- 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., Mărghitaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D. S., Șapcaliu, A., Radoi, I. & Mădaș, M. N. Biological Activities of Royal Jelly-Review. *Lucrări Științifice-Zootehnie și Biotehnologii, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara* 2011; 44:108-118.
- Peacock, S., Murray, V. & Turton, C. Respiratory distress and royal jelly. *BMJ* 1995; 311:1472.
- Ramadan, M. F. & Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods* 2012; 4:39-52.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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. *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63:7-9.

Simon, H. U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5:415-8.

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.

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.

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. & Mori, H. Royal jelly acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, as a modulator of the innate immune responses. *Endocr Metab Immune Disord 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.
- 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. *J Dermatol* 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.
- 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. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:1313-24.
- Thien, F. C., Leung, R., Baldo, B. A., Weiner, J. A., Plomley, R. & Czarny, D. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:216-22.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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. *J Food Sci* 2008; 73:R117-R124.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. *J Ethnopharmacol* 2010; 128:314-21.
- 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. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012.

САДРЖАЈ

УВОД	4
ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	7
Матични млеч	8
Неутрофили.....	15
ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	20
Хипотезе.....	22
Циљеви истраживања	22
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	24
Медијуми и реагенси.....	25
Изолација и култивација ћелија	30
Процена ћелијске вијабилности	33
Фенотипска анализа ћелија	33
Процена функционалних карактеристика ћелија	35
Статистичка обрада података	37
РЕЗУЛТАТИ	38
Утицај 10-NDA на функцију хуманих неутрофила периферне крви.....	39
Антиоксидативна својства 10-NDA.....	43
Ефекат 10-NDA на функцију хуманих мононуклеара периферне крви.....	46
Ефекат 10-NDA на хумане дендритске ћелије моноцитног порекла	49
ДИСКУСИЈА	54
ЗАКЉУЧАК	62
ЛИТЕРАТУРА	64