

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Spec. dr med. Marija S. Stanković

IL-33/ST2 OSOVINA U  
EKSPERIMENTALNOM MODELU  
AKUTNOG ZAPALJENJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Spec. dr med. dr Marija S. Stanković

**IL-33/ST2 AXIS IN EXPERIMENTAL  
MODEL OF ACUTE INFLAMMATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**Mentor:**

Prof. dr Aleksandar M. Trbović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

Prof. dr Silvio De Luka, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miloš Marković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Biljana Drašković Pavlović, docent Medicinskog fakulteta  
Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

*Najmilijima*

## IL-33/ST2 osovina u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

### Sažetak

Interleukin-33 (IL-33) je jedini poznat ligand za ST2 receptor. Akutno zapaljenje je rani odgovor tkiva na oštećenje. Iako je njegova osnovna uloga zaštitna, može dovesti do dodatnog oštećenja tkiva i različitih poremećaja u organizmu. Cilj ovog istraživanja je bio razjašnjavanje uloge IL-33/ST2 osovine u patogenezi akutnog zapaljenja.

Korišćeni su genetski neizmenjeni miševi (WT) i miševi kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>), i bili su raspoređeni u grupe: 1. WT-C (kontrolna WT grupa), 2. KO-C (kontrolna ST2<sup>-/-</sup> grupa), 3. WT-I (eksperimentalna WT grupa kod koje je izazvano akutno zapaljenje) i 4. KO-I (eksperimentalna ST2<sup>-/-</sup> grupa kod koje je izazvano akutno zapaljenje). Akutno zapaljenje je izazvano davanjem intramuskularne injekcije terpentinskog ulja, a kontrolne životinje su primile injekciju fiziološkog rastvora. Nakon 12 sati, životinje su uvedene u opštu anesteziju i sakupljeni su uzorci tretiranih mišića, slezine i krvi. Uzorci mišića su korišćeni za analizu genske ekspresije ST2 receptora i citokina (IL-33, TNF-alfa, IL-6, IL-12p35, TGF-beta), za određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata (Mg, K, Fe, Cu, Mn, Se), i antioksidativnih parametara (GSH, GPx i SOD), histopatološku analizu i određivanje volumenske gustine zapaljenjskog infiltrata (Vgz), volumenske gustine nekrotičnih mišićnih ćelija (Vgn), fraktalne dimenzije (D), ugaonog drugog momenta (ASM) i teksturalne korelacije (COR). Određen je procenat eritrocita u slezini. Uzorci krvi su korišćeni za određivanje broja eritrocita, hematokrita, koncentracije hemoglobina, prosečne količine hemoglobina u eritrocitu, broja neutrofila i limfocita i određivanje aktivnosti CK i AST.

Histopatološkom analizom tretiranog tkiva je utvrđeno postojanje zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija u obe zapaljenjske grupe. Vgz, CK i AST su bili veći u prisustvu IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju. Genska ekspresija IL-33 i ST2 receptora je bila povećana na mestu akutnog zapaljenja. Genska ekspresije TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja bila je veća u odsustvu IL-33/ST2 osovine. Fe je bilo veće u WT-I u odnosu na WT-C i KO-I, a značajne razlike između KO-C i KO-I nije bilo. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu bila je značajno manja u WT-I u odnosu na WT-C, a nije bilo razlike između KO-C i KO-I. Mg je bio manji u WT-I u odnosu na WT-C i KO-I, dok nije bilo razlike između KO-C i KO-I. K se smanjuje u zapaljenju, ali je bio manji u WT-I u odnosu na KO-C. GSH je bio veći u KO-I u odnosu na KO-C i WT-I.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da IL-33/ST2 osovina doprinosi intenzivnijem zapaljenju i oštećenju tkiva u akutnom zapaljenju utičući na koncentraciju magnezijuma i gvožđa, sadržaj redukovano glutationa i gensku ekspresiju TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja. U akutnom zapaljenju se povećava genska ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora.

Ključne reči: interleukin-33, ST2, akutno zapaljenje, magnezijum, gvožđe,  
faktor transformacije rasta-beta, redukovani glutation  
Naučna oblast: Medicina

## IL-33/ST2 axis in experimental model of acute inflammation

### Abstract

Interleukin-33 (IL-33) is the only known ligand for ST2 receptor. Acute inflammation is an early response to the tissue damage. Although a primarily role of inflammation is protective, it may also cause additional tissue damage and different disorders in organism. The aim of this study was to examine the role of IL-33/ST2 axis in pathogenesis of acute inflammation.

Wild type (WT) and ST2 knockout (ST2<sup>-/-</sup>) mice were used and divided into groups: WT-C (wild-type control group), KO-C (ST2<sup>-/-</sup> control group), WT-I (wild-type inflammatory group), and KO-I (ST2<sup>-/-</sup> inflammatory group). Acute inflammation was induced by intramuscular injection of turpentine oil, while control animals received saline. After 12 hours, animals were euthanized and samples of treated muscles, spleen and blood were collected. Muscle samples were used for determination of ST2 and cytokine gene expression (IL-33, TNF-alpha, IL-6, IL-12p35, TGF-beta), macro- and microelement concentration (Mg, K, Fe, Cu, Mn, Se), antioxidative parameters (GSH, GPx and SOD), histopathological analysis and determination of volume density of inflammatory infiltrate (Vdz) and necrotic fiber (Vgn), fractal dimension (D), angular second moment (ASM), and textural correlation (COR). Erythrocytes percentage in spleen was determined. Blood samples were used for determination of erythrocyte blood count, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin, neutrophil and lymphocyte blood count, and creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) activity.

Presence of inflammatory infiltrate in the treated tissue was confirmed by histopathological analysis. Vgz, CK and AST were higher in presence of IL-33/ST2 axis in acute inflammation. IL-33 and ST2 gene expression increased in acute inflammation. TGF-beta gene expression at site of acute inflammation was higher in absence of IL-33/ST2 axis. Fe was higher in WT-I than in WT-C and KO-I, while there was no significant difference between KO-C and KO-I. Mean corpuscular hemoglobin was lower in WT-I than in WT-C, while there was no significant difference between KO-C and KO-I. Mg was lower in WT-I than in WT-C and KO-I, while there was no difference between KO-C and KO-I. K decreased in inflammation, but it was lower in WT-I than in KO-C. GSH was higher in KO-I when compared to KO-C and WT-I.

These results indicate that IL-33/ST2 axis contributes to development of more intensive inflammation and tissue damage in acute inflammation by affecting concentration of magnesium, iron concentration, reduced glutathione and TGF-beta gene expression at the site of acute inflammation. Gene expression of IL-33 and ST2 increases in acute inflammation.

Keywords: interleukin-33, ST2, acute inflammation, magnesium, iron, transforming growth factor beta, reduced glutathione

Scientific area: Medicine

## SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 Interleukin-33 i ST2 receptor.....	3
1.2 Akutno zapaljenje – vaskularne i ćelijske promene, oštećenje tkiva, citokini i ostali medijatori zapaljenja.....	12
1.3 Gvožđe i hemoglobin.....	20
1.4 Makro- i mikroelementi (magnezijum, kalijum, bakar, mangan i selen).....	23
1.5 Redukovani glutation, superoksid dizmutaza i glutation peroksidaza.....	28
<b>2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	31
<b>3 MATERIJAL I METODE</b> .....	33
3.1 Eksperimentalne životinje.....	34
3.2 Eksperimentalni protokol.....	34
3.3 Određivanje aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu.....	36
3.3.1 <i>Određivanje aktivnosti kreatin kinaze u serumu</i> .....	36
3.3.2 <i>Određivanje aktivnosti aspartat aminotransferaze u serumu</i> .....	36
3.4 Analiza genske ekspresije citokina i ST2 receptora (lančana reakcija umnožavanja polimerazom praćena u stvarnom vremenu sa reverznom transkripcijom, qRT-PCR).....	37



3.5	Određivanje hematoloških parametara krvi i slezine.....	40
3.6	Određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata u tkivu.....	41
3.7	Određivanje sadržaja redukovano <sup>g</sup> glutationa, i aktivnosti superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze u tkivu.....	42
3.7.1	<i>Određivanje sadržaja redukovano<sup>g</sup> glutationa u tkivu.....</i>	<i>42</i>
3.7.2	<i>Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u tkivu.....</i>	<i>43</i>
3.7.3	<i>Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze u tkivu.....</i>	<i>44</i>
3.8	Histopatološka analiza.....	44
3.8.1	<i>Histopatološka analiza preparata obojenih hematoksilinom i eozinom.....</i>	<i>44</i>
3.8.2	<i>Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija.....</i>	<i>45</i>
3.8.3	<i>Fraktalna i teksturalna analiza.....</i>	<i>46</i>
3.9	Statistička analiza.....	48
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>49</b>
4.1	Histopatološka analiza preparata obojenih hematoksilinom i eozinom u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	50
4.2	Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	52
4.2.1	<i>Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>52</i>

4.2.2	<i>Volumenska gustina nekrotičnih ćelija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	54
4.3	Aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	56
4.3.1	<i>Aktivnost kreatin kinaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	56
4.3.2	<i>Aktivnost aspartat aminotransferaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	58
4.4	Analiza genske ekspresije citokina i ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	60
4.4.1	<i>Analiza genske ekspresije interleukina-33 na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	60
4.4.2	<i>Analiza genske ekspresije ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	62
4.4.3	<i>Analiza genske ekspresije faktora nekroze tumora-alfa, interleukina-6 i interleukina-12p35 na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	63
4.4.4	<i>Analiza genske ekspresije faktora transformacije rasta-beta na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	65
4.5	Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja i hematološki parametri krvi i slezine u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	67
4.5.1	<i>Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	67

4.5.2	<i>Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>69</i>
4.5.3	<i>Broj eritrocita u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>71</i>
4.5.4	<i>Hematokrit u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>73</i>
4.5.5	<i>Eritrociti u slezini u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>75</i>
4.5.6	<i>Koncentracija hemoglobina u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>77</i>
4.5.7	<i>Broj neutrofila u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>79</i>
4.5.8	<i>Broj limfocita u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>81</i>
4.6	<i>Koncentracija magnezijuma, kalijuma, bakra, mangana i selena na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>83</i>
4.6.1	<i>Koncentracija magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>83</i>
4.6.2	<i>Koncentracija kalijuma na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>85</i>
4.6.3	<i>Koncentracija bakra, mangana i selena na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....</i>	<i>87</i>

4.7 Fraktalna i teksturalna analiza u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	89
4.7.1 Fraktalna dimenzija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	89
4.7.2 Ugaoni drugi momenat u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	91
4.7.3 Teksturalna korelacija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	93
4.8 Sadržaj redukovanog glutaciona, aktivnosti superoksid dizmutaze i glutacione peroksidaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	95
4.8.1 Sadržaj redukovanog glutaciona na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	95
4.8.2 Aktivnost superoksid dizmutaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	97
4.8.3 Aktivnost glutacione peroksidaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....	99
<b>5 DISKUSIJA.....</b>	<b>101</b>
<b>6 ZAKLJUČCI.....</b>	<b>118</b>
<b>7 LITERATURA.....</b>	<b>122</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>162</b>

## 1 UVOD

Komunikacija između ćelija je neophodna za funkcionisanje organizma i može se ostvariti putem pukotinastih veza koje predstavljaju kanale između ćelija kojima prolaze male molekule iz jedne ćelije u drugu (Su i Lau, 2014; Nielsen i sar., 2012), kao i putem ćelijskih adhezivnih molekula kadherina (Becker i sar., 2012), integrina (Hynes, 2001), selektina (Linhardt i Toida, 2004) i imunoglobulinskih ćelijskih adhezivnih molekula (Cavallaro i Christofori, 2004). Takođe, moguća je komunikacija i putem izlučenih molekula poput hormona, citokina i neurotransmitera, koji ostvaruju svoje dejstvo vezujući se za receptore (Mittelbrunn i Sánchez-Madrid, 2012; Ruch, 2002). Izlučeni molekuli mogu delovati autokrino, kada ćelija reaguje na molekul koji sama luči, parakrino kada deluju na ćelije u neposrednom okruženju ili endokrino, tj. mogu biti izlučene u cirkulaciju i putem krvi dospeti do udaljenih ciljnih ćelija (Singh i Harris, 2005). Citokini spadaju u izlučene molekule koje mogu delovati autokrino, parakrino i endokrino (Lázár-Molnár i sar., 2000).

U patogenezi različitih oboljenja komunikacija između ćelija predstavlja bitan proces koji se jednim delom ostvaruje i putem citokina. Citokini su proteini koji imaju ulogu medijatora u zapaljenjskim i imunskim reakcijama i omogućavaju komunikaciju između samih leukocita, kao i između leukocita i drugih ćelija (Abbas i Lichtman, 2008; Stankovic, 2010). Naziv citokini (Cohen i sar., 1974) dobili su na osnovu toga što ih produkuju ćelije i uloge u međućelijskoj komunikaciji (Rich i sar., 2008). Citokini se vezuju za receptore na ćelijama i ostvaruju svoje dejstvo. Interleukinima se nazivaju mnogi citokini koje luče leukociti i koji omogućavaju komunikaciju između samih leukocita (Abbas i sar., 2010). Naziv „interleukini“ je prvi put predložen tokom međunarodne radionice o limfokinima (Mizel i Farrar, 1979), međutim on nije u potpunosti odgovarajući, uzevši u obzir da interleukine mogu da sekretuju i ćelije koje nisu leukociti, a na koje takođe mogu da ispoljavaju svoje dejstvo (Abbas i sar., 2010). Razumevanje uloge citokina predstavlja pravi izazov zbog njihovog dejstva na različite ćelije i međusobnih preklapajućih efekata citokina

(Rich i sar., 2008). U savremenoj medicini citokini zauzimaju značajno mesto ne samo zbog razumevanja patogenetskih mehanizama, već i zbog novih mogućnosti u lečenju primenom agenasa koji moduliraju citokinsko dejstvo ili blokiraju citokinske receptore (Abbas i sar., 2010; Arakawa i sar., 2016; Kasutani i sar., 2014; Lagarde i sar., 2016; Grace i sar., 2016). Interleukin-33 je citokin koji je otkriven 2005. godine i od tada, zajedno sa svojim receptorom ST2, predstavlja predmet naučnih istraživanja da bi se razumela njihova uloga u različitim oboljenjima (Schmitz i sar., 2005).

### **1.1 Interleukin-33 i ST2 receptor**

Interleukin-33 (IL-33, IL1-F11) je jedanaesti citokin u interleukin-1 porodici citokina i otkriven je kao specifični ligand za ST2 receptor. Gen za interleukin-33 se nalazi na kraćem kraku devetog hromozoma na mestu 24.1 kod ljudi, dok se kod miševa nalazi na dužem kraku devetnaestog hromozoma na mestu C1. Strukturno je najbliži interleukinu-18 i interleukinu-1 beta, koji pripadaju istoj porodici citokina i za čiju aktivaciju je potrebno sečenje kaspazama (Schmitz i sar., 2005; Lamkanfi i Dixit, 2009a). Zbog toga se u početku smatralo da je isti način aktivacije neophodan i za ispoljavanje bioloških svojstava interleukina-33. U *in vitro* istraživanju nakon sečenja kaspazom-1 nastajao je kraći oblik interleukina-33 mase 18 kDa (Schmitz i sar., 2005). Kasnije je pokazano da zapravo sečenjem kaspazama dolazi do inaktivacije interleukina-33, i da ovaj citokin u punoj dužini ostvaruje biološku funkciju (Lüthi i sar., 2009; Talabot-Ayer i sar., 2009; Lamkanfi i Dixit, 2009b). Međutim, dejstvom drugih enzima, triptaza i himaza iz mastocita na interleukin-33 nastaju kraći oblici interleukina-33, koji mogu biti čak biološki aktivniji od interleukina-33 u punoj dužini (Lefrançais i sar., 2014). Interleukin-33 u punoj dužini kod ljudi ima masu 30 kDa i sadrži 270

aminokiselina, dok je kod miševa mase 29,9 kDa i sastoji se od 266 aminokiselina (Schmitz i sar., 2005). Interleukin-33 može biti povezan sa heterohromatinom u jedru, pa može biti i citokin i nuklearni faktor. Utvrđeno je da je interleukin-33 identičan prethodno otkrivenom nuklearnom faktoru venula sa visokim endotelom (*engl.* nuclear factor from high endothelial venules, NF-HEV) (Carriere i sar. 2007, Baekkevold i sar., 2003). Takođe, ovaj citokin se može naći i u citoplazmi (Kakkar i sar., 2012). Interleukin-33 je potencijalno jedan od alarmina, tj. može se oslobaditi pri nekrozi ćelija i „obavestiti“ imunski sistem o oštećenju u organizmu (Lamkanfi i Dixit, 2009b; Talabot-Ayer i sar., 2009; Lüthi i sar., 2009; Cayrol i Girard, 2009).

Opisano je da interleukin-33 može biti ispoljen u različitim ćelijama, endotelijalnim, epitelnim i glatkim mišićnim ćelijama, fibroblastima, dendritskim ćelijama, aktiviranim makrofagima i mastocitima (Schmitz i sar., 2005; Hueber i sar., 2011, Cevikbas i Steinhoff, 2012; Hsu i Bryce, 2012). Kada je reč o tkivima i organima, opisano je da je ispoljen u koži, skeletnim mišićima, plućima, mozgu, pankreasu i bubrezima (Schmitz i sar., 2005; Kuswanto i sar., 2016).

Gen za ST2 receptor (ili DER4, Fit-1, T1, suppression of tumorigenicity) se kod ljudi nalazi na drugom hromozomu, a kod miševa na prvom hromozomu (Tominaga, 1989; Klemenz i sar., 1989; Tominaga i sar., 1996; Cevikbas i Steinhoff, 2012). Ovaj receptor pripada porodici IL-1 receptora (Schmitz i sar., 2005; Cevikbas i Steinhoff, 2012; Ali i sar., 2007; Tominaga, 1989; Yanagisawa i sar., 1993). Kod ljudi i miševa postoji membranski i solubilni ST2 receptor, a ljudi imaju i varijantni oblik ST2V (Yanagisawa i sar., 1993; Tominaga, 1989; Schmitz i sar., 2005; Tominaga i sar., 1999; Kakkar i Lee, 2008). Membranski ST2 receptor ima građu poput receptora tip I za interleukin-1 (*engl.* type I IL-1 receptors) koji se sastoje od vanćelijskog domena koji čine tri povezana motiva slična imunoglobulinu, transmembranskog dela i



citoplazmatskog TIR (Toll/IL-1 receptor) domena (Kakkar i Lee, 2008; Yanagisawa i sar., 1993). Slično drugim članovima porodice IL-1 receptora, udružuje se sa IL-1R pomoćnim proteinom (*engl.* IL-1 receptor accessory protein, IL-1RacP) (Tominaga, 1989; Schmitz i sar., 2005; Yanagisawa i sar., 1993; Cevikbas i Steinhoff, 2012; Ali i sar., 2007). Solubilni ST2 receptor ima istu strukturu kao i vanćelijski domen membranskog ST2 receptora, osim razlike u devet aminokiselina (Gächter i sar., 1996; Yanagisawa i sar., 1993; Bergers i sar., 1994; Kakkar i Lee, 2008). Solubilni ST2 receptor vezuje interleukin-33 u cirkulaciji koji se onda ne može vezati za transmembranski ST2 receptor (Hayakawa i sar., 2007). Varijantnom obliku ST2 nedostaje treći domen sličan imunoglobulinu (Tominaga i sar., 1999). Uprkos sličnosti u građi sa članovima IL-1 porodice receptora, ST2 receptor ne vezuje interleukin-1 (Kumar i sar., 1995). Opisano je da vezivanje interleukina-33 za ST2/IL-1R pomoćni protein aktivira IRAK (*engl.* IL-1 receptor-associated kinase, kinaza pridružena IL-1 receptoru), IRAK4, MyD88 (*engl.* myeloid differentiation primary response gene 88, protein 88 primarne mijeloidne diferencijacije) i TRAF6 (*engl.* tumor necrosis factor receptor associated factor 6, faktor 6 udružen sa receptorom za faktor nekroze tumora-alfa), što dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor  $\kappa$ B), koji je bitan u zapaljenjskom odgovoru, i MAP kinaza (*engl.* mitogen-activated protein kinases, mitogenom aktivirana proteinska kinaza) i stvaranja interleukina-4, interleukina-5 i interleukina-13 (Schmitz i sar., 2005; Ali i sar., 2011). Međutim, opisano je da interleukin-33 može da inhibiše aktivaciju NF- $\kappa$ B, od strane angiotenzina II i fenilefrina (Sanada i sar., 2007), kao i nakon vezivanja interleukina-33 za p65 subjedinicu NF- $\kappa$ B (Ali i sar., 2011). S tim u vezi, moguće je da interleukin-33 ima ulogu modulatora NF- $\kappa$ B i da može da smanji zapaljenjski odgovor (Kakkar i Lee, 2008; Ali i sar., 2011). Pre otkrića interleukina-33, uočeno je da ST2 aktivira AP-1 (*engl.* activator protein 1, aktivatorni protein 1), JNK (*engl.* c-Jun N-terminal kinases, c-Jun N-terminalna kinaza), p42/p44 i p38 MAP kinazu, ali da ne aktivira NF- $\kappa$ B (Brint i sar., 2002).

ST2 receptor je najpre opisan kao receptor koji se nalazi na Th2 (*engl.* T helper type-2 lymphocytes, pomoćnički T-limfociti tipa 2) limfocitima koji bi mogao da se koristi kao njihov marker. Tada se nije znalo za ligand za ST2 receptor (Xu i sar., 1998; Löhning i sar., 1998; Schmitz i sar., 2005). Pored Th2 limfocita, ekspresija ST2 receptora je uočena i u mastocitima, makrofagima, dendritskim ćelijama, eozinofilima, neutrofilima, bazofilima, endotelijalnim ćelijama, urođenoubilačkim (*engl.* natural killer, NK) i urođenoubilačkim T (*engl.* natural killer T, NKT) ćelijama (Schmitz i sar., 2005; Smithgall i sar., 2008; Allakhverdi i sar., 2007; Ishikawa i sar., 2014).

Najpre je pokazano da interleukin-33 ima ulogu u Th2 imunskom odgovoru (Schmitz i sar., 2005). Th ćelije (*engl.* T helper lymphocytes, pomoćnički T-limfociti, CD4<sup>+</sup> ćelije) su efektorske ćelije stečenog imuniteta i prvobitno su bile podeljene u dve subpopulacije u zavisnosti od toga koje citokine proizvode, na Th1 ćelije koje luče interferon-gama i na Th2 ćelije koje sekretuju interleukin-4, interleukin-5 i interleukin-13 (Mosmann i sar., 1986; Wilson i sar., 2009). Diferencijacija Th1 i Th2 limfocita je podstaknuta citokinima koje sami stvaraju, pa tako Th2 limfociti sekretuju interleukin-4 koji dodatno stimuliše diferencijaciju Th2 ćelija, dok Th1 ćelije luče interferon-gama koji stimuliše diferencijaciju Th1 limfocita, pored interleukina-12 kao glavnog stimulatora diferencijacije Th1 ćelija (Kaiko i sar., 2008, Bradley i sar., 1996). Th2 ćelije imaju značajnu ulogu u alergijskim reakcijama i zaštiti od parazata (Wilson i sar., 2009), a Th1 limfociti u zaštiti od intracelularnih mikroorganizama, u uklanjanju kancerskih ćelija i u odgovoru na pojedine antigene, pa imaju ulogu u autoimunskim oboljenjima (Wilson i sar., 2009; Knutson i Disis, 2005). Postoji povezanost između razvoja ta dva imunska odgovora, pa tako Th2 odgovor suprimira Th1 odgovor i obrnuto (Kaiko i sar., 2008). Th17 ćelije sekretuju interleukin-17, interleukin-21, interleukin-22 i interleukin-26 (Wilson i sar., 2009). Diferencijacija naivnih Th ćelija u Th17 subpopulaciju inhibisana je interferonom-gama i interleukinom-4 (Kaiko i sar.,

2008, Harrington i sar., 2005). Th17 odgovor je bitan u zaštiti od vanćelijskih bakterijskih i gljivičnih infekcija, a ima ulogu i autoimunskim bolestima (Wilson i sar., 2009).

Interleukin-33 povećava gensku ekspresiju Th2 citokina, interleukina-4, interleukina-5 i interleukina-13, dovodi do eozinofilije i povećanja titra imunoglobulina E (IgE) i A (IgA) u serumu (Schmitz i sar., 2005). Interleukin-33 je dozno zavisno hemotaktičan molekul za Th2 limfocite, što je pokazano i u *in vitro*, i u *in vivo* uslovima, ali ne deluje na isti način na Th1 limfocite (Komai-Koma i sar., 2007). Deluje i na mastocite tako što produžava njihovo preživljavanje (Iikura i sar., 2007) i stimuliše ih da luče interleukin-8, interleukin-13 i histamin (Iikura i sar., 2007; Komai-Koma i sar., 2012). Kada interleukin-33 deluje na invarijantne NKT (*engl.* invariant natural killer T, iNKT) ćelije, povišava se nivo interleukina-4, interleukina-5, interleukina-13, faktora tumorske nekroze-alfa i interferona-gama (Smithgall i sar., 2008). Interleukin-33 može da aktivira makrofage, dendritske ćelije i neutrofile (Ishikawa i sar., 2014; Le i sar., 2012). Pokazano je da interleukin-33 doprinosi migraciji neutrofila na mesto infekcije regulišući ekspresiju receptora 2 za CXC hemokin (CXCR2) i komplementskog receptora 3 (*engl.* complement receptor 3, CR3) (Le i sar., 2012). Aktivacijom endotelne azot-monoksid sintaze i povećavajući stvaranje azot-monoksida, interleukin-33 povećava propustljivost krvnih sudova (Choi i sar., 2009), koja ima značajnu ulogu u patogenezi akutnog zapaljenja (Mitchell i Cotran, 2003).

Interleukin-33/ST2 osovina može imati prozapaljenjsku i antizapaljenjsku i protektivnu ulogu, pa stoga interleukin-33 i ST2 receptor predstavljaju predmet brojnih istraživanja da bi se razjasnila tačna uloga ove osovine u zapaljenjskim bolestima (Sakai i sar., 2012; Martin i Martin, 2016; Le i sar., 2013). S obzirom na to da su interleukin-33 i ST2 receptor od samog početka povezivani sa Th2 imunskim odgovorom, često je ispitivana uloga

IL-33/ST2 osovine u Th2 posredovanim poremećajima i uglavnom je opisano da stimuliše zapaljenjski odgovor. Interleukin-33 i ST2 receptor pospešuju astmu (Sjöberg i sar., 2015; Bartemes i Kita, 2012). Pokazano je da je ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora povećana u koži zahvaćenoj atopijskim dermatitisom, a da nakon stimulacije interleukinom-33 nuociti više eksprimiraju Th2 citokine i pojačano migriraju (Salimi i sar., 2013). U eksperimentalnom modelu alergijskog rinitisa, koji je izazvan polenom ambrozije, pokazano je da se kod miševa kojima je uklonjen gen za interleukin-33 smanjuju učestalost kijanja, produkcija Th2 citokina i nakupljanje eozinofila, bazofila i Th2 limfocita u nazalnoj mukozi (Haenuki i sar., 2012). IL-33/ST2 osovina pospešuje razvoj alergijskog konjuktivitisa putem aktivacije mastocita (Matsuda i sar., 2009).

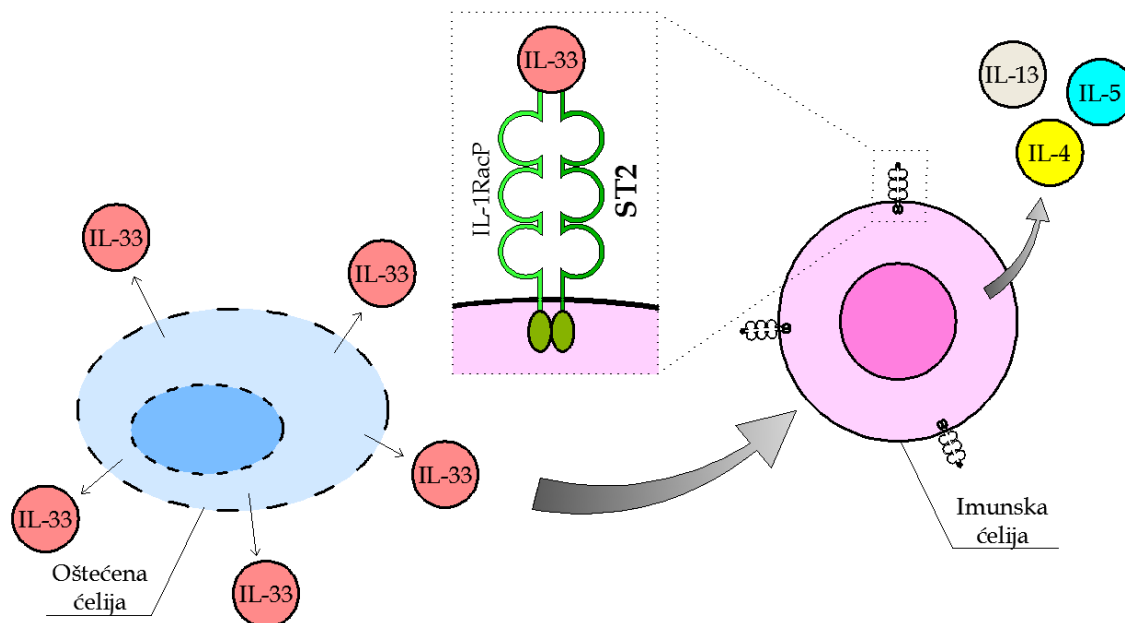
Pokazano je da interleukin-33 i ST2 receptor imaju ulogu i u poremećajima koji nisu posredovani Th2 ćelijama. Ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora se povećava u eksperimentalnom modelu reumatoidnog artritisa izazvanog metilisanim goveđim serumskim albuminom, a migracija neutrofila je veća kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na miševe kojima je uklonjen gen za ST2 receptor, tj. u odsustvu IL-33/ST2 osovine (Verri i sar., 2010). U eksperimentalnom modelu reumatoidnog artritisa izazvanom kolagenom, pokazano je da IL-33/ST2 osovina ima proinflamatorno dejstvo i da se interleukin-33 vezuje za ST2 receptor na mastocitima koji sekretuju citokine koji doprinose zapaljenjskom i Th17 odgovoru (Xu i sar., 2008). Povećana ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora je nađena i u sistemske sklerozi, a IL-33/ST2 osovina moduliše zapaljenje i fibrozu u ovom oboljenju (Manetti i sar., 2010). IL-33/ST2 osovina može doprineti većoj agresivnosti karcinoma skvamoznih ćelija jezika, a povećana ekspresija ovog citokina i receptora je povezana sa lošijom prognozom bolesti (Ishikawa i sar., 2014). IL-33/ST2 osovina pojačava prozapaljenjski odgovor makrofaga nakon stimulacije lipopolisaharidom (LPS) (Espinassous i sar., 2009). Ekspresija interleukina-33 je

povećana 24 sata nakon izazivanja zapaljenja ultravioletnim zračenjem (Byrne i sar., 2011).

Međutim, antizapaljenjska uloga IL-33/ST2 osovine je opisana u autoimunskom uveitisu. Blaža klinička slika je objašnjena smanjenim Th1 i Th17 odgovorom koji je bitan u patogenezi ovog poremećaja. To je potvrđeno smanjenom učestalošću CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ +, i CD4+IL17+IFN- $\gamma$ + ćelija, kao i povećanim procentom CD4+IL-4+, CD4+IL-5+ i CD4+IL-4+IL-5+ T ćelija nakon tretmana interleukinom-33 pri već razvijenom autoimunskom uveitisu (Barbour i sar., 2014). Protektivno dejstvo interleukin-33 i ST2 receptor ispoljavaju u aterosklerozi, jer je pokazano da inhibišu stvaranje penastih ćelija koje su bitne u nastanku aterosklerotskog plaka (McLaren i sar., 2010). IL-33/ST2 osovina ima antizapaljenjsku ulogu u zapaljenju koje je udruženo sa gojaznošću (Miller i sar., 2010). Interleukin-33 može imati zaštitnu ulogu u *Pseudomonas aeruginosa* keratitisu, tako što stimuliše lučenje antiinflamatornih citokina iz M2 makrofaga (Hazlett i sar., 2010) koji nastaju alternativnom aktivacijom makrofaga (Mosser i Edwards, 2008). Suprotno njima, klasičnom aktivacijom makrofaga nastaju M1 makrofagi koji stvaraju proinflamatorne citokine i inducibilnu azot-monoksid sintazu (Mosser i Edwards, 2008; Gordon, 2003). IL-33/ST2 osovina je doprinela razvoju blaže kliničke slike eksperimentalno izazvanog akutnog pankreatitisa (Ouziel i sar., 2012), a protektivna uloga je opisana i u infekciji gljivicom *Candida albicans* (Le i sar., 2012). Pokazano je da interleukin-33 smanjuje sistemski zapaljenjski odgovor i da IL-33/ST2 osovina doprinosi manjoj smrtnosti usled sepse i boljem uklanjanju bakterija (Alves-Filho i sar., 2010).

Interleukin-33/ST2 osovina je značajna i zbog potencijalne uloge interleukina-33 kao alarmina (Hueber i sar., 2011). Alarmini, u koje spadaju i interleukin-1 alfa i HMGB1 (*engl.* high-mobility group box-1, proteinski kompleks visoke mobilnosti 1) su endogeni molekuli koji „obaveštavaju“

imunski sistem da je došlo do oštećenja ćelije i regrutuju i aktiviraju imunske ćelije. Alarmini se oslobađaju nakon nekroze ćelije, a mogu ih i stvarati i lučiti imunske ćelije. Mogu biti hemotaktični za leukocite, uticati na sazrevanje dendritskih ćelija ili dovesti do stvaranja proinflamatornih citokina (Bianchi, 2007). Prilikom nekroze ćelija, interleukin-33 koji se nalazi u jedru oslobađa se u biološki aktivnom obliku, tj. u punoj dužini, vezuje se za ST2 receptor na imunskim ćelijama, što dovodi do oslobađanja proinflamatornih citokina i Th2 citokina, npr. interleukina-4, interleukina-5, interleukina-13 i faktora nekroze tumora-alfa (Lamkanfi i Dixit, 2009b; Talabot-Ayer i sar., 2009; Lüthi i sar., 2009; Martin i Martin, 2016; Cayrol i Girard, 2009) (shema 1). U zapaljenju kože je upravo opisano da interleukin-33 može da funkcioniše kao alarmin i da oslobođeni interleukin-33 iz oštećenih ćelija zajedno sa ST2 receptorom ima značajnu ulogu u razvoju zapaljenjskog odgovora izazvanog primenom forbolnog estera tokom dva uzastopna dana (Hueber i sar., 2011).



Shema 1. Interleukin (IL)-33 kao potencijalni alarmin koji obaveštava imunski sistem o oštećenju u organizmu i IL-33/ST2 osovina. Interleukin-33 u punoj dužini se oslobađa iz nekrotičnih ćelija i vezuje se za ST2 receptor na imunskim ćelijama koji se udružuje sa IL-1R pomoćnim proteinom (*engl.* IL-1 receptor accessory protein, IL-1RacP), što dovodi do oslobađanja Th2 citokina i proinflamatornih citokina npr. interleukina-4, interleukina-5 i interleukina-13. (modifikovano prema Lamkanfi i Dixit, 2009b i Liew i sar., 2010).

Od 2005. godine kada je otkriven interleukin-33 (Schmitz i sar., 2005), razumevanje IL-33/ST2 osovine u različitim poremećajima i zapaljenjskim bolestima predstavlja pravi izazov. Tačna uloga IL-33/ST2 osovine u patogenezi akutnog zapaljenja još uvek je nedovoljno razjašnjena, i stoga predstavlja predmet istraživanja ove doktorske teze.

## 1.2 Akutno zapaljenje - vaskularne i ćelijske promene, oštećenje tkiva, citokini i ostali medijatori zapaljenja

Zapaljenje je zaštitni odgovor na oštećenje ćelije i njegova glavna uloga je da ukloni uzrok oštećenja i oštećene ćelije. Može se podeliti na dve glavne vrste: akutno zapaljenje koje traje od nekoliko minuta do nekoliko dana, i hronično zapaljenje koje traje danima, mesecima ili godinama (Mitchell i Cotran, 2003). Akutno zapaljenje se definiše kao skoro trenutna reakcija tkiva i njegovih krvnih sudova na oštećenje, sa ciljem da se ukloni uzročnik oštećenja, izmenjene ćelije, mikroorganizmi i antigeni, i ograniči obim oštećenja tkiva. Iako je osnovna uloga akutnog zapaljenja zaštitna, zapaljenje može dovesti do dodatnog oštećenja tkiva i ćelija, i posledično do različitih poremećaja u organizmu (Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014).

Zapaljenje je opisano prvi put pre više od 2.000 godina, ali zbog značaja koje ima i njegove složenosti, i danas predstavlja predmet velikog broja istraživanja. U prvom veku nove ere, opisane su promene kao odgovor na oštećenje koje danas nazivamo kardinalnim znacima zapaljenja: crvenilo (lat. *rubor*), lokalno povišenje temperature (lat. *calor*), bol (lat. *dolor*) i otok (lat. *tumor*), a kasnije je dodat i peti kardinalni znak zapaljenja - gubitak funkcije (lat. *functio laesa*) (Basil i Levy, 2016; Nathan, 2002; Coggins i Rosenzweig, 2012; Grossman i Porth, 2014). Akutno zapaljenje ima dve glavne promene: vaskularne i ćelijske (Mitchell i Cotran, 2003).

Vaskularne promene započinju kratkotrajnom vazokonstrikcijom (nekoliko sekundi), nakon koje sledi vazodilatacija. Usled vazodilatacije, povećava se kapilarni protok krvi, što doprinosi razvoju dva prethodno opisana kardinalna znaka zapaljenja, crvenila (*rubor-a*) i povišenja lokalne temperature (*calor-a*) (Menkin, 1960; Sprague i Khalil, 2009; Pober i Sessa, 2014; Markiewski i Lambris, 2007; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014). Takođe,



povećava se intravaskularni hidrostatski pritisak i dolazi do transudacije, odnosno izlaska tečnosti sa niskim sadržajem proteina iz krvnih sudova (Menkin, 1936; McMaster i Hudack, 1932; Winter i sar., 2009; Kinasevitz, 1997; Starling, 1896; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014). Potom se povećava vaskularna propustljivost i dolazi do eksudacije, tj. izlaska tečnosti sa visokim sadržajem proteina i ćelijama iz krvnih sudova, što dovodi do smanjenja onkotskog pritiska krvi i povećanja onkotskog pritiska intersticijske tečnosti (Menkin, 1936; Sprague i Khalil, 2009; Di Lorenzo i sar., 2009; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014; Paramothayan i Barron, 2002). Ova razlika u onkotskim pritiscima uzrokuje dodatni izlazak tečnosti iz krvnih sudova u intersticijski prostor. Nakupljanjem tečnosti u tkivu razblažuje se koncentracija uzročnika oštećenja i nastaju kardinalni znaci zapaljenja: otok (lat. *tumor*), bol (lat. *dolor*) i gubitak funkcije (lat. *functio laesa*). U krvnim sudovima se usled izlaska tečnosti povećava viskoznost krvi, što usporava krvni tok i uzrokuje prelazak leukocita iz središnjeg dela krvnog toka, tj. bliže endotelnim ćelijama krvnih sudova, što potom olakšava migraciju leukocita na mesto oštećenja. Osim toga, usporeni tok krvi može dovesti do stvaranja ugruška sa ciljem da se, na primer, spreči širenje infektivnog agensa (Williams i Maier, 1992; Markiewski i Lambris, 2007; Menkin, 1931; Menkin, 1936; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014).

Ćelijske promene u akutnom zapaljenju se odigravaju u nekoliko faza: marginacija i kotrljanje leukocita, adhezija i transmigracija između endotelnih ćelija, kretanje leukocita u intersticijskom prostoru u zavisnosti od hemotaktične supstance (hemotaksa), i aktivacija leukocita i fagocitoza (Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014; Markiewski i Lambris, 2007).

Marginacija je prelazak leukocita iz centralnog dela krvnog toka u kom se fiziološki nalaze, bliže endotelnim ćelijama. Usled eksprimiranja selektina na leukocitima i endotelnim ćelijama pod uticajem posrednika zapaljenja, moguće

je kotrljanje, odnosno vezivanje leukocita za endotelne ćelije vezama koje se raskidaju, što je praćeno stvaranjem novih veza koje se ponovo raskidaju i čitav taj proces dovodi do usporavanja leukocita. E-selektini (ili CD62E) se nalaze na endotelnim ćelijama, P-selektini (ili CD62P) na endotelnim ćelijama i trombocitima, i L-selektini (CD62L) na većini leukocita (Ley i sar., 2007; Muller, 2013; von Andrian i sar., 1991; Mitchell i Cotran, 2003). Čvrsto vezivanje leukocita za endotelne ćelije (adhezija) je omogućeno zahvaljujući vezivanju integrina na leukocitima sa integrin ligandima na endotelnim ćelijama ekspimiranim pod dejstvom prozapaljenjskih citokina. Integrin VLA-4 (*engl.* very late antigen-4, veoma kasni antigen-4) se vezuje za integrin ligand VCAM-1 (*engl.* vascular cell adhesion molecule-1, adhezivni molekul 1 vaskularnih ćelija) na endotelnim ćelijama, a integrini LFA-1 (*engl.* lymphocyte function-associated antigen-1, antigen 1 povezan sa limfocitnom funkcijom, CD11a/CD18) i Mac-1 (*engl.* macrophage-1 antigen, makrofag-1 antigen, CD11b/CD18) za ICAM-1 (*engl.* intercellular adhesion molecule-1, interćelijski adhezivni molekul-1) na endotelnim ćelijama. Nakon čvrstog vezivanja za endotelne ćelije, leukociti prelaze u intersticijalni prostor procesom transmigracije, odnosno dijapedeze. Leukociti se provlače između endotelnih ćelija na nivou intercelularnih spojeva, a zatim prolaze bazalnu membranu razgrađujući je kolagenazama. Opisano je da leukociti mogu da transmigriraju i intracelularno. U procesu transmigracije bitnu ulogu može imati PECAM-1 (*engl.* platelet endothelial cell adhesion molecule 1, adhezivni molekul 1 trombocita i endotelnih ćelija, CD31) (Mitchell i Cotran, 2003; Muller, 2011; Muller, 2013; Ley i sar., 2007; Mamdouh i sar., 2003). U akutnom zapaljenju najčešće prvo migriraju neutrofili, a kasnije mononukleari (Menkin, 1934; Durham, 1897; Mitchell i Cotran, 2003). U procesu hemotakse leukociti migriraju ka mestu oštećenja u zavisnosti od gradijenta hemotaktičke supstance. Hemotaktičko dejstvo mogu da ispolje neke komponente komplementa (C3a, C5a), leukotrijeni (pre svega leukotrijen B4), citokini (npr. interleukin-8), pojedini produkti bakterija i bakterijski i ćelijski ostaci (Mitchell i

Cotran, 2003; Schiffmann i sar., 1975; Grossman i Porth, 2014; Wiliams i Maier, 1992; Baggiolini i sar., 1989; Ward i sar., 1968; Ford-Hutchinson i sar., 1980). Nakon hemotakse, sledi aktivacija leukocita i fagocitoza (Durham, 1897; Opie, 1906; Mitchell i Cotran, 2003). Fagocitoza obuhvata nekoliko koraka: prepoznavanje i vezivanje, ingestiju i intraćelijsko ubijanje (Opie, 1922; Grossman i Porth, 2014). Leukociti prepoznaju čestice koje treba fagocitovati zahvaljujući receptorima koje imaju (Abbas i sar., 2010). Oponizacija je oblaganje ćelije, dela ćelije, odnosno antigena (Grossman i Porth, 2014) opsoninima kako bi ingestija leukocitima bila lakša. Najznačajniji opsonini su imunoglobulin G (IgG) i C3b komponenta komplemента (Wiliams i Maier, 1992; Ehlenberger i Nussenzweig, 1977; Mantovani i sar., 1972; Mitchell i Cotran, 2003). Oponini na čestici koja treba da bude ingestirana se vezuju odgovarajućim receptorima na leukocitima [Fc receptor za IgG, a receptori za komplement tip 1, 2, 3 i 4 (*engl.* complement receptor 1, 2, 3 and 4; CR1, 2, 3 i 4) za C3b] (Sobota i sar., 2005; Scott, 1979; Messner i Jelinek, 1970; Bose i sar., 2013; Dunkelberger i Song, 2010; Mitchell i Cotran, 2003). Prilikom ingestije leukocit pseudopodijama okružuje česticu i formira fagocitnu vakuolu (fagozom) (Metchnikoff, 1905; Mitchell i Cotran, 2003; Aderem, 2003; Stuart i Ezekowitz, 2005). U digestiji se fagozom spaja sa intraćelijskim lizozomom i nastaje fagolizozom u koji se oslobađaju enzimi i slobodni radikali (Aderem, 2003; Stuart i Ezekowitz, 2005; Grossman i Porth, 2014). Digestija predstavlja fazu u kojoj zapravo dolazi do razgradnje i uništavanja fagocitovane čestice, ćelije, dela ćelije ili antigena (Jutras i Desjardins, 2005; Mitchell i Cotran, 2003). U digestiji značajno mesto zauzima oksidativni stres i stvaranje slobodnih radikala (Baldridge i Gerard, 1932; Mitchell i Cotran, 2003). Za nastanak slobodnih radikala u aktiviranim leukocitima, bitan je enzim fagocitna oksidaza (Abbas i sar., 2010). Superoksidni i hidroksilni radikal mogu izazvati npr. smrt fagocitovanog mikroorganizma, dok vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to samostalno ne može da uradi. Međutim, u prisustvu mijeloperoksidaze, enzima koji se nalazi u granulama neutrofila, i hlorida, iz vodonik-peroksida u fagolizozomu može

da nastane hipohlorni radikal koji ima ulogu u oksidativnom stresu (Mitchell i Cotran, 2003; Clark i Klebanoff, 1977). U leukocitima azot-monoksid nastaje u reakciji nastajanja citrulina iz arginina pod katalitičkim dejstvom enzima inducibilne azot-monoksid sintaze (*engl.* inducible nitric oxide synthase, iNOS) (Grossman i Porth, 2014; Hevel i sar., 1991). Unutar fagolizozoma stvoreni azot-monoksid može da reaguje sa vodonik-peroksidom ili superoksidom, pri čemu se stvaraju visokoreaktivni peroksinitrit radikali koji su snažni oksidanti (Abbas i sar., 2010). Pored kiseonik zavisne forme digestije, postoji i kiseonik nezavisna, odnosno enzimaska razgradnja (Mitchell i Cotran, 2003), a kao značajni enzimi navode se elastaze i katepsin G (Opie, 1922; Wiliams i Maier, 1992; Abbas i sar., 2010). Dodatno ograničeno tkivno oštećenje skoro uvek prati zapaljenjski odgovor. U toku digestije lizozomalni enzimi mogu da se oslobode u vanćelijski prostor, a ne samo unutar fagolizozoma, i da dovedu do oštećenja ćelija i razgradnje ekstracelularnog matriksa (potke), dok slobodni radikali mogu da izazovu oštećenje endotelijalnih ćelija i dodatno tkivno oštećenje. Intenzivna ili dugotrajna aktivacija leukocita, i oštećenja ćelija i tkiva koja nastaju usled nje, nalaze se u osnovi različitih bolesti i poremećaja u organizmu (Wiliams i Maier, 1992; Mitchell i Cotran, 2003).

Opisane vaskularne i ćelijske promene u akutnom zapaljenju su pod uticajem medijatora zapaljenja (Markiewski i Lambris, 2007; Mitchell i Cotran, 2003). Od vazoaktivnih amina svojom ulogom se ističu histamin i serotonin koji spadaju u preformirane medijatore, odnosno već se nalaze u ćelijama. Kada dođe do oštećenja, oslobađaju se iz ćelija i mogu da učestvuju u zapaljenjskom odgovoru. Histamin se pre svega nalazi u mastocitima, ali se može naći i u bazofilima i trombocitima (Riley i West, 1952; Parsons i Ganellin, 2006; Mitchell i Cotran, 2003). Izaziva vazodilataciju i povećanu propustljivost zidova krvnih sudova delujući na kontrakciju endotelnih ćelija (Di Lorenzo i sar., 2009; Parsons i Ganellin, 2006; Mitchell i Cotran, 2003). Serotonin se nalazi u trombocitima i ostvaruje slična vazoaktivna dejstva kao i histamin (Mitchell i

Cotran, 2003). Faktor aktivacije trombocita (*engl.* platelet-activating factor, PAF) uzrokuje agregaciju trombocita, aktivira neutrofile i hemotaktičan je molekul za eozinofile (Grossman i Porth, 2014). Tri značajna sistema u akutnom zapaljenju su međusobno povezana: kininski sistem, sistem koagulacije i sistem komplementa. Kinini izazivaju vazodilataciju, povećanu vaskularnu propustljivost, kontrakciju glatkih mišića i učestvuju u nastanku bola (Williams i Maier, 1992; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014). Aktivirani faktor koagulacije Xa povećava propustljivost krvnih sudova i izlazak leukocita, dok trombin koji nastaje u kaskadi koagulacije pospešuje vezivanje leukocita za endotelne ćelije (Mitchell i Cotran, 2003). C3b komponenta komplementa je već opisana kao jedan od opsonina, dok C3a i C5a komponente komplementa imaju vazodilatatorno dejstvo, hemotaktične su supstance i stimulišu stvaranje leukotrijena (Williams i Maier, 1992; Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014). Aktivacijom sistema komplementa nastaje kompleks koji oštećuje ćeliju (*engl.* membrane attack complex, MAC), stvara se pora u membrani ćelije i dolazi do njene osmotske lize (Abbas i sar., 2010). Pod dejstvom fosfolipaze iz membranskih fosfolipida nastaje arahidonska kiselina. Ona predstavlja supstrat za enzime ciklooksigenazu i lipooksigenazu, pri čemu nastaju različiti krajnji produkti, leukotrijeni, prostaglandini i lipoksini koji značajno regulišu tok zapaljenja. Citokini spadaju u novoformirane medijatore, odnosno u medijatore koji se sintetišu u toku samog zapaljenjskog odgovora. Zbog značaja citokina i molekula koji utiču na njih, mogu se primeniti u terapiji da bi inhibisali ili stimulisali zapaljenje i imunski odgovor (Abbas i sar., 2010; Mitchell i Cotran, 2003). Citokine urođene i stečene imunosti uglavnom stvaraju različite ćelijske populacije, pri čemu i deluju na različite ćelije, mada može doći do izvesnog preklapanja njihovih efekata (Abbas i sar., 2010). Faktor nekroze tumora-alfa (*engl.* tumor necrosis factor alpha, TNF-alfa), interleukin-6 (IL-6) i interleukin-12 (IL-12) su citokini koji imaju značajnu ulogu u odgovoru urođene imunosti (Abbas i sar., 2010; Trinchieri, 1995). Faktor nekroze tumora je otkriven kao supstanca koja je toksična za maligne ćelije i koja izaziva nekrozu tumora, po

čemu je ovaj citokin i dobio naziv (Carswell i sar., 1975). Faktor nekroze tumora-alfa luče monociti, makrofagi, neutrofili, NK ćelije, mastociti i antigenom stimulisane T-ćelije (Abbas i sar., 2010; de Kozak i Verwaerde, 2002). U urođenoj imunosti ovaj citokin podstiče migraciju leukocita iz krvnih sudova u tkivo, odnosno indukuje ekspresiju adhezivnih molekula u endotelnim ćelijama i podstiče sekreciju hemokina i aktivaciju leukocita (Abbas i sar., 2010). Ukoliko TNF-alfa dospe u cirkulaciju, može da izazove sistemske efekte, npr. da deluje indirektno na termoregulatorni centar u hipotalamusu i učestvuje u povećanju telesne temperature, pa se zbog toga naziva endogenim pirogenom, ili da deluje na nivou jetre i utiče na stvaranje proteina akutne faze. TNF izaziva intravaskularnu trombozu povećavanjem tkivnog faktora koji je bitan u kaskadi koagulacije (Abbas i sar., 2010; Van Snick, 1990). Interleukin-6 je prvobitno otkriven kao citokin koji stimuliše sazrevanje B-limfocita u plazma ćelije koje stvaraju antitela (Hirano i sar., 1986). Interleukin-6 je citokin koga luče makrofagi, vaskularne endotelne ćelije, fibroblasti i neke aktivirane T-ćelije. Ovaj citokin stimuliše stvaranje neutrofila i proteina akutne faze (Van Snick, 1990; Abbas i sar., 2010; Castell i sar., 1989). Takođe, svrstava se u endogene pirogene (Helle i sar., 1988). Interleukin-12 su otkrile dve grupe naučnika približno u isto vreme (Kobayashi i sar., 1989; Stern i sar., 1990). Interleukin-12 je citokin koji se sastoji od podjedinice p35 (35 kDa) i podjedinice p40 (40 kDa) koju sadrži i interleukin-23. Interleukin-12 pretežno produkuju makrofagi i dendritske ćelije koje su značajne za pokretanje stečenog imunskog odgovora. Uloga ovog citokina u urođenoj imunosti se ogleda u pojačavanju citotoksičnosti NK ćelija i stimulaciji NK ćelija da produkuju interferon-gama koji aktivira makrofage. Interleukin-12 je važan i u stečenoj imunosti, jer utiče na diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u Th1 ćelije i pospešuje citotoksičnost CD8<sup>+</sup>T-limfocita (Abbas AK 2010). Faktor transformacije raste (*engl.* transforming growth factor beta, TGF) je otkriven krajem sedamdesetih godina dvadesetog veka (de Larco i Todaro, 1978; Roberts i sar., 1980). Faktor transformacije rasta-beta je antiinflamatorni citokin sa imunosupresivnim

svojstvima (de Kozak i Verwaerde, 2002). Stvaraju ga makrofagi, antigenom stimulirane T-ćelije i mnoge druge ćelije. Faktor transformacije rasta-beta inhibira aktivaciju makrofaga i limfocita, deluje na neutrofile i endotelijalne ćelije da bi neutralisao dejstva proinflamatornih citokina i inhibira imunski i zapaljenjski odgovor. Takođe, ima ulogu u obnavljanju tkiva nakon imunskog i inflamatornog odgovora (Abbas i sar., 2010). Slobodni radikali ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$  i toksični derivati NO) takođe posreduju u zapaljenju, tako što pri manjim koncentracijama stimulišu ekspresiju adhezivnih molekula, dok pri većim koncentracijama dovode do oštećenja različitih ćelija i tkiva, oštećenja endotela, povećanja vaskularne propustljivosti, aktivacije proteaza i razgradnje ekstracelularnog matriksa. U lizozomima leukocita se nalaze kisele proteaze koje deluju pri niskom pH u fagolizozomima, dok neutralne proteaze razgrađuju elastin, kolagen, bazalnu membranu i doprinose oštećenju tkiva. Osim toga, ovi enzimi doprinose stvaranju komponenti komplementa C3a i C5a i peptida sličnih bradikininu. Oslobođanje medijatora zapaljenja u cirkulaciju može prouzrokovati sistemska dejstva poput promena koncentracija proteina (tzv. proteini akutne faze, npr. hepcidin, feritin, C-reaktivni protein), broja leukocita, brzine sedimentacije eritrocita i visine telesne temperature. Ovi sistemski efekti čine reakciju akutne faze. Ishod akutnog zapaljenja može biti obnavljanje tkiva kada je oštećenje tkiva bilo minimalno i kada je moguća zamena ireverzibilno oštećenih ćelija. Međutim, ukoliko to nije moguće, stvara se fibrozno tkivo, odnosno dolazi do stvaranja ožiljka, a moguće je i da akutno zapaljenje dobije hroničan tok i pređe u hronično zapaljenje (Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014; Medzhitov, 2008).

Do velikog broja današnjih saznanja o akutnom zapaljenju došlo se zahvaljujući primeni eksperimentalnih modela akutnog zapaljenja. Eksperimentalni modeli akutnog zapaljenja se mogu izazvati kod različitih eksperimentalnih životinja, npr. miševa (Ruiz-Cabello i sar., 2002), pacova (Sultan i sar., 2012), kunića (McLoon i Wirtschafter, 1997), mačaka (Schaible i

sar., 1987) i majmuna (Seehase i sar., 2012). Primena eksperimentalnih životinja kojima je uklonjen gen za pojedine proteine omogućava bolje razumevanje patogeneze akutnog zapaljenja (Michaud i sar., 2006; Di Lorenzo i sar., 2009). Miševi su eksperimentalne životinje koje su često korišćene u istraživanjima u kojima se ispituju akutno zapaljenje ili IL-33/ST2 osovina. Dodatno, korišćenjem eksperimentalnih miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor, značajno je omogućeno istraživanje IL-33/ST2 osovine (Rostan i sar., 2013; Lima i sar., 2015; Liu i sar., 2015; Sedhom i sar., 2013). Shodno tome, u ovoj doktorskoj tezi je korišćen eksperimentalni model akutnog zapaljenja izazvan kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor, da bi se razjasnila uloga IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2015, Stankovic i sar., 2016a).

### 1.3 Gvožđe i hemoglobin

Gvožđe (Fe) je esencijalan mikroelement koji je u organizmu značajan u procesu eritropoeze, procesu stvaranja hemoglobina i prenošenja kiseonika eritrocitima, oksidativnom metabolizmu i imunskom odgovoru. Međutim, u stanjima kada ćelija sadrži više gvožđa, usled formiranja slobodnih kiseoničnih radikala, može doći do njenog oštećenja (Muñoz i sar., 2011).

Gvožđe je deo hemoproteina, pre svega hemoglobina, a zatim mioglobina i citohroma. Kod muškarca teškog 70 kilograma 2,5 g se nalazi u hemoglobinu, 1 g je deponovan u sklopu feritina i hemosiderina, 300 mg se nalazi u mioglobinu i različitim enzimima i 3–4 mg u transferinu (Murray i sar., 2003). S tim u vezi, najviše gvožđa se može naći u eritrocitima, a zatim u mišićima, jetri, kostnoj srži i slezini (Crichton i sar., 2001). Dnevno se apsorbuje i gubi iz organizma po 1–2 mg gvožđa, a preraspodela gvožđa unutar organizma



je ključna za obezbeđivanje gvožđa za hematopoezu, što je oko 20–30 mg gvožđa dnevno (Muñoz i sar., 2011).

Apsorpcija gvožđa se pretežno odvija u proksimalnom duodenumu, a mehanizam je različit u zavisnosti od toga da li je u pitanju gvožđe koje je deo hema (10% gvožđa koje se unosi hranom), ili gvožđe koje nije u sklopu hema (90% gvožđa koje se unosi hranom). Pod dejstvom ferireduktaze koja se nalazi na površini enterocita, trovalentni oblik gvožđa  $Fe^{3+}$  (feri) koji se nalazi u hrani, a nije u obliku hema, prelazi u dvovalentni oblik  $Fe^{2+}$  (fero), čemu pomaže i vitamin C.  $Fe^{2+}$  ulazi u ćeliju uz pomoć transportera dvovalentnih metala tip 1 (*engl.* divalent metal transporter 1, DMT1), a hem uz pomoć hem transportera, zatim se  $Fe^{2+}$  oslobađa iz hema hem-oksidadom, i dalji put gvožđa koje je deo hema i koje nije deo hema je zajednički. Jedan deo  $Fe^{2+}$  se transportuje iz enterocita u krv uz pomoć feroportina 1, prelazi u  $Fe^{3+}$  i vezuje se za transferin, dok drugi deo  $Fe^{2+}$  može da ostane u enterocitu, prelazi u  $Fe^{3+}$  i ostaje deponovan u sklopu feritina. Kada se feritin u ćelijama zasiti gvožđem, u njih ne može da uđe dodatna količina gvožđa, a s druge strane, kada se zasiti transferin u krvi, gvožđe iz enterocita ne prelazi u krv i gubi se odlublivanjem ovih ćelija gastrointestinalnog trakta. Otpilike samo 10% gvožđa uneto hranom će biti i apsorbovano (Murray i sar., 2003). U toku dana se razgradi oko 200 biliona eritrocita. Makrofagi fagocituju stare eritrocite, razgrađuje se hemoglobin na hem i globin, pri čemu se iz hema oslobađa  $Fe^{2+}$ . Na taj način se iz eritrocita oslobađa oko 25 mg gvožđa koje se uglavnom vezuje za transferin i može da se koristi za novu eritropoezu. Izlazak gvožđa iz makrofaga da bi se vezalo za transferin, ostvaruje se preko feroportina 1, za koji je već rečeno da se nalazi i na enterocitima (Muñoz i sar., 2011).

Transferin je glikoprotein molekulske mase 76 kDa, koji transportuje gvožđe putem krvi do onih tkiva kojima je potrebno. Transferin sa gvožđem se vezuje za transferinski receptor koji se nalazi na različitim ćelijama. Ovaj

kompleks se unosi endocitozom u ćeliju, zatim se  $\text{Fe}^{3+}$  odvaja od transferina, prelazi u  $\text{Fe}^{2+}$  pod dejstvom ferireduktaze i transportuje se u citoplazmu ćelije preko DMT1. Transferinski receptor i transferin bez gvožđa se vraćaju do membrane, a potom se transferin odvaja i ponovo dospeva u cirkulaciju gde služi za vezivanje novog gvožđa i njegov transport (Murray i sar., 2003). Transferin spada u proteine čija se sinteza smanjuje u zapaljenju (Jurado, 1997). Feritin je protein koji služi za deponovanje gvožđa, koje se zatim može koristiti kada se javi potreba za gvožđem u organizmu. U krvi se uglavnom nalazi malo feritina. Međutim, kada se u organizmu nalazi veća količina gvožđa, dolazi do porasta i koncentracija feritina u krvi i organima, i to pre svega u jetri i slezini. Feritin spada u proteine koji se povećavaju u zapaljenju (Jurado, 1997; Murray i sar., 2003). U sklopu hemosiderina se obično nalaze male količine gvožđa, i to pretežno u makrofagima, međutim u stanjima kada je gvožđe u višku, koncentracija hemosiderina raste. Hepcidin je protein koji se stvara u jetri i dovodi do razgradnje feroportina 1 koji se nalazi na eritrocitima i makrofagima (Ramey i sar., 2010; Muñoz i sar., 2011). Sintaza hepcidina raste u zapaljenju i tada je hepcidin jedan od ključnih proteina u metabolizmu gvožđa (Camaschella, 2013).

U akutnom zapaljenju dolazi do poremećaja homeostaze gvožđa. Uloga gvožđa u zapaljenju je bitna zbog njegovog učešća u oksidativnom stresu koji dovodi do oštećenja ćelija i tkiva (Lagan i sar., 2008). U Fentonovoj reakciji  $\text{Fe}^{2+}$  se spaja sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pri čemu nastaju  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{OH}^-$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Takođe, gvožđe je katalizator Haber-Weiss reakcije u kojoj iz  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastaju  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{OH}^-$  i  $\text{O}_2$ . Ove reakcije predstavljaju neke od mehanizama oštećenja ćelija u stanjima kada se gvožđe nalazi u višku u organizmu (Murray i sar., 2009). U akutnom zapaljenju usled promene citokinskog profila i izmena u stvaranju proteina koji utiču na metabolizam gvožđa, a koji su prethodno opisani, npr. hepcidin, feritin i transferin, snižava se koncentracija gvožđa u krvi, a povećava se sadržaj gvožđa u tkivu (Sukumaran i sar., 2012; Lagan i sar., 2008; Malik i sar., 2011; Darshan i

sar., 2010). Takođe, inflamatorne ćelije koje migriraju u oštećeno i upaljeno tkivo doprinose povećanoj koncentraciji gvožđa na mestu zapaljenja (Andersen i sar., 2014; Van Snick i sar., 1974). U zapaljenju se smanjuje i apsorpcija gvožđa iz gastrointestinalnog trakta, dok makrofagi, koji fagocituju ostarele eritrocite, smanjeno oslobađaju gvožđe (Roy, 2010). Sve ove promene dovode do smanjene raspoloživosti gvožđa za eritropoezu i sintezu hemoglobina u zapaljenju (Nemeth i sar., 2004). Zbog povezanosti akutnog zapaljenja i preraspodele gvožđa u organizmu, jedan od ciljeva doktorske teze je bio ispitivanje potencijalne uloge IL-33/ST2 osovine u ovoj preraspodeli.

#### **1.4 Makro- i mikroelementi (magnezijum, kalijum, bakar, mangan i selen)**

Iako minerali čine samo 4% telesne težine čoveka, imaju brojne uloge u organizmu - gradivnu, kofaktori su enzima, učestvuju u koagulaciji krvi, neurotransmisiji, itd. Na osnovu količine u organizmu, minerali se dele na makromineralne (makroelemente) i mikromineralne (mikroelemente, elemente u tragovima). Naziv „elementi u tragovima“ potiče od činjenice da ranijim metodama nije bilo lako tačno odrediti koncentraciju ovih elemenata. Sadržaj makroelemenata je veći od sadržaja mikroelemenata u organizmu. Isto se odnosi i na dnevne potrebe. Potrebe odrasle osobe za makroelementima su pretežno veće od 100 mg na dan, dok dnevne potrebe za mikroelementima mogu biti u rasponu od 1 mg i manje, do 100 mg dnevno. Magnezijum i kalijum spadaju u makroelemente, a bakar, mangan i selen u mikroelemente koji se povezuju sa zapaljenjem i oštećenjem tkiva (Gropper i Smith, 2013).

Magnezijum je makroelement koga u organizmu odrasle osobe ima između 21 i 28 g, i to najviše u kostima (50%) i mišićima (20%) (Lau i Chan, 2013; Crook, 2012). Magnezijum ima ulogu u preko 300 enzimskih reakcija, u

kojima učestvuje ili kao strukturalni kofaktor, ili kao alosterični aktivator enzima (Gropper i Smith, 2013). Neki od procesa u koje je uključen magnezijum su nastajanje adenzin trifosfata (*engl.* adenosine triphosphate, ATP) iz adenzin difosfata (*engl.* adenosine diphosphate, ADP) i glikoliza, oksidativna dekarboksilacija, beta oksidacija masnih kiselina, replikacija DNK (dezoksiribonukleinska kiselina), transkripcija RNK (ribonukleinska kiselina) i translacija mRNK (*engl.* messenger RNK, glasnička RNK), kontraktilnost mišića, sprečavanje formiranja tromba i agregacije trombocita, itd. (Lau i Chan, 2013; Gropper i Smith, 2013; Grossman i Porth, 2014). Neophodan je kofaktor u sintezi antioksidanta redukovano glutationa (Mills i sar., 1986) i na taj način može uticati na tok zapaljenja. Osim toga, opisana je i još uvek nedovoljno razjašnjena obrnuta povezanost koncentracije magnezijuma i intenziteta zapaljenja. Naime, pokazano je da deficijencija magnezijuma doprinosi intenzivnijem zapaljenjskom odgovoru (Mazur i sar., 2007). Međutim, i zapaljenje, kao stresno stanje (Pongratz i Straub, 2014), može dovesti do smanjenja koncentracije magnezijuma (Seelig i Rosanoff, 2003; Arsenian, 1993). Manjak magnezijuma utiče na imunski sistem, tj. povećava aktivnost neutrofila i fagocita (Bussière i sar., 2002), utiče na povećano stvaranje histamina koji spada u medijatore zapaljenja (Bois i sar., 1963), smanjenu antioksidativnu zaštitu (Weglicki, 2012), i povećanu ekspresiju ICAM-1 i leukocitnu infiltraciju (Scanlan i sar., 2007). U nedostatku magnezijuma raste koncentracija gvožđa u jetri (Ishizaki i sar., 2011), čiji je metabolizam bitan u zapaljenju, kao što je prethodno opisano. Osim toga, pri nedostatku magnezijuma može doći i do vazodilatacije (Grossman i Porth, 2014), koja predstavlja bitnu vaskularnu promenu u zapaljenju (opisano u poglavlju 2).

Kalijum spada u makroelemente (Gropper i Smith, 2013). Osoba težine 70 kg ima oko 3,5 mola kalijuma (Burtis i sar., 2006) koji se pretežno nalazi u ćelijama (98%) (Grossman i Porth, 2014). Oko 80% ćelijskog kalijuma se nalazi u mišićima, a ostatak je pretežno raspoređen u eritrocitima, jetri i kostima

(Hoskote i sar., 2008; Giebisch, 1998). Kalijum ima brojne funkcije u organizmu. Važan je za rast, ekscitabilnost tkiva, provođenje nervnih impulsa, sintezu DNK, održavanje acido-bazne ravnoteže i metabolizam ugljenih hidrata i proteina (Hoskote i sar., 2008; Grossman i Porth, 2014). Pri oštećenju ćelija dolazi do prelaska kalijuma iz ćelije u vanćelijski prostor. U metaboličkoj acidozi dolazi do izmene kalijuma sa vodonikom, pri čemu jon vodonika ulazi u ćeliju, jon kalijuma izlazi iz ćelije (Grossman i Porth, 2014), a zatim se povećava odstranjivanje kalijuma putem bubrega (Crook, 2012). Pokazano je da u ishemijskom oštećenju tkiva dolazi do smanjenja sadržaja kalijuma u tkivu i da on zapravo može biti indikator tkivnog oštećenja (Mituhashi i sar., 2003).

Bakar je esencijalan mikroelement. Organizam čoveka sadrži između 50 i 150 mg bakra, nalazi se u svim tkivima (Gropper i Smith, 2013), a najviše u jetri, mozgu i mišićima (Lau i Chan, 2013). Veće količine bakra se mogu naći i u kostima, bubrezima, slezini i krvi (eritrociti i neutrofili) (Lau i Chan, 2013; Murray i sar., 2009). U krvi je 95% bakra vezano za ceruloplazmin, a ostatak je ili vezan za albumine i aminokiseline, ili je slobodan (Lau i Chan, 2013). U organizmu bakar se nalazi u kupro ( $\text{Cu}^{1+}$ ) i kupri ( $\text{Cu}^{2+}$ ) obliku. Bakar je kofaktor različitih enzima i uključen je u proces ćelijske respiracije (enzim citohrom c oksidaza), stvaranje melanina (enzim tirozinaza), stvaranje kateholamina (enzim dopamin beta hidroksilaza), sintezu vezivnog tkiva (enzim lizil oksidaza) i zaštitu od oksidativnog stresa (enzim superoksid dizmutaza) (Murray i sar., 2009; Banasik i Copstead, 2013). Bakar ima ulogu i u termalnoj regulaciji i procesu koagulacije (Lau i Chan, 2013).

Bakar spada u antioksidantne elemente (Murray i sar., 2009; Davis, 2003). Opisano je da je u nedostatku bakra zapaljenjski odgovor intenzivniji (Milanino i sar., 1979), a da egzogeno primenjeni bakar može imati antiinflamatorno dejstvo (Milanino i sar., 1993). Premda se navodi da je bakar značajniji kao antioksidant (Davis, 2003), u visokim koncentracijama može da pospeši

stvaranje slobodnih radikala i oštećenje ćelije (Murray i sar., 2009). Međutim, zahvaljujući porastu ceruloplazmina u zapaljenju dolazi do sekvestracije bakra, odnosno bakar se nalazi u sklopu ceruloplazmina i tako se smanjuje mogućnost stvaranja slobodnih radikala (Giurgea i sar., 2005). Koncentracija bakra može da se poveća u upaljenom tkivu, što se donekle objašnjava postojanjem inflamatornog eksudata i povećanom koncentracijom ceruloplazminom u zapaljenju (Milanino i sar., 1993). Promene koncentracije bakra se javljaju nešto kasnije u odnosu na promene koncentracije gvožđa u zapaljenju (Beisel, 1975).

Mangan je esencijalan mikroelement i ima ga oko 10 do 20 mg u telu odrasle osobe. Kofaktor je mnogih enzima, ali u slučaju njegovog nedostatka uglavnom se ne remeti funkcija enzima, jer može biti zamenjen drugim elementom (Lau i Chan, 2013). Međutim, mangan specifično aktivira enzim glikozil transferazu koji je bitan u stvaranju glikozaminoglikana i vezivnog tkiva, tako da će u slučaju nedostatka mangana, funkcija ovog enzima biti poremećena. Mangan je takođe bitan za aktivnost fosfoenolpiruvat karboksikinaze, enzima koji katalizuje nastanak fosfoenolpiruvata i ugljen-dioksida iz oksaloacetata, koraka bitnog u glukoneogenezi. Arginaza koja učestvuje u nastanku uree još jedan je enzim za čiju aktivnost je potreban mangan (Gropper i Smith, 2013; Coassin i sar., 1992).

Mangan takođe štiti od oštećenja u oksidativnom stresu, jer reaktivni peroksil radikal reaguje sa dvovalentnim manganom pri čemu nastaje trovalentni mangan i ROOH (Gropper i Smith, 2013; Coassin i sar., 1992) i inhibiše lipidnu peroksidaciju (Shukla i Chandra, 1981). Osim toga, mangan je i kofaktor jedne izoforme antioksidativnog enzima superoksid dizmutaze (Crook, 2012). Pokazano je da manjak mangana kod životinja smanjuje aktivnost superoksid dizmutaze (Gropper i Smith, 2013). Mangan porfirin može imati imunosupresivno dejstvo i smanjuje produkciju citokina (Delmastro-

Greenwood i sar., 2014). Pokazano je da smanjuje lipidnu peroksidaciju i imunski odgovor u eksperimentalnom modelu astme (Terziev i sar., 2012).

Selen je esencijalan mikroelement koji ima antioksidantna svojstva (Tinggi, 2008; Grossman i Potrh, 2014). Osoba težine 60 kg ima oko 10 mg selena u organizmu. Neki od najznačajnijih selenoproteina koji imaju ulogu u antioksidativnoj zaštiti su glutathion peroksidaza, tioredoksin reduktaza i jodotironin dejodinaza (Tinggi, 2008; Banasik i Copstead, 2013). Kao mogući antioksidanti opisuju se i selenoprotein R koji pripada metionin sulfoksid reduktazama, selenoprotein W koji se nalazi u različitim tkivima, ali najviše u skeletnim mišićima i srcu, i selenoprotein M koji se nalazi u neuronima (Gropper i Smith, 2013). Selenoprotein P se uglavnom nalazi u plazmi i može da inhibiše oksidaciju lipoproteina male gustine (LDL) i doprinese prevenciji ateroskleroze. Molekul ebselen ima aktivnost sličnu antioksidantom enzimu glutathion peroksidazi, koji takođe spada u selenoproteine. Opisano je da suplementacija selenom pojačava T-ćelijski odgovor nakon primanja polio vakcine (Broome i sar., 2004), da povećava aktivnost NK ćelija (Tinggi, 2008), i da se smanjuje titar antitela na antitireoidnu peroksidazu (anti-TPO) u autoimunskom tireoiditisu (Gärtner i sar., 2002). Nedostatak selena može biti povezan sa intenzivnijom nekrozom tireocita i nakupljanjem makrofaga (Tinggi, 2008). Takođe, selen može da prevenira nekrozu mišićnih ćelija u ishemijsko-reperfuzionom oštećenju, jer se razvija blaži zapaljenjski odgovor usled smanjenog oksidativnog oštećenja i infiltracije neutrofilima (Tenekeci i sar., 2016). Nedostatak selena je povezan sa smanjenom antioksidativnom zaštitom i povećanom ekspresijom proinflamatornih faktora u aorti (Du i sar., 2016).

Uticaj IL-33/ST2 osovine na promenu koncentracije magnezijuma, kalijuma, bakra, mangana i selena u akutnom zapaljenju, do sada nije opisan.

## 1.5 Redukovani glutacion, superoksid dizmutaza i glutacion peroksidaza

U zapaljenju dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju ćelije i tkiva, što može prouzrokovati različite poremećaje (Guilford i Hope, 2014) (videti poglavlje 2). Antioksidanti i antioksidativni enzimi suprotstavljaju se dejstvu slobodnih radikala i štite organizam u oksidativnom stresu. U egzogene antioksidante koji se unose u organizam, svrstavaju se vitamin E, lutein, zeaksantin i beta-karoten. U endogene antioksidante koji se stvaraju u organizmu, između ostalih, spadaju redukovani glutacion (GSH), superoksid dizmutaza (SOD) i glutacion peroksidaza (GPx) (Murray i sar., 2009; Roehrs i sar., 2011). Deo mehanizma endogene antioksidativne

zaštite je sledeći:

$$O_2 \cdot \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \xrightarrow{GPx} H_2O$$

$2GSH \rightleftharpoons GSSG$

(Bashan i sar., 2009; GSSG -

oksidovani glutacion). S obzirom na to da antioksidanti i antioksidativni enzimi, redukovani glutacion, superoksid dizmutaza i glutacion peroksidaza, sprečavaju oštećenje ćelija u oksidativnom stresu (Murray i sar., 2009), imaju značajnu ulogu u patogenezi akutnog zapaljenja. Stoga su, u ovom poglavlju, detaljnije opisani.

Redukovani glutacion (L-glutamil-cisteinil-glicin, GSH) je tripeptid male molekulske mase koji se sastoji od glutamata, cisteina i glicina (Hopkins, 1921; Hopkins, 1929; Cantin i Bégin, 1991). Sinteza glutaciona se odvija u dvostepenoj reakciji u koju su uključeni enzimi glutamat cistein ligaza i glutacion sintetaza (Banerjee i sar., 2008), pri čemu je magnezijum bitan kofaktor (Mills i sar., 1986). Glutacion je važan antioksidant u telu, spečava oštećenje ćelija i ima zaštitnu ulogu u zapaljenju (Guilford i Hope, 2014; Ozaydin i sar., 2006; Kevil i sar., 2004; Cantin i Bégin, 1991).

Redukovani glutacion učestvuje u uklanjanju vodonik-peroksida uz pomoć enzima glutacion peroksidaze, pri čemu iz dva molekula redukovanog



glutationa nastaje oksidovani glutation (GSSG). Na taj način, sprečava se oksidativno oštećenje ćelije peroksidima. Redukovani glutation je esencijalan reduktant, jer pomaže da se SH grupe pojedinih enzima održe u redukovanom obliku. Redukovani glutation je bitan zbog konjugacije sa štetnim hemijskim agensima, kao što su lekovi i karcinogeni. Na taj način redukovani glutation takođe sprečava oštećenje organizma (Murray i sar., 2009; Chhetria i sar., 2011; Bashan i sar., 2009). Osim antioksidativnih svojstava, sadržaj redukovanog glutationa ima ulogu i u imunskom odgovoru (Morris i sar., 2013; Dröge i sar., 1986; Kevil i sar., 2004), što sve zajedno čini da je redukovani glutation bitan činilac zaštitnog mehanizma u zapaljenju.

Superoksid dizmutaza (SOD) je antioksidativni enzim koji postoji u tri izoforme: SOD1 (Cu/Zn-SOD, bakar/cink-superoksid dizmutaza) koja se pretežno nalazi u citosolu, SOD2 (Mn-SOD, mangan-superoksid dizmutaza) uglavnom u mitohondrijalnom matriksu i SOD3 (*engl.* extracellular superoxide dismutase, vanćelijska superoksid dizmutaza, Ec-SOD) koja se u tkivima uglavnom nalazi u ekstracelularnom prostoru i na površini ćelija (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Sve tri izoforme vrše istu funkciju, odnosno katalizuju reakciju neutralisanja superoksida, pri čemu nastaju vodonik-peroksid i kiseonik, kako bi se sprečilo oštećenje ćelije superoksidom (McCord i Fridovich, 1969; Fukai i Ushio-Fukai, 2011; Murray i sar., 2009). Pokazano je da u zapaljenju opada aktivnost superoksid dizmutaze (Chhetria i sar., 2011). Tretman superoksid dizmutazom smanjuje oksidativni stres i ekspresiju adhezivnih molekula, što dovodi do blažeg zapaljenja creva koje je izazvano radijacijom (Mollà i sar., 2005). Tretman rekombinantnom superoksid dizmutazom je takođe uticao na razvoj blažeg zapaljenjskog odgovora u zubnoj pulpi (Baumgardner i Sulfaro, 2001). Miševi koji povećano eksprimiraju superoksid dizmutazu imaju blažu kliničku sliku artritisa usled smanjenjenog stvaranja proinflamatornih citokina i enzima matriks metaloproteaza (Yu i sar., 2012).

Glutation peroksidaza (GPx) je antioksidativni enzim koji učestvuje u reakciji redukcije vodonik-peroksida u vodu (H<sub>2</sub>O) i lipidnih peroksida u odgovarajući alkohol, pri čemu iz dva molekula redukovano glutatona nastaje oksidovani glutation (Mills, 1957; Banerjee i sar., 2008; Chhetria i sar., 2011). Na taj način, smanjuje se nivo peroksida koji mogu da izazovu oštećenje u organizmu (Chhetria i sar., 2011). Pokazano je da se kod miševa kojima je ukonjen gen za glutation peroksidazu-1 razvija snažniji zapaljenjski odgovor u infekciji virusom *Influenza A* (Yatmaz i sar., 2013). U hroničnom zapaljenju kod dece može doći do porasta aktivnosti glutation peroksidaze kao kompenzatornog mehanizma protiv oštećenja slobodnim radikalima (Ismail i sar., 2012). U neutrofilima starijih osoba nalazi se veći sadržaj vodonik-peroksida i to se objašnjava smanjenom aktivnošću glutation peroksidaze, što doprinosi većem oštećenju ćelija u starosti (Ito i sar., 1998).

Uzevši u obzir značaj redukovano glutatona, superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze u akutnom zapaljenju, kao i da još uvek nije razjašnjeno dejstvo IL-33/ST2 osovine na ove parametre, jedan deo prikazanih istraživanja je posvećen ovoj temi.

## **2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja su bili:

- Odrediti bihemijske pokazatelje oštećenja ćelija tkiva u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.
- Kvantitativno odrediti stepen zapaljenja i nekroze analizirajući strukturalne promene tkiva u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.
- Odrediti gensku ekspresiju citokina na mestu zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.
- Odrediti hematološke parametre u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.
- Odrediti koncentraciju makro- i mikroelemenata na mestu zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.
- Odrediti parametre antioksidativne zaštite na mestu zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja u odnosu na IL-33/ST2 osovinu.

## **3 MATERIJAL I METODE**

### 3.1 Eksperimentalne životinje

U ovom istraživanju korišćeni su mužjaci genetski neizmenjenih BALB/c miševa (wild-type) i BALB/c miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2 knockout, ST2-/-), starosti 9–10 nedelja. Životinje su nabavljene na Vojnomedicinskoj akademiji (Beograd, Srbija) i bile su raspoređene u providne kaveze od pleksiglasa obložene šuškom, i izložene standardnim laboratorijskim uslovima (dnevno-noćni ciklus od 12h - početak dnevnog perioda u 8.00 h, temperatura  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relativna vlažnost vazduha 50%), a voda i hrana su bile dostupne *ad libitum*. Aklimatizacija životinja je trajala sedam dana.

### 3.2 Eksperimentalni protokol

Sve sprovedene eksperimentalne procedure su bile odobrena od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj dokumenta 4453/2) i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (broj rešenja 323-07-10519/2013-05/7).

Životinje su bile nasumično raspoređene u četiri grupe: 1. WT-C (*engl.* wild-type control group, kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa), 2. KO-C (*engl.* knockout control group, kontrolna grupa miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor), 3. WT-I (*engl.* wild-type inflammatory group, eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje) i 4. KO-I (*engl.* knockout inflammatory group, eksperimentalna grupa miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor kod kojih je izazvano akutno zapaljenje). U istraživanje su bile uključene 92 životinje. Akutno zapaljenje je izazvano davanjem intramuskularne injekcije

terpentinskog ulja (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) u ukupnoj dozi od 10 ml/kg, u zadnje ekstremitete, dok su kontrolne životinje primile intramuskularnu injekciju fiziološkog rastvora (Hemofarm, Vršac, Srbija) u istoj dozi. Pre tretmana i dvanaest sati nakon tretmana nije bilo značajne razlike između telesnih masa grupa. Dvanaest sati nakon tretmana, životinje su uvedene u opštu anesteziju intraperitonealnim davanjem 100 mg/kg ketamin hidrohlorida (Ketamidol, Richter Pharma, Vels, Austrija) i 5 mg/kg ksilazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Nemačka) (Stankovic i sar., 2016a; Stankovic i sar., 2015; Stankovic i sar., 2016b; Sultan i sar., 2012; Opie, 1962). Sakupljeni su uzorci tretiranih mišića životinja u kontrolnim i eksperimentalnim grupama, slezine i krvi iz srca.

Uzorak tretiranog mišića koji je odmah zamrznut u tečnom azotu (Messer, Beograd, Srbija), a potom čuvan na -80°C (IlSheen Europe Deep Freezer, Ede, Holandija), korišćen je za analizu genske ekspresije citokina (IL-33, TNF-alfa, IL-6, IL-12p35 i TGF-beta) i ST2 receptora, za određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata (magnezijum, kalijum, gvožđe, bakar, mangan i selen), i antioksidativnih parametara (redukovani glutation, superoksid dizmutaza i glutation peroksidaza). Drugi deo tretiranog mišića je bio čuvan i fiksiran u 4% puferisanom rastvoru formaldehida (Centrohema, Stara Pazova, Srbija) i korišćen je za histopatološku analizu, kvantifikaciju zapaljenjskog infiltrata i nekroze, i određivanje fraktalne dimenzije, ugaonog drugog momenta i teksturalne korelacije. Uzorak slezine je korišćen za određivanje procenta eritrocita u slezini. Aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze, biohemijskih pokazatelja oštećenja ćelija tretiranog tkiva (Kaneko i sar., 2008) su određene u serumu dobijenom nakon uzorkovanja krvi iz srca. Dodatni uzorak krvi je korišćen za određivanje broja eritrocita, hematokrita, koncentracije hemoglobina u krvi, prosečne količine hemoglobina u eritrocitu, i broja neutrofila i limfocita u krvi.

### **3.3 Određivanje aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu**

#### **3.3.1 Određivanje aktivnosti kreatin kinaze u serumu**

Određivanje aktivnosti kreatin kinaze (*engl.* creatine kinase, CK) bilo je zasnovano na činjenici da ovaj enzim katalizuje stvaranje adenzin trifosfata (*engl.* adenosine triphosphate, ATP) i kreatina, iz kreatin fosfata i adenzin difosfata (*engl.* adenosine diphosphate, ADP). Stvoreni ATP je bio uključen u reakciju sa glukozom, katalizovanom heksokinazom i nastala je glukoza 6-fosfat. Glukoza 6-fosfat je reagovala sa NADP<sup>+</sup> u reakciji katalizovanoj glukozo-6-fosfat dehidrogenazom, pri čemu je mereno krajnje stvaranje NADPH na 340 nm. Određivanje aktivnosti kreatin kinaze je izvršeno pomoću fotometra (Biosystems BTS - 330, Barselona, Španija) i Biosystems reagenasa (Biosystems S.A, Barselona, Španija), prema uputstvu proizvođača. Naime, serum zapremine 15 µl je bio pomešan sa 240 µl reagensa A iz kita i inkubiran četiri minuta. Potom je dodato 60 µl reagensa B iz kita, sadržaj je promešan, inkubiran tri minuta i potom je očitavana apsorbancija tokom tri minuta pri radnoj temperaturi 37°C, i na kraju je očitana aktivnost enzima (Stankovic i sar., 2016a).

#### **3.3.2 Određivanje aktivnosti aspartat aminotransferaze u serumu**

Metoda kojom je određivana aktivnost aspartat aminotransferaze (*engl.* aspartate aminotransferase, AST) zasniva se na činjenici da je aspartat aminotransferaza katalizovala stvaranje oksalacetata i glutamata iz aspartata i 2-oksoglutarata. Stvoreni oksalacetat je bio dalje uključen u reakciju sa NADH i H<sup>+</sup>, katalizovanom malat dehidrogenazom u kojoj su nastali malat i NAD<sup>+</sup>.



Aktivnost aspartat aminotransferaze je izmerena kao brzina smanjenja NADH merenjem na 340 nm. Aktivnost enzima je određena pomoću fotometra (Biosystems BTS – 330, Barselona, Španija) i Biosystems reagenasa (Biosystems S.A, Barselona, Španija), prema uputstvu proizvođača. Najpre je napravljen radni reagens mešanjem 4 ml reagensa A i 1 ml reagensa B koji su se nalazili u kitu. Potom je 1 ml radnog reagensa pomešan sa 50 µl seruma, nakon prvog minuta je očitana početna apsorbancija, a potom i nakon svakog minuta u toku naredna tri minuta pri radnoj temperaturi 37°C i na kraju je očitana aktivnost enzima (Stankovic i sar., 2016a).

### **3.4 Analiza genske ekspresije citokina i ST2 receptora** (lančana reakcija umnožavanja polimerazom praćena u stvarnom vremenu sa reverznom transkripcijom, qRT-PCR)

Tkivo za analizu je nakon uzorkovanja, odmah zamrznuto u tečnom azotu (Messer, Beograd, Srbija) i čuvano na -80°C (IISheer Europe Deep Freezer, Ede, Holandija). Potom je 50 mg tkiva isprano u dietilpirokarbonatu (*engl.* diethylpyrocarbonate, DEPC) čime se inaktiviraju ribonukleaze i sprečava se razgradnja RNK. Svaki uzorak je prebačen u 500 µl TRIzol rastvora (Life Technologies, Karlsbad, SAD), i homogenizovan pomoću homogenizatora T10 Basic Ultra-turrax (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka). Tokom homogenizacije, epruveta sa uzorcima i TRIzol rastvorom je bila na ledu. Nakon toga, dodato je po 100 µl hloroforma (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka) i sadržaj je protresen na uređaju Tehtnica EV-100 (Železniki, Slovenija) tokom 10 sekundi. Potom je sadržaj inkubiran na +4°C tokom 10 minuta, i centrifugiran pri istoj temperaturi i 12.000 g tokom 15 minuta (Eppendorf 5810R, Hamburg, Nemačka). U novu epruvetu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prebačeno je 300 µl nadtaloga koji je sadržao RNK i dodato je 300 µl

izopropanola (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka). Epruveta je obrnuta gore-dole 10 puta i ostavljena na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Sadržaj je centrifugiran 15 minuta na 12.000 g (+4°C), nakon čega je nadtalog izvađen, a epruveta s talogom stavljena je na led. U svaku epruvetu dodat je 1 ml 75% etanola (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka), sadržaj je protresen na mašini Tehtnica EV-100 (Železniki, Slovenija), a zatim centrifugiran pet minuta na 7.500 g i temperaturi +4°C. Uklonjen je nadtalog i ponovljen je postupak sa dodavanjem 75% etanola i centrifugiranjem. Uklonjen je ponovo nadtalog, urađeno je trenutno kratko centrifugiranje (short spin), uklonjen je preostali nadtalog, nakon čega je talog u epruveti sušen na sobnoj temperaturi. Potom je u svaku epruvetu dodata voda bez nukleaza (Thermo Scientific, Voltam, SAD) u kojoj je talog rastvoren. Uzorci RNK su čuvani na -80°C (IISheen Europe Deep Freezer, Ede, Holandija).

Određivanje koncentracije RNK je urađeno korišćenjem aparata GeneQuant (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD), nakon čega je primenjen postupak obrnutog prepisivanja RNK (reverzna transkripcija RNK). Korišćena je reverzna transkriptaza MuLV Reverse Transcriptase s nasumičnim heksamerskim početnim oligonuklotidnim nizovima (random hexamer primers, Life Technologies, Karlsbad, SAD). Uzorcima RNK mase 1 µg, koji su bili na ledu, dodato je do 13 µl vode koja nije sadržala nukleaze (Thermo Scientific, Voltam, SAD), a potom je dodat 1,5 µl Master Mix-a 1 (1 µl random hexamer primer-a i 0,5 µl 100mM dezoksinukleotid-trifosfata) i sadržaj je inkubiran 10 minuta na +70°C u uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Uzorci su potom kratko centrifugirani (10 sekundi), zatim su dva minuta stajali na ledu i potom je dodat Master Mix 2 (4 µl pufera i 0,5 µl inhibitora RNKaze) i 1 µl reverzne transkriptaze. Nakon toga, uzorci su inkubirani u uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 15 minuta na 25°C, potom 60 minuta na 42°C, 10 minuta na 70°C, tri minuta na 95°C, i po završetku bili su držani na +4°C u istom uređaju do prebacivanja u

frižider. Na ovaj način je dobijena komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina (cDNK) koja je čuvana pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  (IISheen Europe Deep Freezer, Ede, Holandija).

Za lančanu reakciju umnožavanja polimerazom praćenu u stvarnom vremenu (qPCR) korišćen je uređaj Realplex2 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), TaqMan primers/probes (Applied Biosystems, Karlsbad, SAD) i Maxima Hot start PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Voltam, SAD). Ispitivana je ekspresija gena za IL-33 (Mm00505403\_m1), TNF-alfa (Mm00443258\_m1), IL-6 (Mm00446190\_m1), IL-12p35 (Mm00434165\_m1), TGF-beta (Mm01178820\_m1), ST2 receptor (Mm00516117\_m1), i Rn18S (Mm03928990\_g1) koji je bio kontrolni (house-keeping) gen.

Mešavina završne zapremine 10  $\mu\text{l}$ , koja se sastojala od Maxima Hot start PCR Master Mix 2X, TaqMan primers/probes i cDNK je sipana u odgovarajući bunar mikro ploče sa 96 raspoloživih bunara (Applied Biosystems, Češir, Velika Britanija), a potom je ploča prekrivena zaštitnom folijom (Applied Biosystems, Češir, Velika Britanija). Ploče su centrifugirane 30 sekundi na 2.000 obrtaja/min. (Eppendorf 5810R, Hamburg, Nemačka), a potom su uzorci umnoženi u uređaju Realplex2 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Temperaturni protokol je bio sledeći:  $50^{\circ}\text{C}$  - dva minuta,  $95^{\circ}\text{C}$  - 10 minuta, a potom 40 ciklusa ( $95^{\circ}\text{C}$  - 15 sekundi i  $60^{\circ}\text{C}$  - jedan minut). Svi eseji su urađeni u duplikatu. Relativna genska ekspresija je predstavljena kao  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , pri čemu je  $\Delta\text{Ct}$  dobijena kada se vrednost pragovnog ciklusa (Ct) kontrolnog (house-keeping) gena oduzme od vrednosti pragovnog ciklusa ispitivanog gena (Bosnjak i sar., 2014; Stankovic i sar., 2016a).

### 3.5 Određivanje hematoloških parametara krvi i slezine

Broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina u krvi, prosečna količina hemoglobina u eritrocitu, broj neutrofila i limfocita određeni su u uzorku krvi sakupljenom iz srca. Sakupljanje uzoraka, a potom određivanje parametara hematološkim analizatorom ABX Pentra 80 (Monpelje, Francuska) izvršeno je prema preporukama proizvođača. Krv je sakupljena uz pomoć šprica i igle (Nipro Corporation, Osaka, Japan) prethodno obloženih rastvorom antikoagulansa etilen diamin tetra sirćetne kiseline (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Centrohema, Stara Pazova, Srbija). Najmanje 200  $\mu$ l krvi je sipano u epruvete sa zatvorenim vakumskim sistemom koje su sadržale EDTA (Vacutest Kima, Piove di Sako, Italija), a potom su epruvete obrnute gore-dole deset puta. Od neophodnih 200  $\mu$ l, aparat je usisao 53  $\mu$ l i automatski su dobijene vrednosti broja eritrocita, hematokrita, koncentracije hemoglobina u krvi, prosečne količine hemoglobina u eritrocitu i broja neutrofila i limfocita u krvi (Stankovic i sar., 2015).

Nakon sakupljanja slezine, uklonjeno je vezivno i masno tkivo, i uzorak slezine je usitnjen i propušten kroz sito promera 0,1 mm (KDL, Anping, Kina). Napravljeni su razmazi na pločicama (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka) koji su obojeni May-Grünwald-Giemsa bojom (Carlo Erba, Rodano, Italija). Brojano je po 100 ćelija u deset vidnih polja pri uveličanju  $\times 100$  (mikroskop Bio-optica 1000, Milano, Italija) i određeno je procentualno učešće eritrocita u odnosu na ukupan broj izbrojanih ćelija (Djordjevich i sar., 2012).

### 3.6 Određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata u tkivu

Za određivanje koncentracije makro- i mikroelemenata, tkivo je bilo tretirano azotnom kiselinom (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i 30% vodonik-peroksidom (Zorka Pharma, Šabac, Srbija), u odnosu 0,5 g tkiva sa 8 ml azotne kiseline i 2 ml 30% vodonik-peroksida, a potom digestirano u mikrotalasnoj pećnici (ETHOS TC, Milestone S.r.l., Sorizole, Italija) na temperaturi koja je rasla od sobne temperature do 180°C tokom pet minuta, zatim je postignuta temperatura održavana 10 minuta, nakon čega je sledilo provetravanje tokom 15 minuta. Nakon sprovedenog temperaturnog protokola, digestirano tkivo je prebačeno u 50 ml pljosnate boce (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) sa dejonizovanom vodom.

Koncentracija gvožđa, magnezijuma, kalijuma, bakra, mangana i selena je određena atomskim apsorpcionim spektrometrom (SpectrAA 220, Varian, Palo Alto, SAD) prema Varian Atomic Absorption Spectrometers (AAS) analitičkim metodama.

Koncentracije gvožđa, magnezijuma, kalijuma, bakra i mangana određivane su AAS metodom s atomizacijom u plamenu. Talasna dužina pri kojoj je određena koncentracija gvožđa je bila 248,3 nm, koncentracija magnezijuma 285,2 nm, koncentracija kalijuma 766,5 nm, koncentracija bakra 324,8 nm, i koncentracija mangana 279,5 nm. Koncentracija selena je određena hidridnom tehnikom redukcije rastvorom 0,6% natrijum borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ , J. T. Baker, Deventer, Holandija) u 0,5% natrijum hidroksida ( $\text{NaOH}$ , Lach-ner, Neratovice, Češka), pomoću istog atomskog apsorpcionog spektrometra (SpectrAA 220, Varian, Palo Alto, SAD) sa dodatkom hidridnog sistema (VARIAN VGA 77, Palo Alto, SAD), pri talasnoj dužini 196 nm. Za proveru kontrole kvaliteta je korišćen sertifikovani referentni materijal (Standard

Reference Material 1577c-Bovine liver, NIST, Njujork, SAD) (Djordjevich i sar., 2012; Stankovic i sar., 2016a).

### **3.7 Određivanje sadržaja redukovanoog glutaciona, i aktivnosti superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze u tkivu**

Sadržaj redukovanoog glutaciona (GSH), i aktivnosti superoksid dizmutaze (*engl.* superoxide dismutase, SOD) i glutacion peroksidaze (*engl.* glutathione peroxidase, GPx) u tkivu su određene spektrofotometrom (3000 Evolution, Biochemical Systems International, Areko, Italija). Uzorak tkiva mase 0,2 g je homogenizovan u 10 puta većoj zapremini rastvora koji je sadržao 20 mM natrijum fosfatnog pufera pH = 7.4 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija) i 140 mM kalijum hlorida (KCl, Centrohem, Stara Pazova, Srbija). Potom je homogenat centrifugiran 10 minuta na 800 g (Jouan GR 20.22, Sent Erblen, Francuska) i dobijeni nadtalog je korišćen u daljim analizama. Koncentracija proteina u nadtalogu je određena spektrofotometrom (3000 Evolution, Biochemical Systems International, Areko, Italija) po metodi Lowry-a i saradnika (Lowry i sar., 1951), a kao standard je korišćen katalizovani goveđi serumski albumin (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD).

#### **3.7.1 Određivanje sadržaja redukovanoog glutaciona u tkivu**

Sadržaj redukovanoog glutaciona (GSH) u tretiranom mišićnom tkivu je određen po metodi Ellman-a (Ellman, 1959). Ellman-ov reagens tj. 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) reagovao je sa alifatičnim tiol jedinjenjima u alkalnoj sredini, pri čemu je došlo do stvaranja

p-nitrofenol anjona žute boje. Merenjem intenziteta boje spektrofotometrom (3000 Evolution, Biochemical Systems International, Areko, Italija) pri 412 nm je određen sadržaj redukovanog glutationa. Najpre je uzorak pomešan sa 10% sulfosalicilnom kiselinom (Merck, Darmštad, Nemačka) u odnosu 2 : 1, sadržaj je snažno promešan i centrifugiran (Jouan GR 20.22, Sent Erblen, Francuska) 20 minuta pri 6.000 obrtaja/min. Dobijeni nadtalog je korišćen za dalju analizu. Pomešano je 400  $\mu$ l 0,4 M TRIS-HCl pufera (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka), 500  $\mu$ l destilovane vode ( $dH_2O$ ), 100  $\mu$ l nadtaloga i 10  $\mu$ l rastvora Ellman-ovog reagensa u metanolu (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD; Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Potom je smeša inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi i očitana je apsorbancu pri 412 nm, na osnovu koje je dobijena vrednost sadržaja redukovanog glutationa.

### **3.7.2 Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u tkivu**

Merenje aktivnosti superoksid dizmutaze u tkivu je urađeno po metodi Sun-a i Zigman-a (Sun i Zigman, 1978), koja se zasniva na činjenici da superoksid dizmutaza uklanja superoksidne radikale. Aktivnost enzima je određena kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) u alkalnoj sredini. Reakciona smeša je sadržala 2,85 ml 50mM natrijum bikarbonatnog pufera (pH 10.2, Centrohem, Stara Pazova, Srbija), 0,05 ml uzorka i 0,1 ml rastvora adrenalina (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD), čijim dodavanjem je otpočinjala reakcija. Merena je promena ekstinkcije tokom 10 minuta pri 480 nm (3000 Evolution, Biochemical Systems International, Areko, Italija), na osnovu koje je dobijena vrednost aktivnosti superoksid dizmutaze.

### 3.7.3 Određivanje aktivnosti glutacione peroksidaze u tkivu

Aktivnost glutacione peroksidaze (GPx) u tkivu je određena po metodi Günzler-a i saradnika (Günzler i sar., 1974), koja se zasniva na oksidaciji redukovanog glutationa u reakciji koju katalizuje enzim glutacione reduktaze, pri čemu dolazi do potrošnje NADPH. Aktivnost glutacione peroksidaze je određena merenjem promene apsorbanca pri 340 nm (3000 Evolution, Biochemical Systems International, Areko, Italija), koja je posledica potrošnje NADPH+H<sup>+</sup> u vezanoj reakciji u kojoj učestvuje glutacione reduktaze. U prvom koraku, 50 µl uzorka je bilo pomešano sa 870 µl 0,2 M HEPES pufera pH 7.4 i 2mM EDTA (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD), 20 µl 100 mM GSH (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) i 20 µl glutacione reduktaze (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD). Mešavina je inkubirana dva minuta na sobnoj temperaturi, a potom je dodato 20 µl 8 mM NADPH (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) i 20 µl 30 mM tert-butil hidropoksida (t-BOOH; Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD). Praćena je promena apsorbanca u toku tri minuta pri 340 nm i temperaturi 37°C, na osnovu koje je dobijena aktivnost glutacione peroksidaze.

## 3.8 Histopatološka analiza

### 3.8.1 Histopatološka analiza preparata obojenih hematoksilinom i eozinom

Sakupljeni uzorci tretiranog tkiva su čuvani i fiksirani u 4% puferisanom rastvoru formaldehida (Centrohema, Stara Pazova, Srbija).

Uzorci tkiva su izvađeni iz rastvora formaldehida i izvršena je dehidratacija potapanjem uzorka u rastvore etanola rastućih koncentracija, 75%, 86%, 96% i 100% (Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Potom je svaki uzorak prožet



rastvorom parafina (Bio-plast extra, Bio-optica, Milano, Italija) tokom 18 sati pri temperaturi 60°C, ukalupljen (Kartell, Noviljo, Italija) i zaliven toplim voskom. Sečenje ukalupljenih uzoraka je izvršeno klizajućim mikrotomom (Leica CM1800, Leica Microsystems, Nusloh, Nemačka). Iseći debljine 3  $\mu\text{m}$  su stavljeni u vodeno kupatilo (Leica HI 1210, Leica Microsystems, Nusloh, Nemačka) na 56°C najviše par minuta, a zatim prebačeni na predmetno staklo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka). Deparafinizacija je izvršena potapanjem preparata u rastvor ksilola (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) tokom 20 minuta, nakon čega je radi rehidratacije sledilo uzastopno potapanje u 100%, 96%, 86% i 75% rastvor etanola i ispiranje tekućom vodom. Preparati su prvo bojani rastvorom hematoksilina (Bio-Optica, Milano, Italija) tokom 10 minuta, isprani tekućom vodom, a potom bojani rastvorom eozina (MP Biomedicals LLC, Francuska) u trajanju od tri minuta i isprani tekućom vodom. Sledilo je uzastopno potapanje preparata u rastvore etanola rastućih koncentracija (75%, 86%, 96% i 100%) radi dehidratacije. Preparati su, potom, potopljeni u rastvor ksilola (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) dva puta po 20 minuta, nakon čega je na svaki preparat stavljena kap Canadabalsam Ductil-a (Molar Chemicals Kft, Halastelek, Mađarska) i svaki preparat je pokriven pokrovnim staklom (Menzel-Gläser, Braunšvajg, Nemačka). Histopatološka analiza je rađena na svetlosnom mikroskopu Olympus BX4 s montiranim digitalnim fotoaparatom Olympus C5060-ADU uz podršku softverskog programa Olympus DP-soft 5.0 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) (Stankovic i sar., 2016a; Stankovic i sar., 2016b).

### **3.8.2 Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija**

Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata ( $V_{gz}$ ) i nekrotičnih ćelija ( $V_{gn}$ ) u tretiranom tkivu je određena korišćenjem metode brojanja pogodaka na

mrežici B36 na uveličanju  $\times 100$  na mikroskopu Olympus CH (Olympus Corporation, Tokio, Japan) (Milićević i sar., 2010), kako bi se kvantifikovao intenzitet zapaljenjskog infiltrata i nekroze u tretiranom tkivu (Stankovic i sar., 2016a).

Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata ( $V_{gz}$ ) izračunata je pomoću formule  $V_{gz} = T_z/T_t$ , gde je  $T_z$  predstavljao broj tačaka koji je padao na inflamatorne ćelije, a  $T_t$  ukupan broj test tačaka (Milićević i sar., 2010; Kim, 1984). Analizirana su najmanje dva slučajno izabrana polja, od nađenih polja sa najgušćim zapaljenjskim infiltratom, po životinji i izračunata je srednja vrednost koja je potom uključena u statističku analizu (Stankovic i sar., 2016a).

Volumenska gustina nekrotičnih ćelija ( $V_{gn}$ ) izračunata je po formuli  $V_{gn} = T_n/T_t$ , gde je  $T_n$  predstavljao broj tačaka koji je padao na nekrotične mišićne ćelije, dok je  $T_t$  bio ukupan broj test tačaka (Milićević i sar., 2010; Kim, 1984).  $V_{gn}$  je analizirana u dva slučajno izabrana polja, od nađenih polja s najintenzivnijom nekrozom, po životinji i izračunata je srednja vrednost (Stankovic i sar., 2016a).

### 3.8.3 Fraktalna i teksturalna analiza

Za analizu fraktalne dimenzije mikrografa tkiva korišćen je standardni metod kojim se fraktalni objekat prekriva serijom kvadrata (box-counting metod) u FracLac plugin-u (Bethesda 2.5, Release 1e; A. Karperien, Charles Sturt University, Australia) za ImageJ Software (National Institutes of Health – NIH, Bethesda, SAD). Mikrografi su automatski prebačeni u binarni format u FracLac plugin-u sledećim putem: ImageJ> Plugins> Fractal analysis> FracLac\_2.5 Release 1e> Standard box count> Auto Threshold to Binary, pri

čemu program koristi ugrađene granične vrednosti (Karperien, 1999–2013). Fraktalna dimenzija (D), indikator strukturne kompleksnosti koji se može koristiti za određivanje tkivne kompleksnosti u različitim poremećajima (Dey i Banik, 2012; Rajagopalan i sar., 2013; Captur i sar., 2014; Manera i sar., 2014), izračunata je na osnovu pada regresione linije u koordinatnom sistemu, gde x osa predstavlja logaritam skale ( $\epsilon$ ), a y osa logaritam broja kvadrata (N):

$D = \text{pad regresione linije [ } \ln N / \ln \epsilon \text{ ]}$  (Stankovic i sar., 2016b).

Za teksturalnu analizu je korišćena metoda matrice združenog pojavljivanja nivoa sivog [*engl.* grey level co-occurrence matrix (GLCM) metoda], koja je izvedena u ImageJ Plugin-u: Texture Analyser (Cabrera, 2005), GLCM\_TextureToo (Cornish, 2007), i MATLAB (MathWorks, Nejtik, SAD). Pre teksturalne analize, mikrografi su prebačeni u 8-bitni format. Ugaoni drugi momenat (*engl.* angular second moment, ASM) je indikator teksturalne uniformnosti i homogenosti u 8-bitnoj slici. Uniformna distribucija parova rezolucionih jedinica mikrografa odgovara višim vrednostima ugaonog drugog momenta (Stankovic i sar., 2016b). Teksturalna korelacija (*engl.* textural correlation, COR) je indikator postojanja i jačine linearne povezanosti između parova rezolucionih jedinica u 8-bitnom mikrografu (Stankovic i sar., 2016b; Sharma i sar., 2008; Haralick i sar., 1973). Manje vrednosti teksturalne korelacije ukazuju na iregularnu strukturu slike, a više vrednosti na veću sličnost između delova slike (Mostaço-Guidolin i sar., 2013; Yang i sar., 2012; Stankovic i sar., 2016b).

Ugaoni drugi momenat (ASM) i teksturalna korelacija (COR) određeni su uz pomoć sledećih formula:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i, j)\}^2,$$

$$\text{COR} = \frac{\sum_i \sum_j (ij) p(i,j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y},$$

pri čemu  $\mu$  predstavlja srednju vrednost,  $\sigma$  standardnu devijaciju, and  $p$  relativnu učestalost javljanja parova rezolucionih jedinica s koordinatama u GLCM matrici  $i$  i  $j$  (Stankovic i sar., 2016b).

Za određivanje fraktalne dimenzije, ugaonog drugog momenta i teksturalne korelacije analizirano je po tri mikrografa po životinji, napravljenih uz pomoć Olympus CX21FS1 binokularnog mikroskopa (Olympus Corporation, Tokio, Japan) i kamere Pro-MicroScan DEM 200 instrument (Oplenic Optronics, Hangzhou, Kina). Izračunata je srednja vrednost ispitivanog parametra po životinji, koja je potom uključena u statistiku.

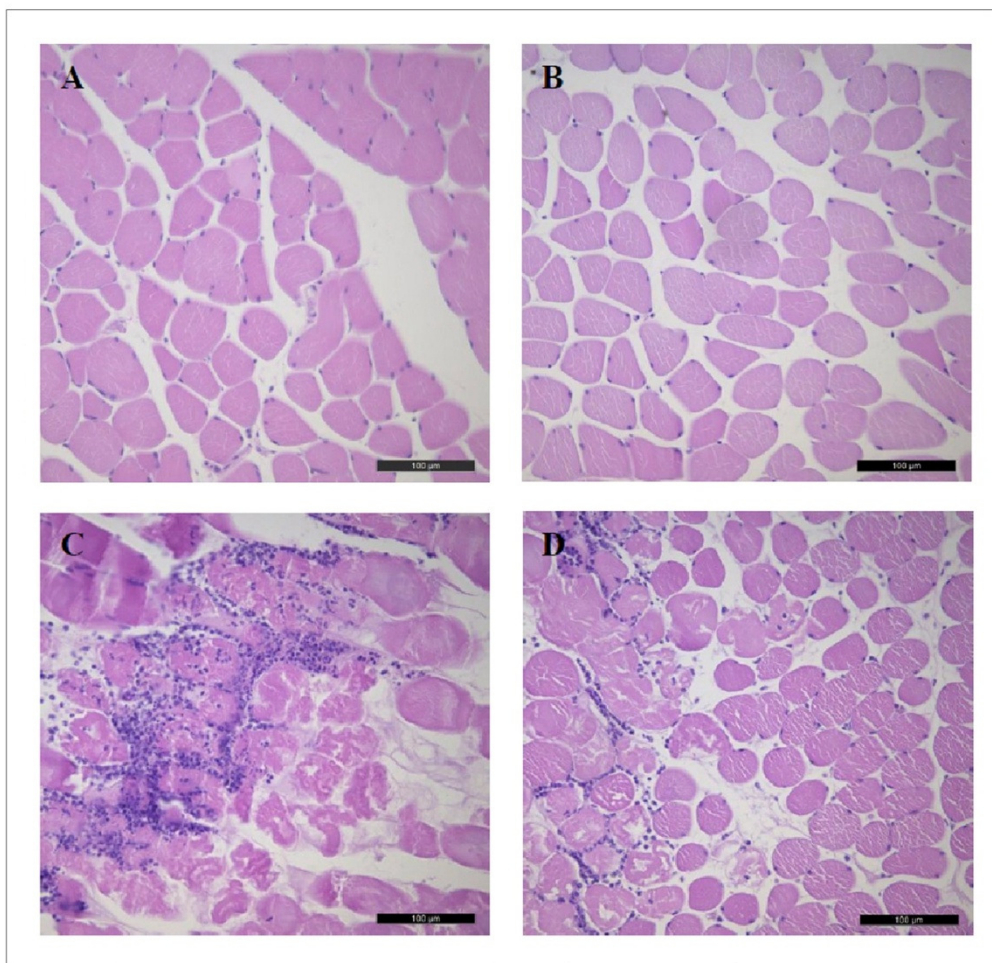
### 3.9 Statistička analiza

Za statističku analizu korišćen je statistički program SPSS 15.0 (Čikago, SAD). Statistička značajnost razlike ispitivanih parametara između dve grupe je testirana Studentovim t-testom ili Mann-Whitney-Wilcoxon testom za nezavisne uzorke, u zavisnosti od homogenosti podataka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, a statistički značajnim je smatrana vrednost  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

#### **4.1 Histopatološka analiza preparata obojenih hematoksilinom i eozinom u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

U eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) i eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) histopatološkom analizom je potvrđeno prisustvo zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih vlakana u tretiranom tkivu, dok je u kontrolnoj grupi genetski neizmenjenih miševa (WT-C) i kontrolnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) tretirano tkivo bilo očuvano i bez zapaljenjskog infiltrata (slika 1) (Stankovic i sar., 2015).



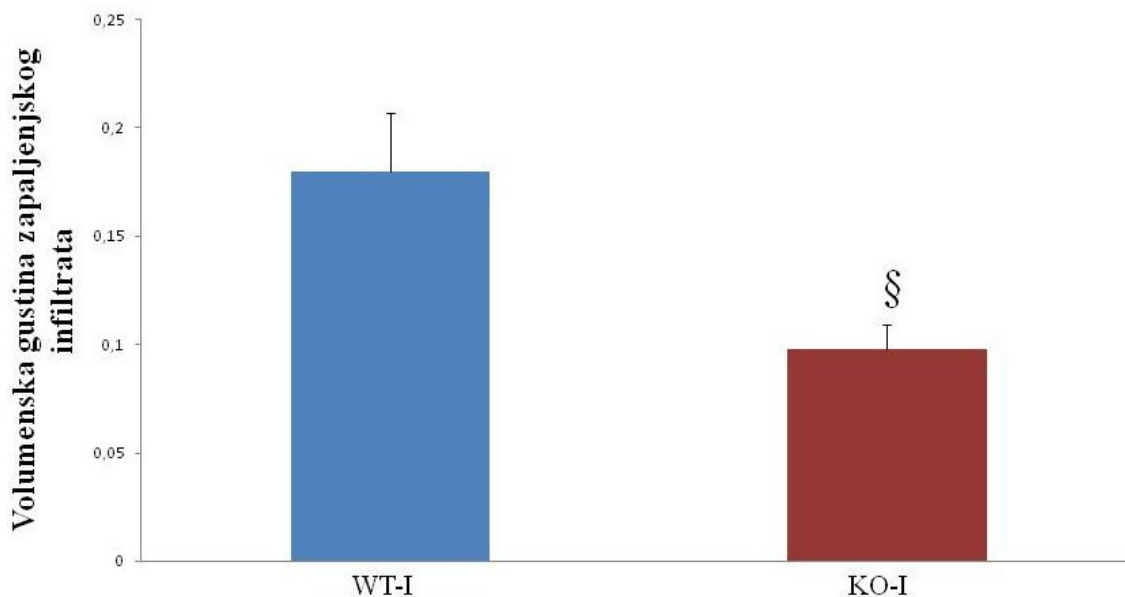
Slika 1 (Stankovic i sar., 2015). Histopatološka analiza upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Histopatološkom analizom je potvrđeno prisustvo zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih mišićnih ćelija u tretiranom tkivu u WT-I (Panel C) i KO-I (Panel D), dok je tretirano tkivo bilo očuvano i bez zapaljenjskog infiltrata u WT-C (Panel A) i KO-C (Panel B). Preparati su bili obojeni hematoksilinom i eozinom. WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje).

## **4.2 Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

### **4.2.1 Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata na mestu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u poređenju sa eksperimentalnom grupom ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) (slika 2) (Stankovic i sar., 2016a).

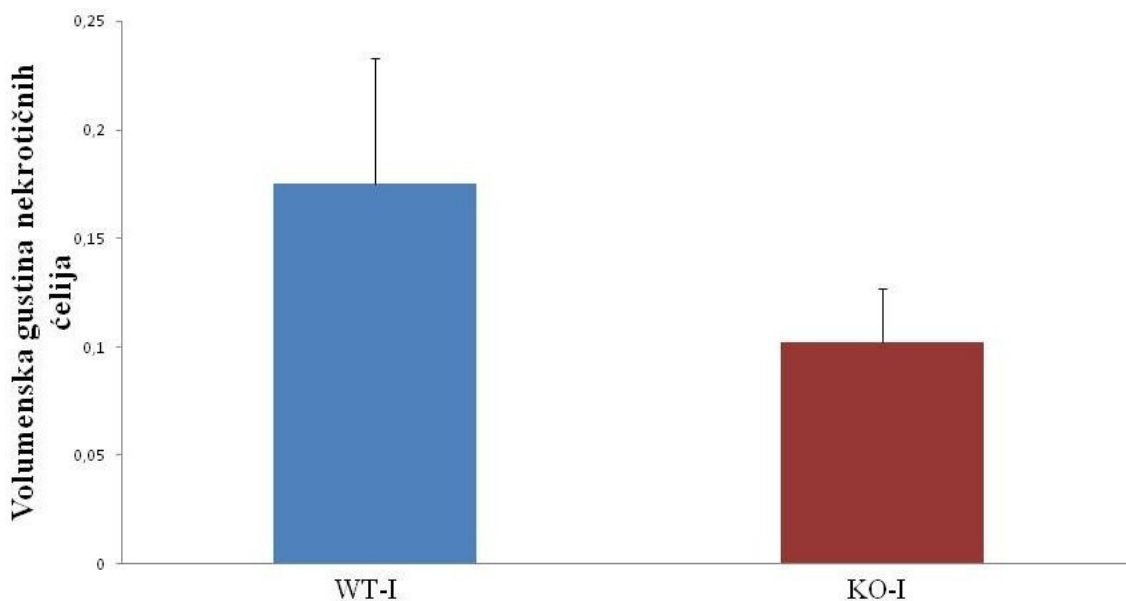




Slika 2. Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata (Vgz) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata na mestu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u WT-I u poređenju sa KO-I. Za statističku analizu podataka korišćen je Studentov t-test;  $p < 0,05$ ; § u odnosu na WT-I; WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).

#### **4.2.2 Volumenska gustina nekrotičnih ćelija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Volumenska gustina nekrotičnih ćelija ( $V_{gn}$ ) na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) bila je manja u odnosu na  $V_{gn}$  u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I), ali ta razlika nije bila statistički značajna (slika 3) (Stankovic i sar., 2016a).

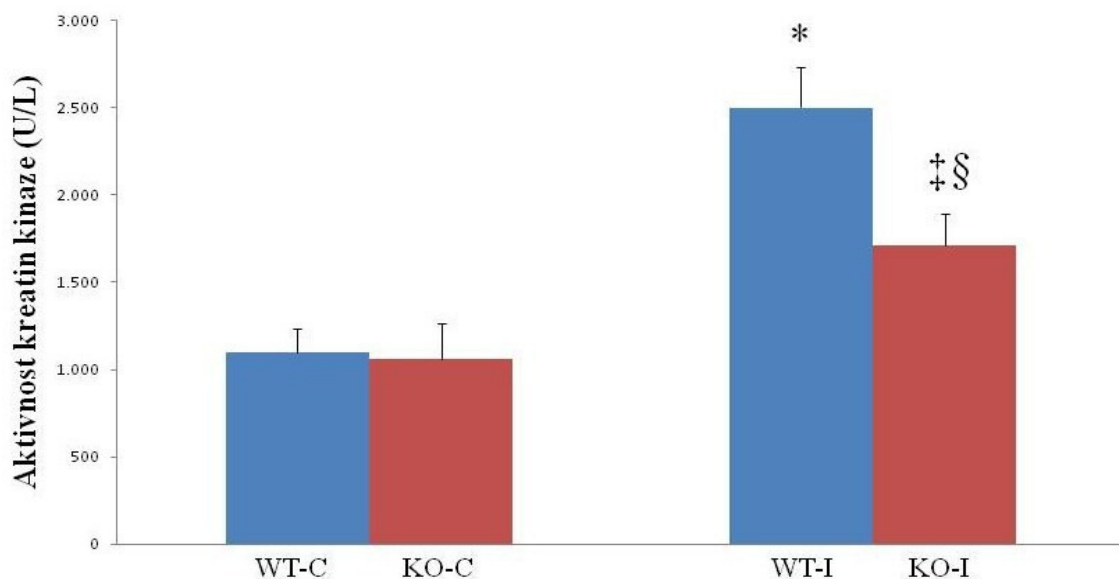


Slika 3. Volumenska gustina nekrotičnih ćelija (Vgn) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti volumenskih gustina nekrotičnih ćelija u WT-I i KO-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Mann-Whitney-Wilcoxon testom; WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje; n = 8), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje; n = 8).

### **4.3 Aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

#### **4.3.1 Aktivnost kreatin kinaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

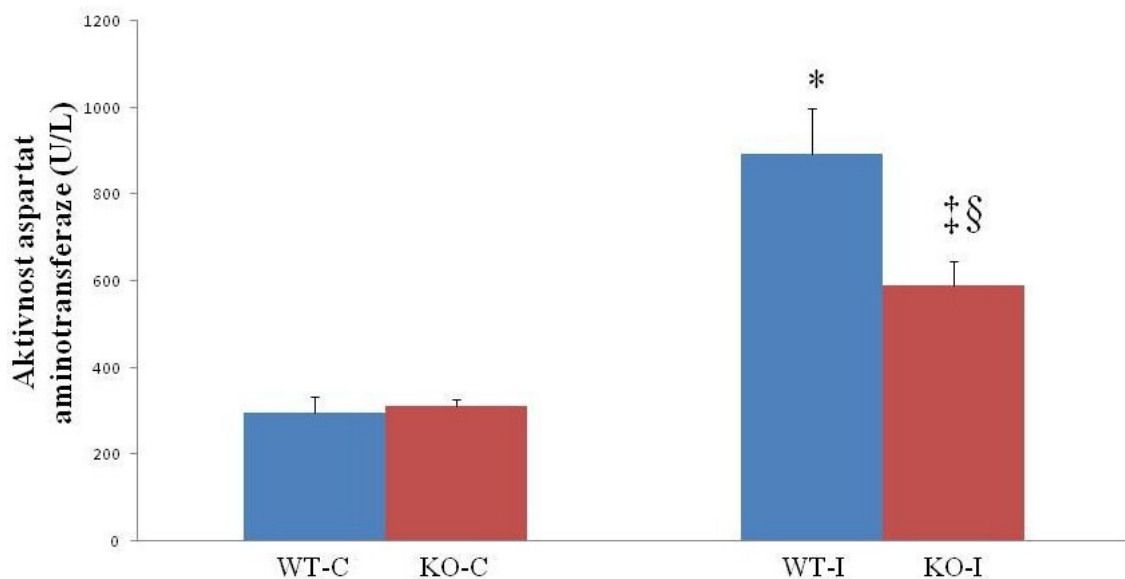
Aktivnost kreatin kinaze (*engl.* creatine kinase, CK) u serumu bila je statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Takođe, aktivnost kreatin kinaze u serumu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Međutim, kada su upoređene aktivnosti kreatin kinaze obe zapaljenjske grupe, utvrđeno je da je aktivnost enzima bila statistički značajno veća u WT-I nego u KO-I (slika 4) (Stankovic i sar., 2016a).



Slika 4. Aktivnost kreatin kinaze (*engl.* creatine kinase, CK) u serumu genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Aktivnost CK u serumu je bila značajno veća u WT-I i KO-I, u poređenju s odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Aktivnost CK je bila značajno veća u WT-I nego u KO-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Studentovim t-testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 8$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 8$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).

### 4.3.2 Aktivnost aspartat aminotransferaze u serumu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Aktivnost aspartat aminotransferaze (*engl.* aspartate aminotransferase, AST) u serumu je bila izmenjena slično kao i aktivnost kreatin kinaze. Naime, aktivnost aspartat aminotransferaze u serumu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u poređenju s kontrolnom grupom ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Takođe, aktivnost enzima u serumu je bila statistički značajno veća u WT-I nego u KO-I (slika 5) (Stankovic i sar., 2016a).



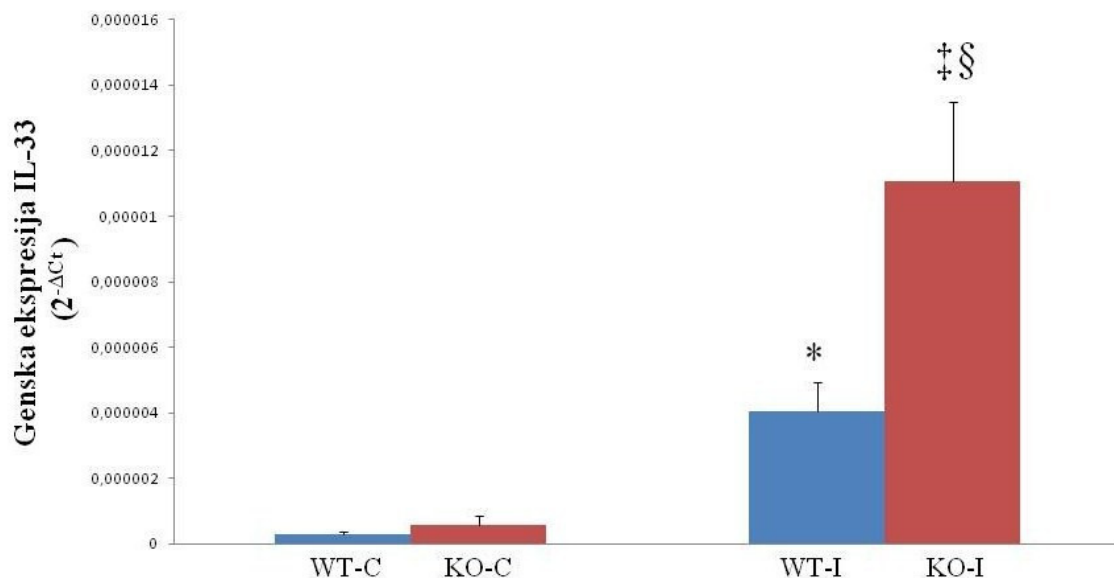
Slika 5. Aktivnost aspartat aminotransferaze (*engl.* aspartate aminotransferase, AST) u serumu genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Aktivnost AST u serumu je bila statistički značajno veća u obe zapaljenjske grupe WT-I i KO-I, u odnosu na njihovu odgovarajuću kontrolnu grupu, WT-C i KO-C. Aktivnost AST u serumu je bila statistički značajno veća u WT-I nego u KO-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Studentovim t-testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 8$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 8$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).

#### **4.4 Analiza genske ekspresije citokina i ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

##### **4.4.1 Analiza genske ekspresije interleukina-33 na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Genska ekspresija interleukina-33 na mestu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Međutim, genska ekspresija interleukina-33 na mestu akutnog zapaljenja bila je statistički značajno veća u KO-I nego u WT-I (slika 6) (Stankovic i sar., 2016a).

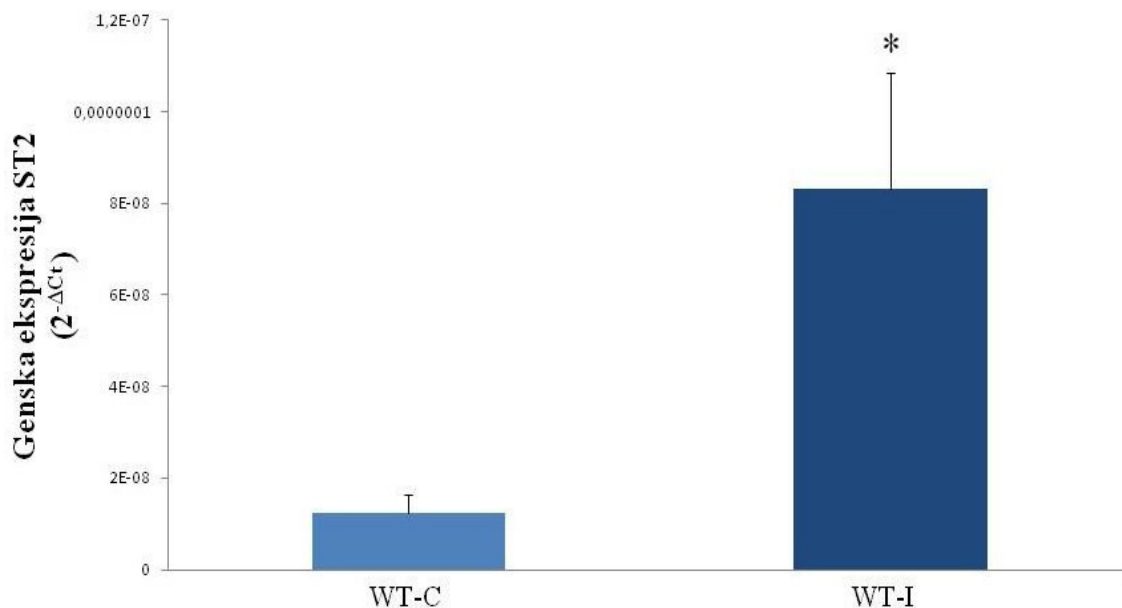




Slika 6. Genska ekspresija interleukina-33 (IL-33) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Genska ekspresija IL-33 na mestu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u WT-I i KO-I, u poređenju s odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Međutim, genska ekspresija IL-33 je bila statistički značajno veća u KO-I u odnosu na WT-I. Za statističku analizu podataka korišćen je Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 5$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 5$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ).

#### **4.4.2 Analiza genske ekspresije ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Genska ekspresija ST2 receptora u tretiranom tkivu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Genska ekspresija u kontrolnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) i eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) nije detektovana, s obzirom na to da ove životinje nisu imale ST2 gen (slika 7) (Stankovic i sar., 2016a).



Slika 7. Genska ekspresija ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Genska ekspresija ST2 receptora u tretiranom tkivu je bila statistički značajno veća u WT-I nego u WT-C. Statistička značajnost razlike je ispitana Mann-Whitney-Wilcoxon testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 5$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ).

#### 4.4.3 Analiza genske ekspresije faktora nekroze tumora-alfa, interleukina-6 i interleukina-12p35 na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Genska ekspresija faktora nekroze tumora-alfa (*engl.* tumor necrosis factor-alfa, TNF-alfa), interleukina-6 (IL-6) i interleukina-12p35 (IL-12p35) na mestu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje

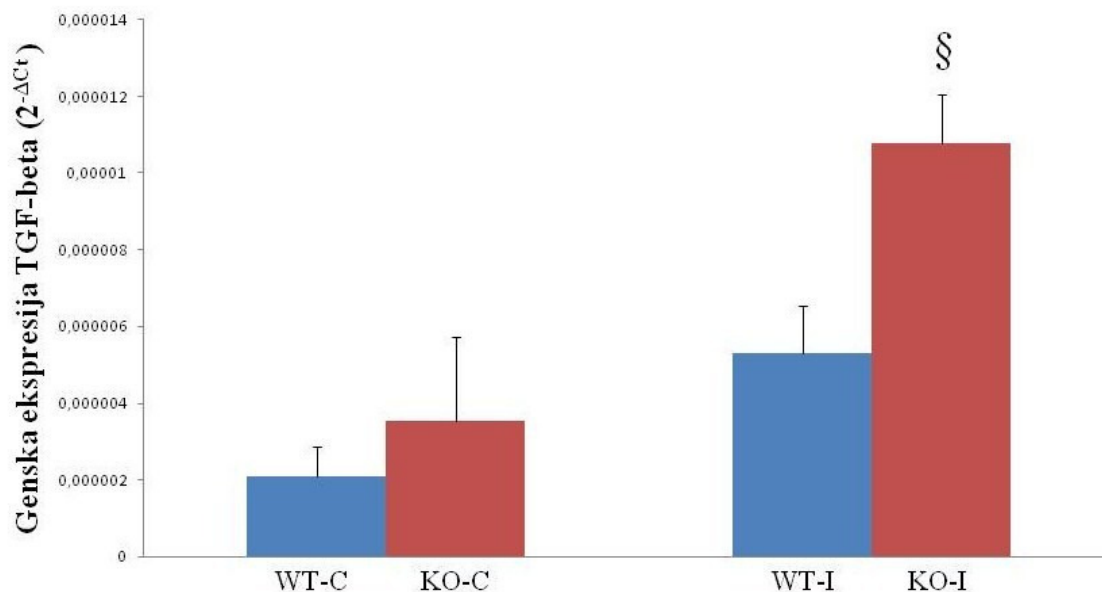
(WT-I) u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Takođe, genska ekspresija TNF-alfa, IL-6 i IL12p35 je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C), kao i genska ekspresija IL-6 u KO-C u odnosu na WT-C (tabela 1) (Stankovic i sar., 2016a).

Tabela 1. Genska ekspresija faktora nekroze tumora-alfa (*engl.* tumor necrosis factor-alpha, TNF-alfa), interleukina-6 (IL-6) i interleukina-12p35 (IL-12p35) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Za procenu statističke značajnosti razlike je korišćen Mann-Whitney-Wilcoxon testa;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 5$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 5$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ).

Geni \ Grupe	Grupe			
	WT-C	KO-C	WT-I	KO-I
TNF-alfa	$1,56 \times 10^{-7} \pm 1,12 \times 10^{-7}$	$8,84 \times 10^{-8} \pm 1,08 \times 10^{-8}$	$6,42 \times 10^{-7} \pm 9,72 \times 10^{-8}$ *	$1,26 \times 10^{-6} \pm 3,23 \times 10^{-7}$ ‡
IL-6	$9,83 \times 10^{-9} \pm 2,95 \times 10^{-9}$	$1,72 \times 10^{-6} \pm 1,04 \times 10^{-6}$ *	$1,05 \times 10^{-5} \pm 3,66 \times 10^{-6}$ *	$1,28 \times 10^{-5} \pm 2,52 \times 10^{-6}$ ‡
IL-12p35	$1,66 \times 10^{-7} \pm 1,4 \times 10^{-7}$	$6,58 \times 10^{-8} \pm 4,4 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-6} \pm 3,81 \times 10^{-7}$ *	$1,17 \times 10^{-6} \pm 2,23 \times 10^{-7}$ ‡

#### **4.4.4 Analiza genske ekspresije faktora transformacije rasta-beta na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Genska ekspresija faktora transformacije rasta-beta (*engl.* transforming growth factor beta, TGF-beta) na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na eksperimentalnu grupu genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I), dok nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne grupe genetski neizmenjenih miševa (WT-C) i kontrolne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 8) (Stankovic i sar., 2016a).

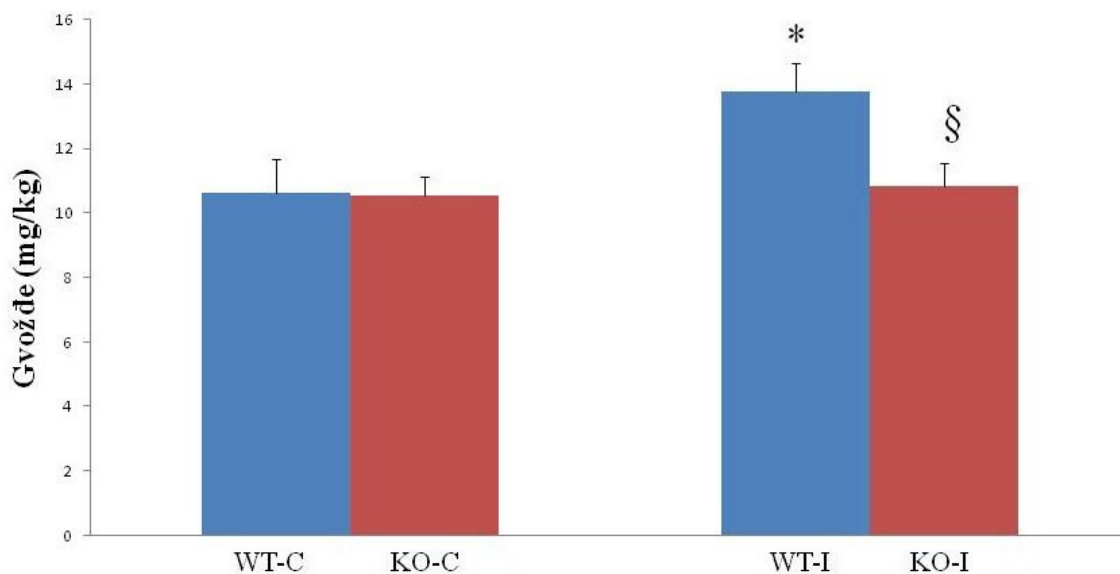


Slika 8. Genska ekspresija faktora transformacije rasta-beta (eng. transforming growth factor beta, TGF-beta) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Genska ekspresija TGF-beta je bila statistički značajno veća u KO-I u poređenju sa WT-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Mann-Whitney-Wilcoxon testom;  $p < 0,05$ ; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 5$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 5$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 5$ ).

## **4.5 Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja i hematološki parametri krvi i slezine u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

### **4.5.1 Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Koncentracija gvožđa u tretiranom tkivu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u odnosu na eksperimentalnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike između koncentracija gvožđa u tretiranom tkivu u kontrolnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) i KO-I (slika 9) (Stankovic i sar., 2015).

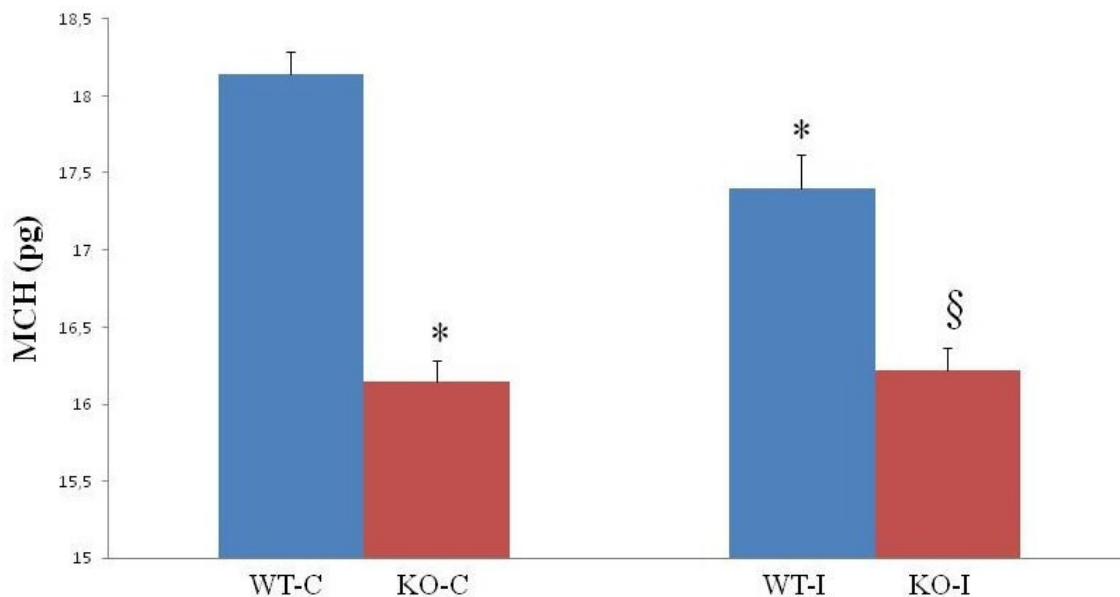


Slika 9. Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Koncentracija gvožđa u tretiranom tkivu je bila statistički značajno veća u WT-I, u odnosu na WT-C i KO-I. Za statističku analizu podataka korišćen je Studentov t-test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 8$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).



#### 4.5.2 Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

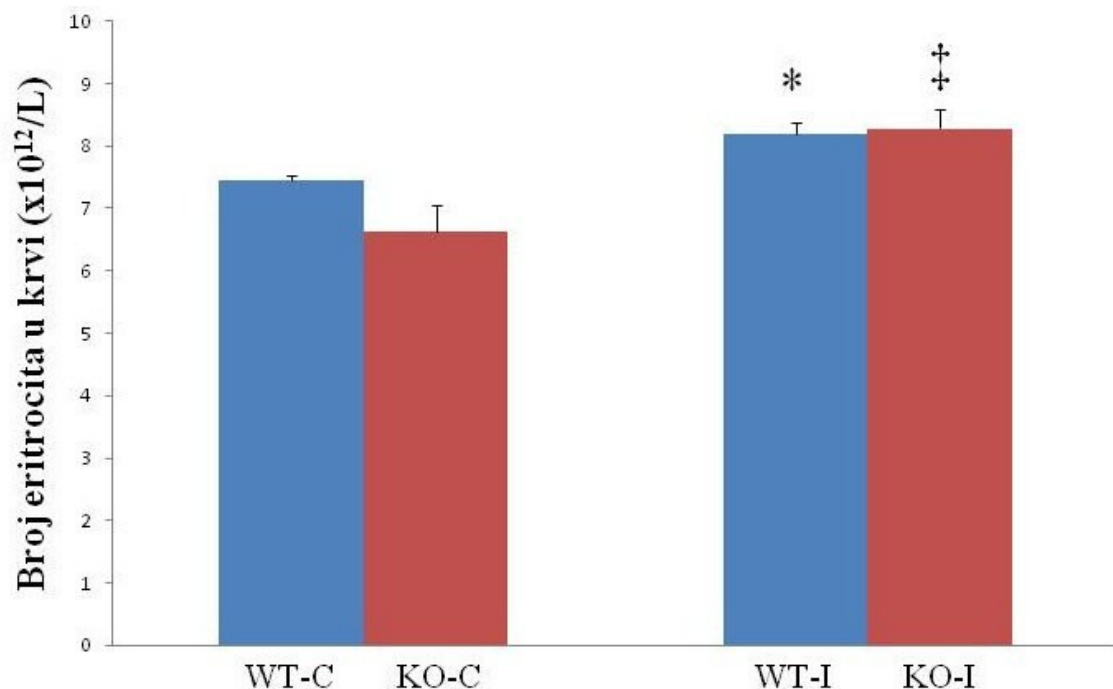
Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (*engl.* mean corpuscular hemoglobin, MCH) bila je statistički značajno smanjena u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), pri čemu nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne grupe ST2-/- miševa (KO-C) i eksperimentalne grupe ST2-/- miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I). Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu je bila značajno manja u KO-I u poređenju sa WT-I. U KO-C prosečna količina hemoglobina u eritrocitu je bila značajno manja nego u WT-C (slika 10) (Stankovic i sar., 2015).



Slika 10. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (*engl.* mean corpuscular hemoglobin, MCH) genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu je bila statistički značajno manja u WT-I u odnosu na WT-C, dok nije bilo statistički značajne razlike između KO-C i KO-I. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu je bila značajno manja u KO-I u odnosu na WT-I, i u KO-C u odnosu na WT-C. Statistička značajnost razlike je utvrđena Mann-Whitney-Wilcoxon testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### 4.5.3 Broj eritrocita u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

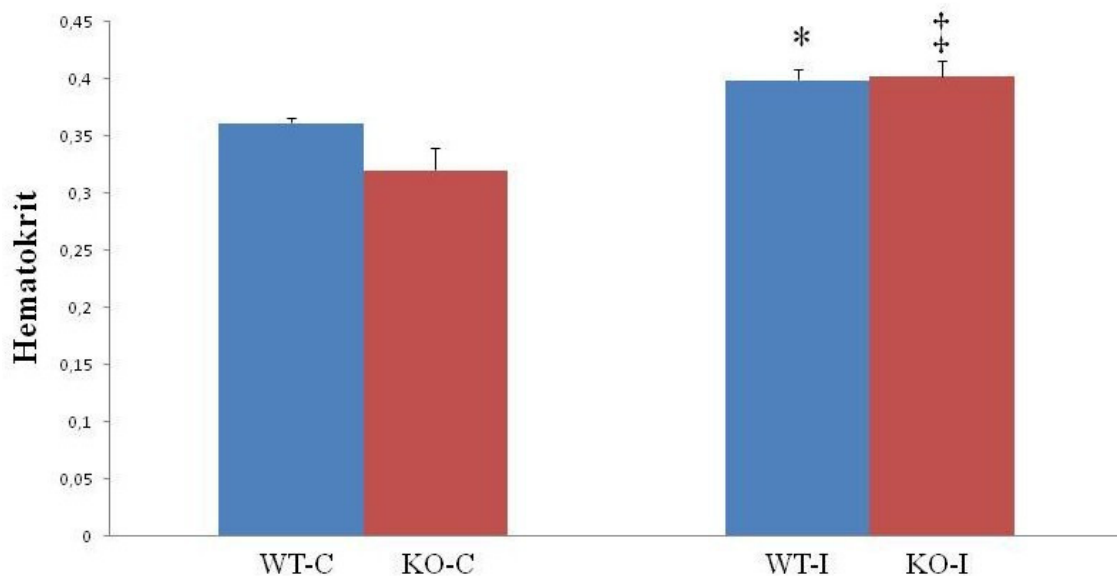
Broj eritrocita u krvi je bio statistički značajno veći u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Takođe, broj eritrocita je bio statistički značajno veći u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 11) (Stankovic i sar., 2015).



Slika 11. Broj eritrocita u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Broj eritrocita u krvi je bio statistički značajno veći u WT-I i KO-I, u poređenju sa njihovom odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Statistička značajnost razlike je utvrđena Studentovim t-testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### 4.5.4 Hematokrit u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

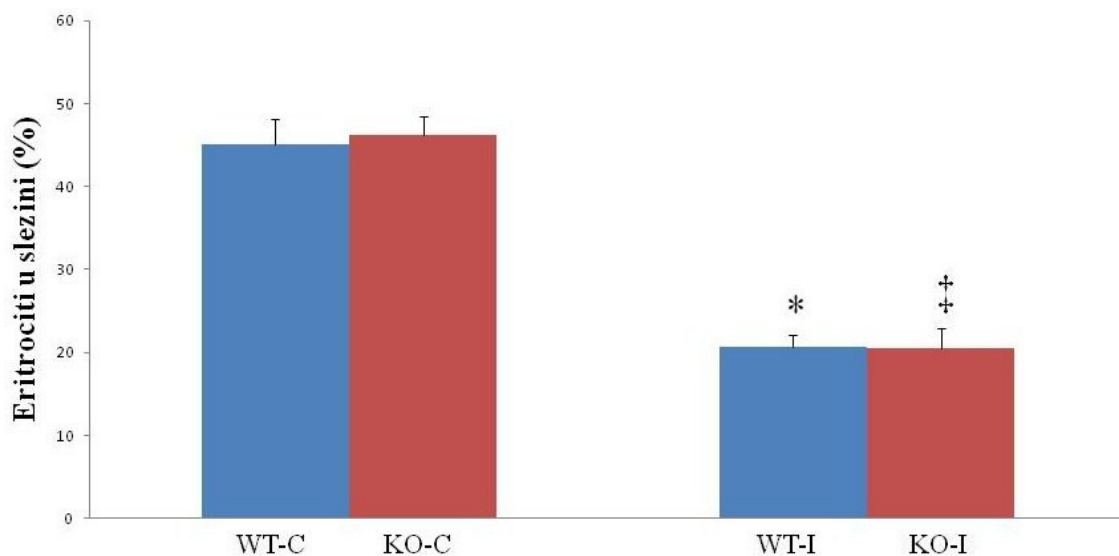
Hematokrit je bio statistički značajno veći u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 12) (Stankovic i sar., 2015).



Slika 12. Hematokrit genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Hematokrit je bio statistički značajno veći u u WT-I i KO-I, u odnosu na njihovu odgovarajuću kontrolnu grupu, WT-C i KO-C. Za statističku analizu podataka korišćen je Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### 4.5.5 Eritrociti u slezini u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Procenat eritrocita u slezini je bio statistički značajno manji u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 13) (Stankovic i sar., 2015).

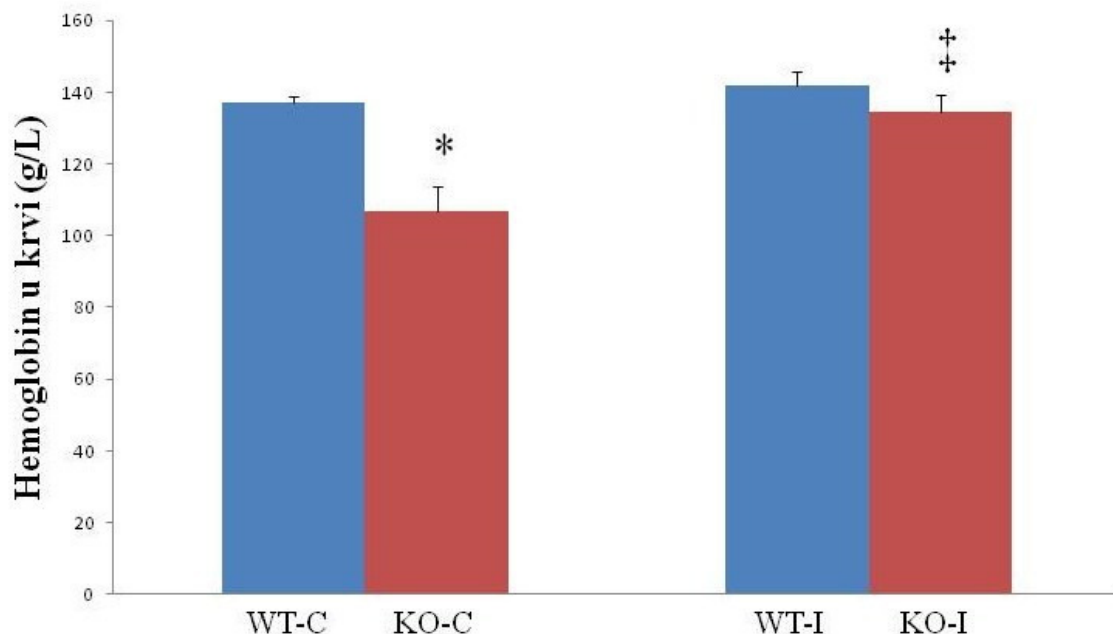


Slika 13. Procenat eritrocita u slezini genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Procenat eritrocita u slezini je bio statistički značajno manji u WT-I u poređenju sa WT-C, i u KO-I u poređenju sa KO-C. Za statističku analizu podataka je korišćen Studentov t-test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 10$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 10$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).



#### **4.5.6 Koncentracija hemoglobina u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

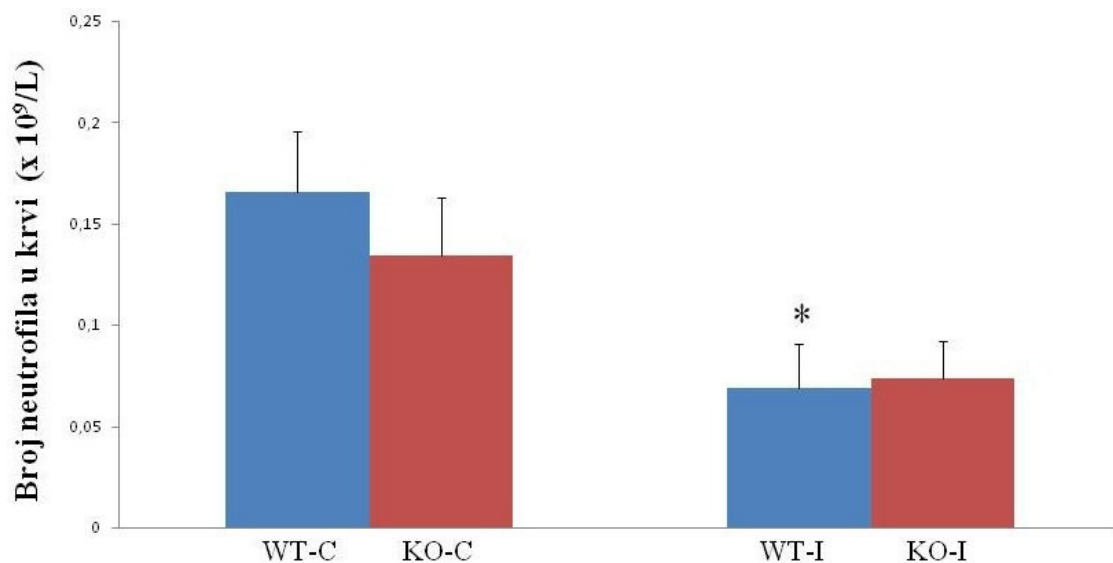
Koncentracija hemoglobina u krvi je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). U KO-C koncentracija hemoglobina u krvi je bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Nije bilo statistički značajne razlike između koncentracija hemoglobina u krvi u WT-C i eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) (slika 14) (Stankovic i sar., 2015).



Slika 14. Koncentracija hemoglobina u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Koncentracija hemoglobina u krvi je bila statistički značajno veća u KO-I u poređenju sa KO-C. Koncentracija hemoglobina je bila statistički značajno manja u KO-C u odnosu na WT-C. Statistička značajnost razlike je testirana Mann-Whitney-Wilcoxon testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### 4.5.7 Broj neutrofila u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

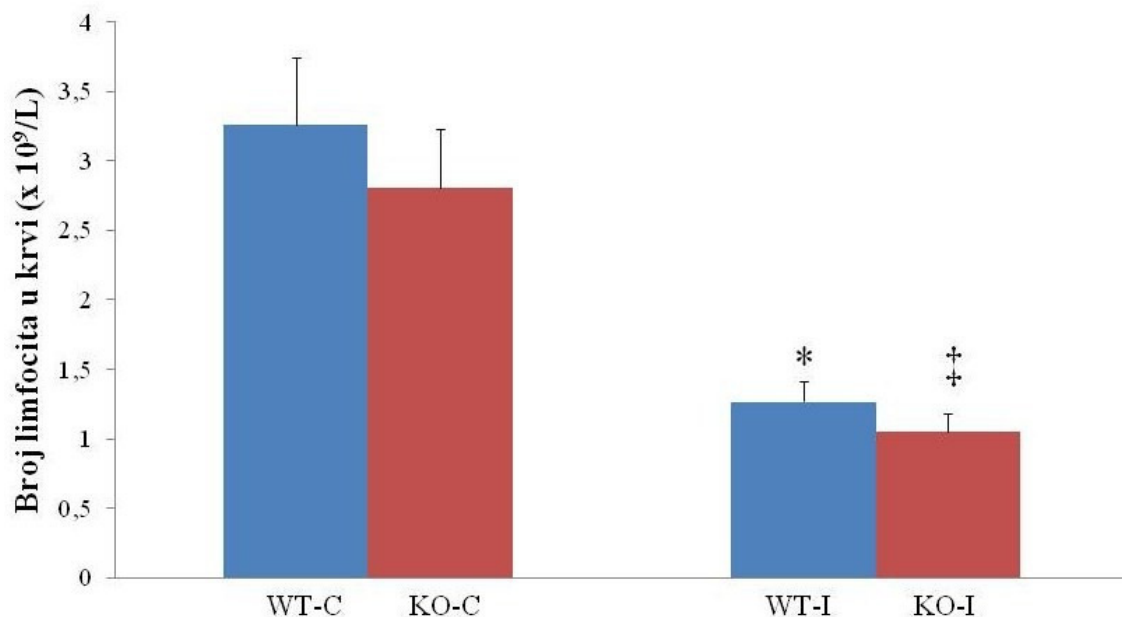
Broj neutrofila u krvi je bio statistički značajno manji u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Broj neutrofila u krvi u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) je bio manji u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C), ali ta razlika nije bila statistički značajna, kao i razlika između WT-C i KO-C (slika 15) (Stankovic i sar., 2015).



Slika 15. Broj neutrofila u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Broj neutrofila u krvi je bio statistički značajno manji u WT-I u odnosu na WT-C, dok je broj neutrofila u krvi bio manji u grupi KO-I u odnosu na KO-C, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Za statističku analizu podataka korišćen je Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### 4.5.8 Broj limfocita u krvi u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Broj limfocita u krvi je bio statistički značajno manji u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 16) (Stankovic i sar., 2015).

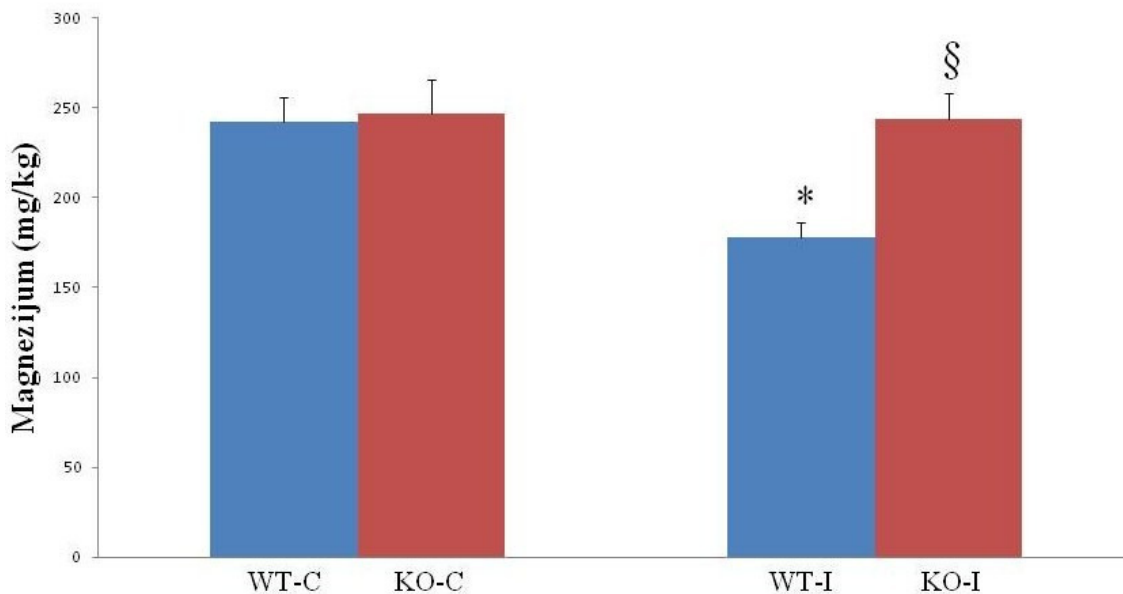


Slika 16. Broj limfocita u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Broj limfocita u krvi je bio statistički značajno manji u WT-I i KO-I, u poređenju s odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Za statističku analizu podataka je korišćen Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 7$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 7$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 10$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### **4.6 Koncentracija magnezijuma, kalijuma, bakra, mangana i seleno na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

##### **4.6.1 Koncentracija magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Koncentracija magnezijuma u tretiranom tkivu bila je statistički značajno manja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u odnosu na eksperimentalnu grupu ST2-/- miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I). Koncentracija magnezijuma se nije statistički značajno razlikovala između kontrolne grupe ST2-/- miševa (KO-C) i KO-I (slika 17) (Stankovic i sar., 2016a).

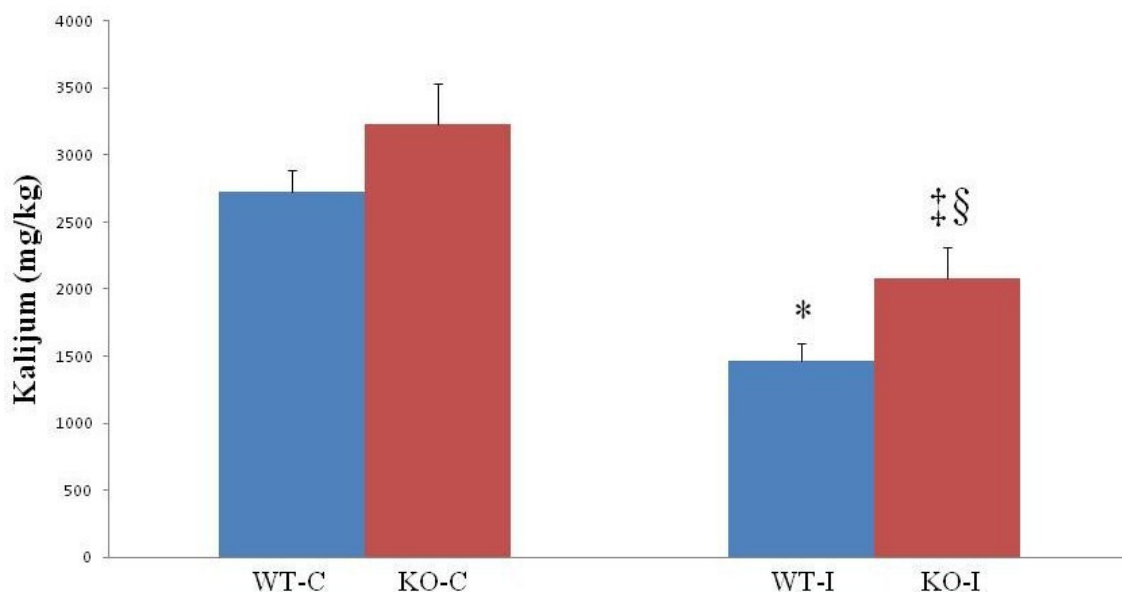


Slika 17. Koncentracija magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Koncentracija magnezijuma je bila statistički značajno manja u WT-I u odnosu na WT-C i KO-I, dok nije bilo značajne razlike između KO-C i KO-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 8$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).



#### **4.6.2 Koncentracija kalijuma na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Koncentracija kalijuma u tretiranom tkivu bila je statistički značajno manja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Dodatno, koncentracija kalijuma je bila statistički značajno manja u WT-I u poređenju sa KO-I (slika 18).



Slika 18. Koncentracija kalijuma na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Koncentracija kalijuma u tretiranom tkivu je bila statistički značajno manja u obe zapaljenjske grupe, WT-I i KO-I, u poređenju s odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Koncentracija kalijuma je bila značajno manja u WT-I u poređenju sa KO-I. Za statističku analizu podataka je korišćen Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 8$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### **4.6.3 Koncentracija bakra, mangana i selena na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

Koncentracija bakra, mangana i selena u tretiranom tkivu se nije statistički značajno razlikovala između kontrolne grupe genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kontrolne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C), eksperimentalne grupe genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) i eksperimentalne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) (tabela 2) (Stankovic i sar., 2016a).

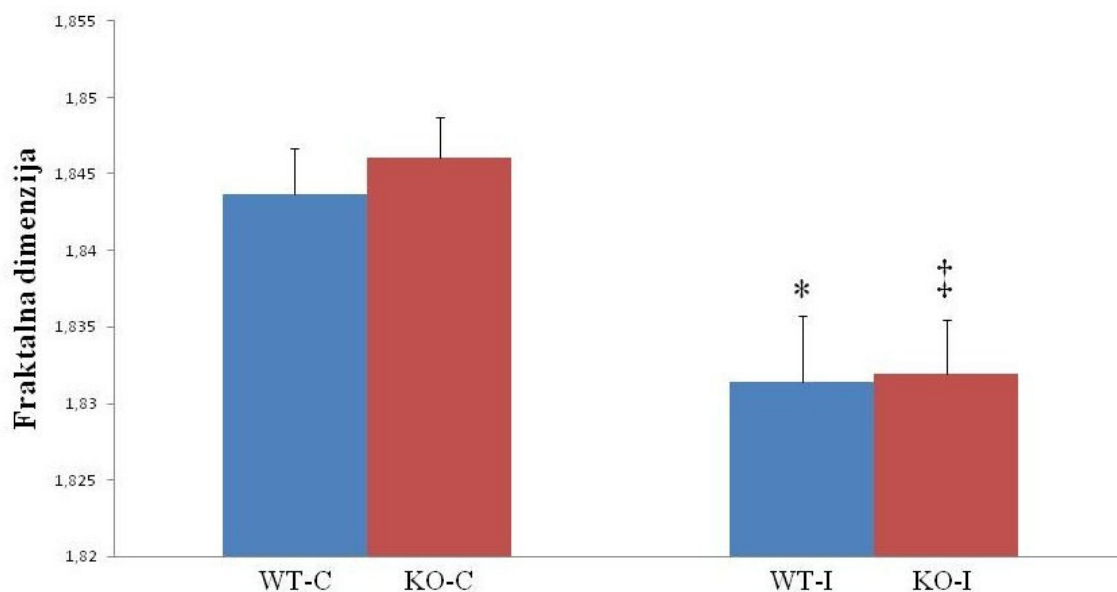
Tabela 2. Koncentracija bakra, mangana i selena na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Koncentracija bakra, mangana i selena se nije statistički značajno razlikovala između WT-C, KO-C, WT-I i KO-I. Statistička značajnost razlike je utvrđena Mann-Whitney-Wilcoxon testom; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa; n = 8), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa; n = 9), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje; n = 8), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje; n = 9).

Elementi	Grupe			
	WT-C	KO-C	WT-I	KO-I
Bakar (mg/kg)	0,893 ± 0,091	0,814 ± 0,130	1,016 ± 0,157	1,219 ± 0,188
Mangan (mg/kg)	0,127 ± 0,032	0,207 ± 0,033	0,174 ± 0,028	0,149 ± 0,019
Selen (mg/kg)	0,189 ± 0,060	0,219 ± 0,064	0,182 ± 0,062	0,373 ± 0,102

## **4.7 Fraktalna i teksturalna analiza u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

### **4.7.1 Fraktalna dimenzija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

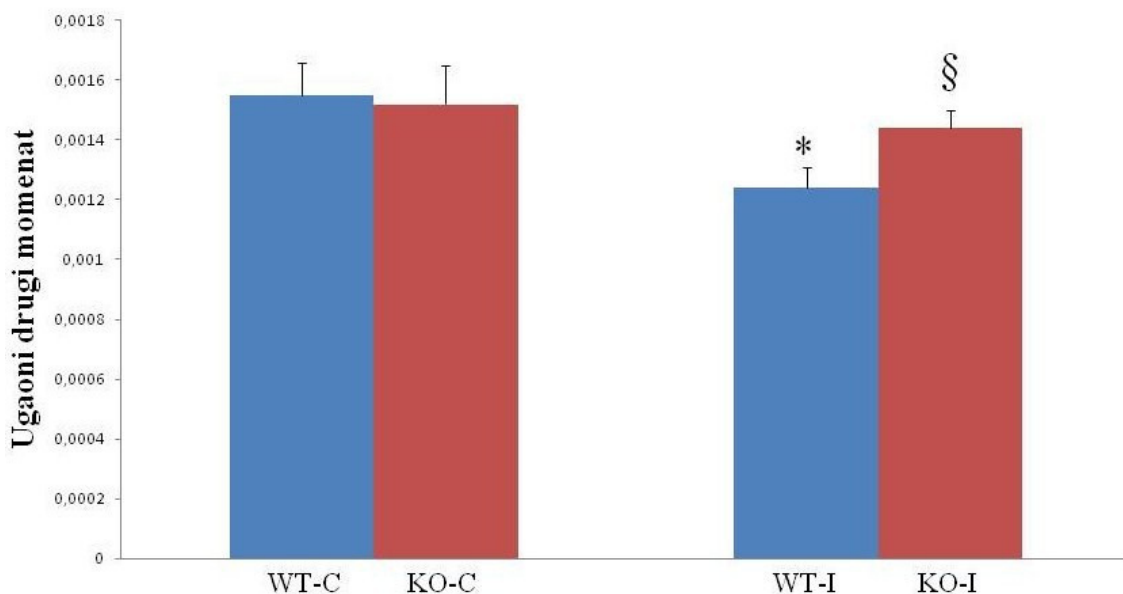
Fraktalna dimenzija tretiranog tkiva je bila statistički značajno manja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) (slika 19) (Stankovic i sar., 2016b).



Slika 19. Fraktalna dimenzija upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Fraktalna dimenzija tretiranog tkiva je bila statistički značajno manja u WT-I i KO-I, u poređenju s odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Statistička značajnost razlike je utvrđena Studentovim t-testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; ‡ u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 8$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).

#### 4.7.2 Ugaoni drugi momenat u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Ugaoni drugi momenat tretiranog tkiva je bio statistički značajno manji u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u odnosu na eksperimentalnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I). Nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti ugaonog drugog momenta u kontrolnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) i KO-I (slika 20) (Stankovic i sar., 2016b).

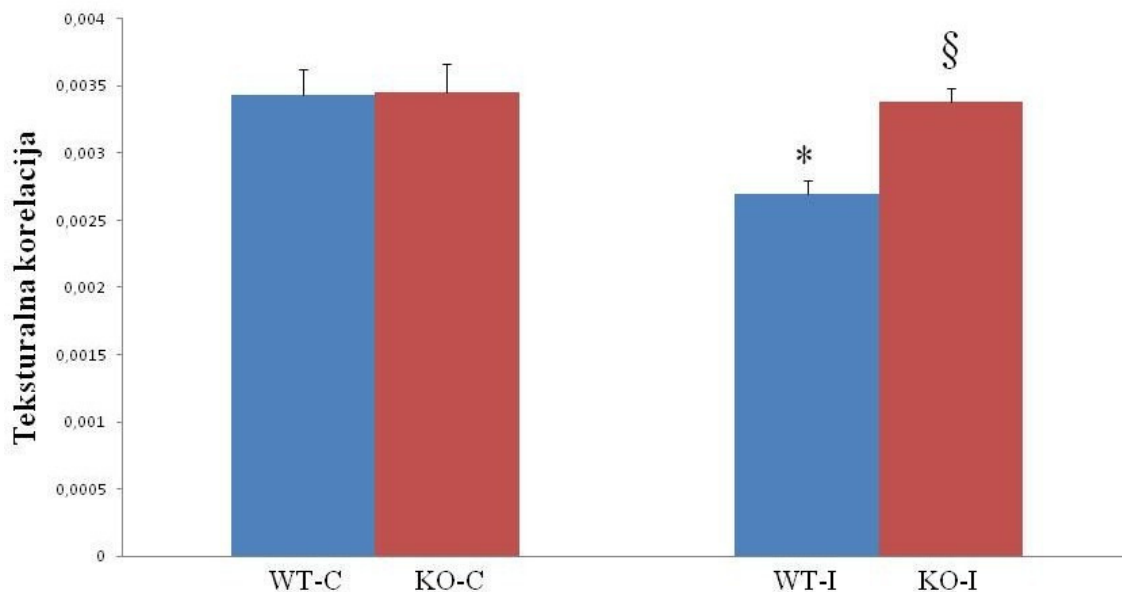


Slika 20. Ugaoni drugi momenat upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Ugaoni drugi momenat tretiranog tkiva je bio statistički značajno manji u WT-I u odnosu na WT-C i KO-I, dok nije bilo značajne razlike između KO-C i KO-I. Za utvrđivanje statističke značajnosti razlika korišćen je Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 8$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).



#### 4.7.3 Teksturalna korelacija u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Teksturalna korelacija je bila statistički značajno manja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa (WT-C) i eksperimentalnom grupom ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I). Vrednosti teksturalne korelacije se nisu statistički značajno razlikovale između kontrolne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C) i KO-I (slika 21) (Stankovic i sar., 2016b).

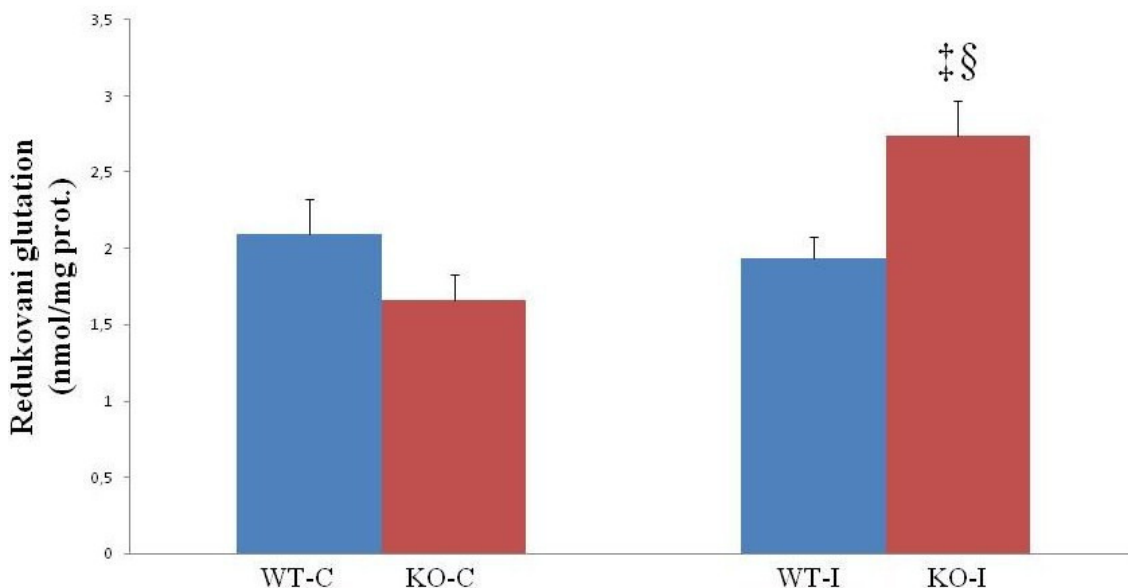


Slika 21. Teksturalna korelacija upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Teksturalna korelacija tretiranog tkiva je bila statistički značajno manja u WT-I u poređenju sa WT-C i KO-I. Nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti teksturalne korelacije u KO-C i KO-I. Statistička analiza podataka je urađena pomoću Mann-Whitney-Wilcoxon testa;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 8$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 8$ ).

#### **4.8 Sadržaj redukovanog glutationa, aktivnosti superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

##### **4.8.1 Sadržaj redukovanog glutationa na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

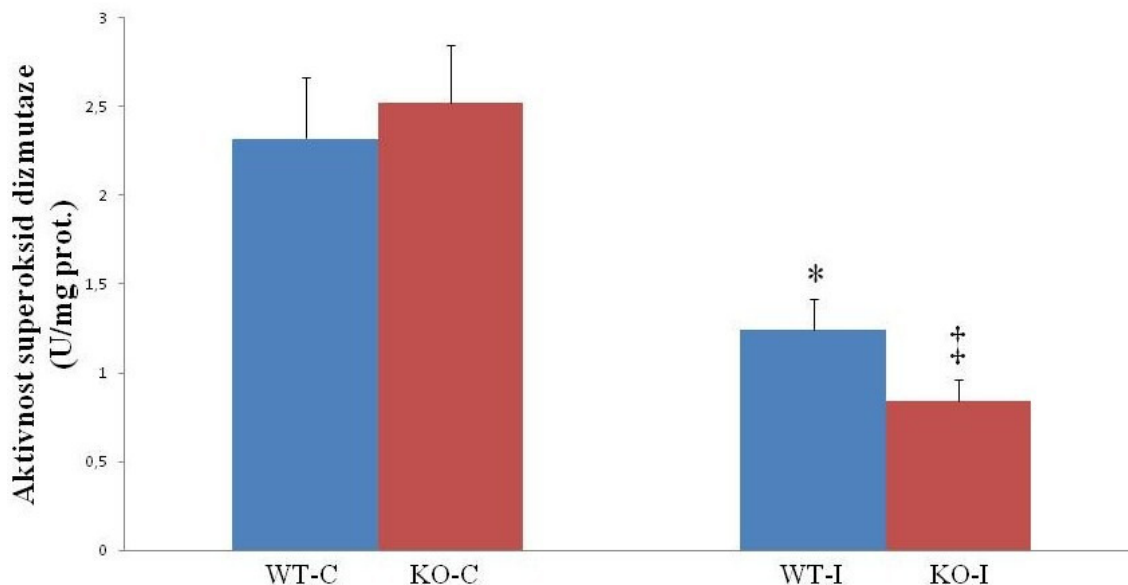
Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) u tretiranom tkivu je bio statistički značajno veći u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na eksperimentalnu grupu genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I), kao i u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti sadržaja redukovanog glutationa u kontrolnoj grupi genetski neizmenjenih miševa (WT-C) i WT-I (slika 22) (Stankovic i sar., 2016a).



Slika 22. Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) na mestu zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. GSH je bio statistički značajno veći u KO-I u odnosu na KO-C i WT-I. Nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti GSH u WT-C i WT-I. Za statističku analizu podataka je korišćen Studentov t- test;  $p < 0,05$ ; † u odnosu na KO-C; § u odnosu na WT-I; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

#### **4.8.2 Aktivnost superoksid dizmutaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja**

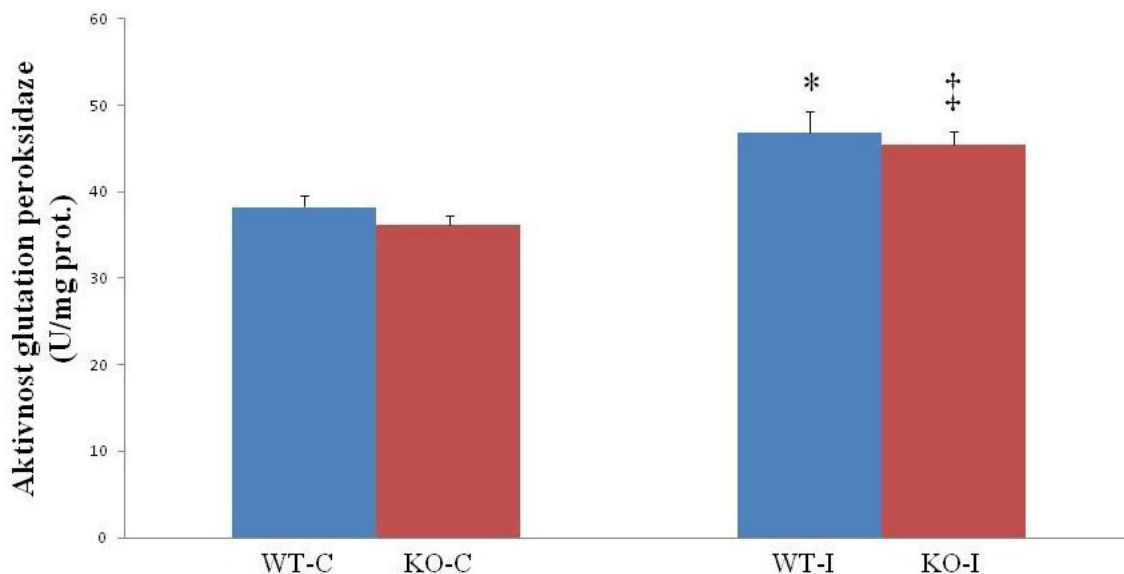
Aktivnost superoksid dizmutaze (*engl.* superoxide dismutase, SOD) u tretiranom tkivu je bila statistički značajno manja u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa (WT-C), kao i u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C). Aktivnost superoksid dizmutaze se nije statistički značajno razlikovala između WT-I i KO-I (slika 23) (Stankovic i sar., 2016a).



Slika 23. Aktivnost superoksid dizmutaze (*engl.* superoxide dismutase, SOD) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Aktivnost SOD je bila statistički značajno manja u obe inflamatorne grupe, WT-I i KO-I, u poređenju s njihovom odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Statistička značajnost razlike je ispitana Studentovim t- testom;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; † u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).

### 4.8.3 Aktivnost glutathion peroksidaze na mestu akutnog zapaljenja u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Aktivnost glutathion peroksidaze (*engl.* glutathione peroxidase, GPx) u tretiranom tkivu je bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (WT-I) u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa (WT-C). Aktivnost enzima je, takođe, bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje (KO-I) u odnosu na kontrolnu grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa (KO-C), dok nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti aktivnosti glutathion peroksidaze u WT-I i KO-I (slika 24) (Stankovic i sar., 2016a).



Slika 24. Aktivnost glutation peroksidaze (*engl.* glutathione peroxidase, GPx) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja. Aktivnost glutation peroksidaze je bila statistički značajno veća u obe zapaljenjske grupe, WT-I i KO-I, u poređenju s njihovom odgovarajućom kontrolnom grupom, WT-C i KO-C. Za ispitivanje statističke značajnosti razlike korišćen je Studentov t- test;  $p < 0,05$ ; \* u odnosu na WT-C; † u odnosu na KO-C; WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa;  $n = 9$ ), KO-C (kontrolna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa;  $n = 9$ ), WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ), KO-I (eksperimentalna grupa ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje;  $n = 9$ ).



## 5 DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da IL-33/ST2 osovina doprinosi intenzivnijem zapaljenju i oštećenju tkiva u akutnom zapaljenju, utičući na koncentraciju magnezijuma i gvožđa, sadržaj redukovano glutaciona i gensku ekspresiju TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja. Takođe, u akutnom zapaljenju povećava se genska ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora.

Akutno zapaljenje je izazvano kod genetski neizmenjenih BALB/c miševa (wild-type) i BALB/c miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2 knockout, ST2-/-) davanjem intramuskularne injekcije terpentinskog ulja životinjama u grupi WT-I (eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje) i KO-I (eksperimentalna grupa miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor kod kojih je izazvano akutno zapaljenje), dok su miševi u kontrolnim grupama [WT-C (kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa) i KO-C (kontrolna grupa miševa kojima je uklonjen ST2 gen)] bili tretirani na isti način fiziološkim rastvorom. Nakon 12 časova, životinje su uvedene u opštu anesteziju i sakupljeni su uzorci tretiranih mišića životinja u kontrolnim i eksperimentalnim grupama, uzorci slezine i krvi iz srca. U sakupljenim mišićima određena je genska ekspresija interleukina-33 (IL-33), ST2 receptora, TGF-beta, TNF-alfa, IL-6 i IL-12p35, koncentracija makro- i mikroelemenata (gvožđa, magnezijuma, kalijuma, bakra, mangana i selen) i antioksidativni parametri (sadržaj redukovano glutaciona i aktivnosti superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze). Takođe, urađena je histopatološka analiza mišića i određena je volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata, volumenska gustina nekrotičnih ćelija, fraktalna dimenzija, ugaoni drugi momenat i teksturalna korelacija. U sakupljenoj slezini je određen procenat eritrocita, u krvi broj eritrocita, neutrofila i limfocita, koncentracija hemoglobina, zatim prosečna količina hemoglobina u eritrocitu, i aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu.

Histopatološkom analizom tretiranog tkiva utvrđeno je postojanje zapaljenjskog infiltrata i nekrotičnih ćelija u obe zapaljenjske grupe, i kod genetski neizmenjenih miševa, i kod ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazivano zapaljenje (Stankovic i sar., 2016a; Stankovic i sar., 2015), dok je tretirano tkivo u kontrolnim grupama bilo očuvano i bez zapaljenjskog infiltrata, što je u skladu sa rezultatima drugih objavljenih studija (Sheikh i sar., 2006; Tron i sar., 2005). Daljom histopatološkom analizom je utvrđeno da je volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata (Vgz) na mestu akutnog zapaljenja bila značajno veća pri postojanju IL-33/ST2 osovine nego kod ST2<sup>-/-</sup> miševa, a nije utvrđena značajna razlika između volumenskih gustina nekrotičnih ćelija (Vgn) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i ST2<sup>-/-</sup> miševa. Analizirani su i pokazatelji nekroze mišićnih ćelija u serumu, tj. određene su aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu (Kaneko i sar., 2008). Osim toga što su aktivnosti enzima u serumu bile povećane u obe zapaljenjske grupe u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, značajno je istaći da su aktivnosti i kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze bile veće u serumu genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje nego u serumu ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje.

Navedeni rezultati pokazuju da IL-33/ST2 osovina doprinosi intenzivnijem zapaljenjskom odgovoru i oštećenju ćelija i tkiva u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2016a). Nakon intradermalne injekcije interleukina-33, dolazi do influksa leukocita u tkivo (Hueber i sar., 2011). Histološkom analizom u eksperimentalnom modelu reumatoidnog artritisa izazvanom kolagenom, nađena je intenzivnija infiltracija polimorfonuklearnim i mononuklearnim leukocitima kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na ST2<sup>-/-</sup> životinje (Xu i sar., 2008). Migracija neutrofila u reumatoidnom artritisu izazvanom metilisanim goveđim serumskim albuminom je zavisna od receptora za interleukin-33, tj. bila je veća kod genetski neizmenjenih miševa nego kod miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (Verri i sar., 2010).

Pretpostavljeno je da interleukin-33 ima direktno dejstvo na leukocite, ili da deluje na stvaranje hemokina i citokina. Takođe, pokazano je da interleukin-33 povećava propustljivost krvnih sudova delujući putem ST2 receptora (Choi i sar., 2009), a povećana propustljivost povećava prelazak leukocita iz krvi na mesto zapaljenja (Gotsch i sar., 1997; Wessel i sar., 2014). Rezultati doktorske teze o većoj volumenskoj gustini zapaljenjskog infiltrata na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih životinja pokazuju da IL-33/ST2 osovina ima ulogu u razvoju intenzivnijeg zapaljenjskog infiltrata i intenzivnijeg zapaljenjskog odgovora u akutnom zapaljenju. Akutno zapaljenje predstavlja rani, zaštitni odgovor na oštećenje. Međutim, u zapaljenjskom odgovoru može doći do dodatnog oštećenja tkiva, koje je u osnovi različitih poremećaja u organizmu (Mitchell i Cotran, 2003; Grossman i Porth, 2014). S tim u vezi, uočen intenzivniji zapaljenjski odgovor pri postojanju IL-33/ST2 osovine može imati za posledicu veće oštećenje tkiva i ćelija kod genetski neizmenjenih životinja, u odnosu na ST2<sup>-/-</sup> miševe u akutnom zapaljenju, koje je detektovano analizom aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu. Suprotno tome, određivanjem volumenske gustine nekrotičnih ćelija (Vgn) na mestu akutnog zapaljenja ta razlika nije utvrđena, iako je postojala tendencija da volumenska gustina nekrotičnih ćelija bude veća kod genetski neizmenjenih miševa nego kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. Objašnjenje za različite rezultate histopatološke metode i biohemijskih metoda kojima je određivan intenzitet oštećenja ćelija i tkiva može da bude dužina trajanja eksperimentalnog modela akutnog zapaljenja i osetljivost metode. Naime, ukoliko bi akutno zapaljenje trajalo duže od 12 časova, moguće je da razlika u intenzitetu oštećenja ćelija i tkiva ne bi bila detektovana samo primenjenim biohemijskim metodama, tj. određivanjem aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu već i histopatološkom metodom, odnosno određivanjem volumenske gustine nekrotičnih ćelija na mestu akutnog zapaljenja (Stankovic i sar., 2016a).

U predstavljenim istraživanjima određena je genska ekspresija interleukina-33 (IL-33), ST2 receptora, faktora nekroze tumora-alfa (TNF-alfa), interleukina-6 (IL-6), interleukina-12p35 (IL-12p35) i faktora transformacije rasta-beta (TGF-beta) sa ciljem ispitivanja efekata IL-33/ST2 osovine na promenu citokinskog profila u toku akutnog zapaljenja.

U akutnom zapaljenju došlo je do porasta genske ekspresije interleukina-33 u upaljenom tkivu i kod genetski neizmenjenih miševa i kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. Opisano je da se ekspresija interleukina-33 povećava u koži nakon mehaničkog i hemijskog oštećenja (Savinko i sar., 2012), kao i u endotoksičnom šoku izazvanom lipopolisaharidom (Pichery i sar., 2012). Treba istaći da je u istraživanju predstavljenom u doktorskoj tezi, genska ekspresija interleukina-33 bila veća na mestu akutnog zapaljenja kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. Moguće objašnjenje za ovaj nalaz je pozitivna povratna sprega usled nedostatka ST2 receptora (Stankovic i sar., 2016a). Pokazano je da je u eksperimentalnom modelu sepse veća koncentracija interleukina-33 kod miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor, nego kod genetski neizmenjenih miševa (Alves-Filho i sar., 2010), što je u skladu sa rezultatima predstavljenim u doktorskoj tezi (Stankovic i sar., 2016a). Pokazano je, takođe, da se već povećana genska ekspresija ST2 receptora u izmenjenoj koži pacijenata s atopijskim dermatitisom dodatno povećava jedan dan nakon izlaganja stafilokoknom enterotoksinu B (Savinko i sar., 2012). Genska ekspresija ST2 receptora u istraživanju predstavljenom u ovoj doktorskoj tezi bila je značajno veća na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa. Očekivano, genska ekspresija nije bila zabeležena kod ST2<sup>-/-</sup> životinja ni u kontrolnoj ni u zapaljenjskoj grupi, s obzirom na to da je ovim životinjama uklonjen gen za ST2 receptor. Zabeleženi porast genske ekspresije interleukina-33 i ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja ukazuje na značaj IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2016a). Genska ekspresija proinflamatornih citokina i subjedinice proinflamatornog

citokina, tj. faktora nekroze tumora-alfa, interleukina-6 i interleukina-12p35 (Abbas i sar., 2010; Trinchieri, 1995), bila je značajno povećana na mestu akutnog zapaljenja u obe zapaljenjske grupe, pri čemu IL-33/ST2 osovina nije imala uticaj na gensku ekspresiju ovih citokina na mestu akutnog zapaljenja. Ekspresija interleukina-6 bila je veća u grupi netretiranih ST2<sup>-/-</sup> životinja u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih životinja i nije bilo razlike između genetski neizmenjenih i ST2<sup>-/-</sup> životinja u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2016a). Faktor transformacije rasta-beta je antiinflamatorni citokin (Cekanaviciute i sar., 2014a). Genska ekspresija TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja bila je značajno veća kod ST2<sup>-/-</sup> miševa nego kod genetski neizmenjenih miševa. Ovaj nalaz povećane genske ekspresije antiinflamatornog citokina TGF-beta (Cekanaviciute i sar., 2014a) može doprineti razvoju blažeg akutnog zapaljenja i manjem oštećenju tkiva u odsustvu IL-33/ST2 osovine. Naime, TGF-beta smanjuje ekstravazaciju leukocita utičući na endotelne adhezivne molekule (Lefer i sar., 1993; Bitzer i sar., 2000; Gamble i Vadas, 1988), inhibiše prozapaljenjski transkripcioni faktor i ograničava imunski odgovor i tako prevenira tkivno oštećenje nakon infekcije (Cekanaviciute i sar., 2014a). Takođe, TGF-beta smanjuje zapaljenjski odgovor nakon moždanog udara (Cekanaviciute i sar., 2014b), neutrališe dejstva proinflamatornih citokina i učestvuje u obnavljanju tkiva nakon imunskog i zapaljenjskog odgovora (Abbas i sar., 2010). Opisano je da tretman anti-IL-33 antitelima povećava ekspresiju TGF-beta u kičmenoj moždini u eksperimentalnom modelu autoimunskog encefalomijelitisa izazvanom kod miševa i doprinosi razvoju blaže kliničke slike (Li i sar., 2012), dok je u istraživanju predstavljenom u ovoj doktorskoj tezi genska ekspresija TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja bila značajno veća kod ST2<sup>-/-</sup> miševa nego kod genetski neizmenjenih miševa. Ovi rezultati pokazuju da zapravo nedostatak IL-33/ST2 osovine dovodi do veće genske ekspresije antiinflamatornog citokina TGF-beta u upaljenom tkivu, što može imati za posledicu razvoj manje intenzivnog zapaljenjskog odgovora (Stankovic i sar., 2016a).

Hemoglobin se sastoji od globina i hema, a hem od porfirina i gvožđa. Održavanje homeostaze gvožđa je kompleksan proces u organizmu (Sukumaran i sar., 2012). U patogenezi zapaljenja, gvožđe ima posebno mesto, uzevši u obzir njegovu ulogu u oksidativnom stresu koji može dovesti do oštećenja ćelija i tkiva (Lagan i sar., 2008). Rezultati ove doktorske teze su pokazali da IL-33/ST2 osovina ima ulogu u promeni koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja (Stankovic i sar., 2015). Naime, koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja je značajno porasla kod genetski neizmenjenih životinja, dok nije bilo značajne razlike između kontrolne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa i ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano zapaljenje. Dodatno, koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja bila je značajno veća u zapaljenjskoj grupi genetski neizmenjenih miševa u odnosu na zapaljenjsku grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa. Suprotna promena je zabeležena kada je reč o prosečnoj količini hemoglobina u eritrocitu. Naime, ona je bila značajno manja kod genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano zapaljenje u odnosu na kontrolnu grupu genetski neizmenjenih miševa, a ista razlika nije uočena između kontrolne grupe ST2<sup>-/-</sup> miševa i ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano zapaljenje.

U akutnom zapaljenju, citokini i proteini akutne faze poput hepcidina, feritina i transferina (Sukumaran i sar., 2012; Lagan i sar., 2008; Malik i sar., 2011) imaju ulogu u regulaciju koncentracije gvožđa i mogu da dovedu do zadržavanja gvožđa u tkivima (D'Anna i sar., 2011; Darshan i sar., 2010). Takođe, zapaljenjske ćelije koje migriraju na mesto zapaljenja skladište gvožđe (Andersen i sar., 2014). Sve ove promene zajedno utiču na porast koncentracije gvožđa na mestu zapaljenja (Van Snick i sar., 1974; Andersen i sar., 2014). S tim u vezi, u različitim istraživanjima je potvrđeno da se koncentracija gvožđa povećava u upaljenim tkivima, npr. u sinovijalnom tkivu u reumatoidnom artritisu (Hider i Singh, 2012), u inflamatornim bolestima creva i u zapaljenju mozga (Andersen i sar., 2014). Porast koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa koji je detektovan u ovom istraživanju,

u skladu je sa prethodno citiranom literaturom (D'Anna i sar., 2011; Darshan i sar., 2010; Andersen i sar., 2014; Van Snick i sar., 1974; Hider i Singh, 2012). Međutim, rezultati ove doktorske teze ukazuju da zapravo IL-33/ST2 osovina ima ulogu u porastu koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja, budući da ovaj porast nije uočen kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. S obzirom na to da gvožđe usled oksidativnog stresa može dovesti do oštećenja tkiva i ćelija (Lagan i sar., 2008), a time i do intenzivnijeg zapaljenja, ova promena koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja može doprineti intenzivnijem zapaljenjskom odgovoru i oštećenju u prisustvu IL-33/ST2 osovine. Opisana je povezanost između koncentracije gvožđa i magnezijuma, odnosno da u nedostatku magnezijuma raste koncentracija gvožđa u jetri (Ishizaki i sar., 2011). U ovoj doktorskoj tezi je zabeležen porast koncentracije gvožđa i smanjenje koncentracije magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja. Sinteza hemoglobina zavisi od raspoloživosti gvožđa, otpočinje već na nivou eritroblasta i nastavlja se i tokom završnog sazrevanja retikulocita u eritrocite (Gaspard i Twite, 2005). U zapaljenju je manje gvožđa raspoloživo za sintezu hemoglobina (Nemeth i sar., 2004), kako zbog povećanog deponovanja gvožđa u tkivima (Darshan i sar., 2010), tako i zbog smanjenog oslobađanja gvožđa iz makrofaga i smanjene apsorpcije gvožđa iz gastrointestinalnog trakta (Roy, 2010). U skladu sa tim, u istraživanju u sklopu ove doktorske teze pokazano je da se prosečna količina hemoglobina u eritrocitu smanjuje u zapaljenju kod genetski neizmenjenih životinja, a ne menja se kod ST2<sup>-/-</sup> životinja u akutnom zapaljenju.

Rezultati koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja i prosečne količine hemoglobina u eritrocitu, po prvi put su pokazali da IL-33/ST2 osovina ima ulogu u homeostazi i redistribuciji gvožđa. Moguće je da IL-33/ST2 osovina direktno utiče na homeostazu gvožđa i/ili indirektno, tj. delujući na neke od proteina akutne faze koji imaju ulogu u metabolizmu gvožđa u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2015). Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu i ukupna koncentracija hemoglobina u krvi bile su manje u kontrolnoj



grupi ST2<sup>-/-</sup> miševa u poređenju s kontrolnom grupom genetski neizmenjenih miševa. Dodatno, koncentracija hemoglobina u krvi nije se značajno razlikovala između kontrolne i zapaljenjske grupe genetski neizmenjenih miševa, dok je kod ST2<sup>-/-</sup> životinja došlo do porasta koncentracije hemoglobina u krvi u akutnom zapaljenju. Broj eritrocita u krvi i hematokrit bili su povećani, dok je procenat eritrocita u slezini bio smanjen u akutnom zapaljenju i kod genetski neizmenjenih miševa i kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. Pokazano je da u stresu, i pri oslobađanju kateholamina, dolazi do porasta broja eritrocita u krvi usled kontrakcije slezine (Thornton i sar., 2001; Lai i sar., 2006). Uzevši u obzir da je zapaljenje stresno stanje, rezultati broja eritrocita u krvi, hematokrita i procenta eritrocita u slezini, koji su predstavljeni u ovoj doktorskoj tezi, u skladu su sa tim podacima (Thornton i sar., 2001; Lai i sar., 2006).

Uočeni porast koncentracije hemoglobina u krvi kod ST2<sup>-/-</sup> miševa u akutnom zapaljenju može da se objasni porastom broja eritrocita u krvi i neizmenjenom prosečnom količinom hemoglobina u eritrocitu u odnosu na kontrolnu grupu. Ukupna koncentracija hemoglobina u krvi je ostala nepromenjena kod genetski neizmenjenih miševa u akutnom zapaljenju, jer iako je broj eritrocita u krvi bio povećan kod genetski neizmenjenih miševa u akutnom zapaljenju, prosečna količina hemoglobina u eritrocitu je bila smanjena, što je za posledicu imalo neizmenjenu ukupnu koncentraciju hemoglobina u odnosu na kontrolnu grupu (Stankovic i sar., 2015).

Broj neutrofila u krvi je bio smanjen kod genetski neizmenjenih miševa u akutnom zapaljenju, dok kod ST2<sup>-/-</sup> miševa nije bilo značajne razlike uprkos postojanju tendencije pada broja neutrofila u krvi. Broj limfocita u krvi, koji su dominantna vrsta leukocita kod glodara (Russell i Bernstein, 1966), bio je smanjen u obe zapaljenjske grupe u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Dodatno, IL-33/ST2 osovina nije uticala na promenu broja neutrofila i limfocita u krvi. U zapaljenju može doći do pada broja leukocita u krvi usled masivne

migracije u oštećeno tkivo (Gaspard i Twite, 2005; Grossman i Porth, 2014), što je u skladu sa rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj tezi. IL-33/ST2 osovina doprinosi povećanoj migraciji neutrofila iz krvi u zglob (Verri i sar., 2010) i gušćoj infiltraciji zgloba polimorfonuklearnim i mononuklearnim leukocitima u eksperimentalnom modelu reumatoidnog artritisa (Xu i sar., 2008). U ovoj doktorskoj tezi pokazano je da je u prisistvu IL-33/ST2 osovine gušći zapaljenjski infiltrat na mestu akutnog zapaljenja (Stankovic i sar., 2016a). Iako su zabeleženi pad broja neutrofila u krvi kod genetski neizmenjenih miševa u akutnom zapaljenju i tendencija opadanja broja neutrofila u krvi kod ST2-/- miševa u akutnom zapaljenju, broj neutrofila se nije razlikovao između genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano zapaljenje i ST2-/- miševa kod kojih je izazvano zapaljenje. Ovaj rezultat može biti posledica povećanog prelaska neutrofila iz kostne srži u krv pod uticajem IL-33/ST2 osovine, s obzirom na to da je opisano da interleukin-33 pospešuje oslobađanje neutrofila iz kostne srži (Kim i sar., 2014). U slučaju da je eksperimentalni model akutnog zapaljenja trajao duže, moguće je da bi IL-33/ST2 osovina uticala na promenu broja neutrofila i limfocita u krvi u zapaljenju (Stankovic i sar., 2015).

Magnezijum je makroelement koga u organizmu ima najviše u kostima i mišićima, i koji ima ulogu u brojnim enzimskim reakcijama (Lau i Chan, 2013; Crook, 2012; Gropper i Smith, 2013). Koncentracija magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja u istraživanju predstavljenom u ovoj doktorskoj tezi bila je smanjena kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na njihovu kontrolnu grupu, a nije se značajno menjala kod ST2-/- miševa u akutnom zapaljenju. Dodatno, koncentracija magnezijuma u upaljenom tkivu bila je manja kod genetski neizmenjenih miševa nego u odsustvu IL-33/ST2 osovine. Ovi rezultati su po prvi put pokazali da IL-33/ST2 osovina ima ulogu u promeni koncentracije magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja (Stankovic i sar., 2016a). Opisana je obrnuta povezanost između koncentracije magnezijuma i intenziteta zapaljenja, koja nije u potpunosti razjašnjena. U stresnom stanju, kao

što je zapaljenje, smanjuje se koncentracija magnezijuma u ćeliji (Pongratz i Straub, 2014; Seelig i Rosanoff, 2003; Arsenian, 1993). Pri nedostatku magnezijuma zapaljenjski odgovor je intenzivniji (Mazur i sar., 2007), povećana je ekspresija adhezivnog molekula ICAM-1, leukocitna infiltracija (Scanlan i sar., 2007), aktivnost neutrofila i fagocita (Bussière i sar., 2002) i povećano se stvara histamin (Bois i sar., 1963). Magnezijum je i makroelement koji je neophodan za sintezu redukovanog glutaciona (Mills i sar., 1986), antioksidanta koji ima zaštitnu ulogu u zapaljenju (Murray i sar., 2009). Pri nedostatku magnezijuma smanjena je i antioksidativna zaštita (Weglicki, 2012). Uzevši u obzir navedene podatke, uočeno smanjenje magnezijuma u akutnom zapaljenju kod genetski neizmenjenih miševa, odnosno u prisustvu IL-33/ST2 osovine, može doprineti intenzivnijem zapaljenjskom odgovoru i ćelijskom oštećenju kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na ST2-/- miševе (Stankovic i sar., 2016a).

Bakar, selen i mangan su antioksidativni mikroelementi (Gropper i Smith, 2013; Coassin i sar., 1992). Njihova koncentracija na mestu akutnog zapaljenja se nije značajno menjala ni kod genetski neizmenjenih miševa, ni kod ST2-/- miševa. Dejstvo IL-33/ST2 osovine na promenu koncentracije bakra, selena i mangana na mestu akutnog zapaljenja do sada nije opisano, a rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj tezi pokazuju da IL-33/ST2 osovina ne utiče na promenu koncentracije bakra, selena i mangana u akutnom zapaljenju koje je trajalo 12 časova (Stankovic i sar., 2016a). Navodi se da se promene koncentracije bakra javljaju nešto kasnije u odnosu na promene koncentracije gvožđa u zapaljenju (Beisel, 1975), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske teze.

Kalijum je makroelement koji se uglavnom nalazi u ćelijama, i to najviše u mišićima (Grossman i Porth, 2014; Hoskote i sar., 2008; Giebisch, 1998). Koncentracija kalijuma na mestu akutnog zapaljenja bila je smanjena u obe

zapaljenjske grupe u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, ali je ipak bila manja kod genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje nego kod ST2<sup>-/-</sup> miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje. Kada se ćelija ošteti, dolazi do izlaska kalijuma iz ćelije i prelaska u vanćelijski prostor. Takođe, i u metaboličkoj acidozi kalijum izlazi iz ćelije (Grossman i Porth, 2014), a zatim se povećano odstranjuje putem bubrega (Crook, 2012). U ishemijskom oštećenju tkiva smanjuje se koncentracija kalijuma u tkivu. Stoga je predloženo da koncentracija kalijuma u tkivu može biti indikator oštećenja tkiva (Mituhashi i sar., 2003). S tim u vezi, manja koncentracija kalijuma na mestu zapaljenja kod genetski neizmenjenih životinja u odnosu na ST2<sup>-/-</sup> životinje, ukazuje na veći stepen oštećenja tkiva u prisustvu IL-33/ST2 osovine. Ovaj rezultat koncentracije kalijuma je u skladu sa rezultatima aktivnosti kreatin kinaze i aspartat aminotransferaze u serumu i nalazom intenzivnijeg zapaljenjskog odgovora, koji može dovesti do većeg oštećenja tkiva.

Fraktalna i teksturalna analiza su matematičke metode koje sve više nalaze primenu i u biomedicinskim istraživanjima (Dey i Banik, 2012; Rajagopalan i sar., 2013; Blumenkrantz i sar., 2008; Yang i sar., 2012).

Fraktalna dimenzija je indikator strukturalne kompleksnosti koji se može koristiti za određivanje tkivne kompleksnosti u različitim patološkim poremećajima (Dey i Banik, 2012; Rajagopalan i sar., 2013; Captur i sar. 2014; Manera i sar., 2014). Fraktalna dimenzija upaljenog tkiva značajno se smanjila i kod genetski neizmenjenih miševa i kod ST2<sup>-/-</sup> miševa u akutnom zapaljenju, u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe, pri čemu IL-33/ST2 osovina nije imala ulogu u tim promenama, jer nije uočena razlika između zapaljenjskih grupa. Pokazano je da se fraktalna dimenzija parotidnih žlezda smanjuje nakon radioterapije, što ukazuje na smanjenje tkivne organizacije i kompleksnosti (Scalco i sar., 2013). Takođe, smanjuju se fraktalna dimenzija i kompleksnost tkiva bele mase mozga u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi i demenciji

(Rajagopalan i sar., 2013), i pluća u starenju (Copley i sar., 2012). U skladu s tim, rezultatima ove doktorske teze po prvi put je pokazano da se fraktalna dimenzija može koristiti za kvantifikaciju strukturalnih promena u akutnom zapaljenju, kao i da se u akutnom zapaljenju fraktalna dimenzija upaljenog tkiva smanjuje, a samim tim i kompleksnost upaljenog tkiva (Stankovic i sar., 2016b).

Teksturalna analiza je još jedan matematički metod koji se može koristiti u biomedicinskim istraživanjima (Stankovic i sar., 2016b). U ovoj doktorskoj tezi je primenjena metoda matrice združenog pojavljivanja nivoa sivog [*engl.* grey level co-occurrence matrix (GLCM) metoda], odnosno određeni su njeni parametri, ugaoni drugi momenat i teksturalna korelacija.

Ugaoni drugi momenat je pokazatelj uniformnosti i homogenosti (Sharma i sar., 2008; Haralick i sar., 1973). Kod genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje, vrednost ugaonog drugog momenta upaljenog tkiva se smanjila u odnosu na kontrolnu grupu, a nije se značajno menjala kod ST2-/- miševa. Dodatno, ugaoni drugi momenat upaljenog tkiva bio je značajno manji kod genetski neizmenjenih miševa u odnosu na zapaljenjsku grupu ST2-/- miševa. Pokazano je da se usled oštećenja parotidne žlezde radijacijom smanjuje ugaoni drugi momenat, što ukazuje na smanjenu tkivnu uniformnost parotidne žlezde (Yang i sar., 2012). Ugaoni drugi momenat hrskavice T2 kod žena u postmenopauzi, koje imaju osteoartritis, bio je manji u odnosu na kontrolnu grupu, pa je predloženo korišćenje ugaonog drugog momenta u dijagnostici i diferencijaciji osteoartritične od zdrave hrskavice (Blumenkrantz i sar., 2008). Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj tezi po prvi put su pokazali da se ugaoni drugi momenat upaljenog tkiva smanjuje u akutnom zapaljenju i da bi mogao da se koristi za kvantifikaciju strukturalnih promena u akutnom zapaljenju (Stankovic i sar., 2016b). Uzevši u obzir da je ugaoni drugi momenat u akutnom zapaljenju bio manji kod genetski

neizmenjenih miševa u odnosu na ST2<sup>-/-</sup> miševe, takođe može da se zaključi da je IL-33/ST2 osovina doprinela razvoju intenzivnijih strukturalnih promena na mestu akutnog zapaljenja.

Teksturalna korelacija je pokazatelj postojanja i jačine linearne povezanosti između parova rezolucioničkih jedinica mikrografa (Stankovic i sar., 2016b; Sharma i sar., 2008; Haralick i sar., 1973), pri čemu manje vrednosti teksturalne korelacije ukazuju na iregularniju strukturu slike, dok veće vrednosti ukazuju na veću sličnost između delova slike (Mostaço-Guidolin i sar., 2013; Yang i sar., 2012; Stankovic i sar., 2016b). Teksturalna korelacija upaljenog tkiva kod ST2<sup>-/-</sup> životinja nije se značajno menjala u odnosu na njihovu kontrolu. Međutim, teksturalna korelacija upaljenog tkiva genetski neizmenjenih životinja bila je manja u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na zapaljenjsku grupu ST2<sup>-/-</sup> miševa. Opisano je da je korelacija parotidne žlezde smanjena nakon oštećenja radijacijom (Yang i sar., 2012). U skladu s tim, rezultati ove doktorske teze su pokazali da se na mestu akutnog zapaljenja smanjuje teksturalna korelacija, što ukazuje da je tkivna struktura iregularnija, kao i da bi teksturalna korelacija mogla da se koristi za kvantifikaciju strukturalnih promena akutno upaljenog tkiva. Dodatno, pokazano je i da IL-33/ST2 osovina ima ulogu u strukturalnim promenama u akutno upaljenom tkivu, tj. da doprinosi gubitku regularnosti strukture, s obzirom na to da značajna promena teksturalne korelacije koja je postojala kod genetski neizmenjenih životinja nije uočena i kod ST2<sup>-/-</sup> životinja.

Redukovani glutation (GSH) i aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) i superoksid dizmutaze (SOD), bitni su parametri antioksidativne zaštite ćelija i tkiva od oštećenja, koje se usled oksidativnog stresa javlja u zapaljenju (Lieberman i Marks, 2012).

U akutnom zapaljenju i kod genetski neizmenjenih miševa, i kod ST2<sup>-/-</sup> miševa, na mestu akutnog zapaljenja došlo je do porasta aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx), odnosno smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su opisali da u različitim zapaljenjskim stanjima nivo izoformi superoksid dizmutaze opada, dok aktivnost glutacion peroksidaze raste u zapaljenju (Li i Zhou, 2011; Ueda i sar., 2008; Chhetria i sar., 2011; Ismail i sar., 2012). Rezultati ove doktorske teze pokazuju da IL-33/ST2 osovina nema ulogu u promenama aktivnosti antioksidativnih enzima glutacion peroksidaze i superoksid dizmutaze na mestu akutnog zapaljenja (Stankovic i sar., 2016).

Redukovani glutation je značajan u reakciji uklanjanja vodonik-peroksida zajedno sa glutacion peroksidazom (Murray i sar., 2009). U slučaju kada je sadržaj redukovanog glutationa veći, biće i veći stepen antioksidativne zaštite (Ikegami i sar., 1994). Pored antioksidativne uloge, redukovani glutation utiče i na funkciju imunskih ćelija. Naime, pokazano je da postoji obrnuta povezanost između sadržaja redukovanog glutationa u makrofagima i rasta *Mycobacterium tuberculosis* kod pacijenata sa infekcijom virusom humane imunodeficijencije (*engl.* human immunodeficiency virus, HIV) (Morris i sar., 2013), kao i da redukovani glutation smanjuje ekspresiju adhezivnog molekula ICAM-1, što sprečava adheziju leukocita (Kevil i sar., 2004) i njihovu migraciju na mesto oštećenja (Grossman i Porth, 2014).

Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) na mestu zapaljenja se značajno povećao kod ST2<sup>-/-</sup> miševa u akutnom zapaljenju, dok se kod genetski neizmenjenih miševa nije menjao. Dodatno, sadržaj redukovanog glutationa bio je veći na mestu akutnog zapaljenja kod ST2<sup>-/-</sup> miševa nego u upaljenom tkivu genetski neizmenjenih miševa. Rezultati ove doktorske teze su po prvi put pokazali da je sadržaj redukovanog glutationa veći u odsustvu IL-33/ST2

osovine. Povećanim sadržajem redukovano $\gamma$  glutationa, povećavaju se antioksidativni zaštitni kapaciteti, što može doprineti razvoju blažeg zapaljenjskog odgovora u odsustvu IL-33/ST2 osovine (Stankovic i sar., 2016a). Moguće je da IL-33/ST2 osovina direktno utiče na sadržaj redukovano $\gamma$  glutationa ili indirektno, delujući na koncentraciju magnezijuma (Stankovic i sar., 2016a). Kao što je prethodno opisano, magnezijum je neophodan kofaktor za sintezu redukovano $\gamma$  glutationa (Mills i sar., 1986), pa pri niskoj koncentraciji magnezijuma opada nivo glutationa u tkivu (Shah i sar., 2011). U istraživanju predstavljenom u ovoj doktorskoj tezi pokazano je da je koncentracija magnezijuma veća na mestu zapaljenja kod ST2-/- miševa, u odnosu na zapaljenjsku grupu genetski neizmenjenih miševa, što može imati za posledicu nalaz većeg sadržaja redukovano $\gamma$  glutationa na mestu akutnog zapaljenja u odsustvu IL-33/ST2 osovine (Stankovic i sar., 2016a).

Ovim istraživanjem je pokazano da su zapaljenjski infiltrat, oštećenje tkiva na mestu zapaljenja i strukturalne promene intenzivniji u prisustvu IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju. Dodatno, genska ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora se povećava u akutnom zapaljenju, što ukazuje na značaj IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju. Pokazano je da IL-33/ST2 osovina dovodi do porasta koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja, koje može da doprinese oštećenju tkiva u zapaljenju, a samim tim i intenzivnijem zapaljenju. Poznato je da postoji negativna povezanost između koncentracije magnezijuma i intenziteta zapaljenja. U ovom istraživanju je pokazano da zapravo IL-33/ST2 osovina dovodi do smanjenja koncentracije magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja, što je još jedan od mehanizama kojim IL-33/ST2 osovina doprinosi intenzivnijem zapaljenju i oštećenju. U odsustvu IL-33/ST2 osovine, genska ekspresija antiinflamatornog citokina TGF- $\beta$  i sadržaj antioksidanta redukovano $\gamma$  glutationa veći su na mestu akutnog zapaljenja nego u prisustvu IL-33/ST2 osovine, što ukazuje da odsustvo IL-33/ST2 osovine dovodi do manje intenzivnog zapaljenjskog odgovora i



manjeg oštećenja tkiva u akutnom zapaljenju. IL-33/ST2 osovina doprinosi razvoju intenzivnijeg zapaljenja i oštećenja tkiva u akutnom zapaljenju, pa je moguće da će se ciljanim uticanjem na IL-33/ST2 osovinu uneti novine u lečenju.

## 6 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja, može se zaključiti:

- IL-33/ST2 osovina doprinosi razvoju intenzivnijeg zapaljenjskog infiltrata, intenzivnijem oštećenju tkiva i strukturalnim promenama na mestu akutnog zapaljenja.
- Genska ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora se povećava na mestu akutnog zapaljenja. U odsustvu IL-33/ST2 osovine genska ekspresija antiinflamatornog citokina faktora transformacije rasta-beta (TGF-beta) na mestu akutnog zapaljenja je veća, što doprinosi razvoju blažeg zapaljenjskog odgovora.
- IL-33/ST2 osovina dovodi do porasta koncentracije gvožđa na mestu akutnog zapaljenja, što doprinosi većem stepenu oštećenja u akutnom zapaljenju. Takođe, IL-33/ST2 osovina ima ulogu u smanjenju prosečne količine hemoglobina u eritrocitu u akutnom zapaljenju.
- IL-33/ST2 osovina ima ulogu u smanjenju koncentracije magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja, i na taj način doprinosi intenzivnijem zapaljenjskom odgovoru i oštećenju u akutnom zapaljenju.
- U odsustvu IL-33/ST2 osovine, sadržaj antioksidanta redukovano glutationa na mestu akutnog zapaljenja je veći, a to doprinosi manjem oštećenju tkiva, i posledično manje intenzivnom zapaljenjskom odgovoru.

Uzevši u obzir sve prethodno navedene zaključke, glavni zaključak ove doktorske teze je da IL-33/ST2 osovina doprinosi intenzivnijem zapaljenju i oštećenju tkiva u akutnom zapaljenju, utičući na koncentraciju magnezijuma i gvožđa, sadržaj redukovanog glutationa i gensku ekspresiju TGF-beta na mestu akutnog zapaljenja. Na mestu akutnog zapaljenja se povećava genska ekspresija interleukina-33 i ST2 receptora (shema 2).



Shema 2. Predložena uloga IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju na osnovu rezultata istraživanja predstavljenih u doktorskoj tezi. U ekperimentalnom modelu je izazvano oštećenje koje je dovelo da zapaljenja. IL-33/ST2 osovina dovodi do intenzivnijeg zapaljenjskog odgovora i oštećenja tkiva utičući na porast koncentracije gvožđa, pad koncentracije magnezijuma i povećanje genske ekspresije IL-33 i ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja. U odsustvu IL-33/ST2 osovine zapaljenjski infiltrat i oštećenje tkiva su manje intenzivni, čemu doprinosi povećana genska ekspresija antiinflamatornog citokina TGF-beta i povećan sadržaj antioksidanta GSH na mestu akutnog zapaljenja. IL-33 - interleukin-33; TGF-beta - faktor transformacije rasta-beta; GSH - redukovani glutation;

## **7 LITERATURA**

A

Abbas, A.K, Lichtman, A.H., 2008. Osnovna imunologija: funkcije i poremećaji imunskog sistema, Data status, Beograd.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2010. Cellular and Molecular Immunology, Saunders Elsevier, Filadelfija.

Aderem, A., 2003. Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis.* 187, S340-345.

Ali, S., Huber, M., Kollwe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., Martin, M.U., 2007. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18660-18665.

Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., Martin, M.U., 2011. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- $\kappa$ B to dampen NF- $\kappa$ B-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 187, 1609-1616.

Allakhverdi, Z., Smith, D.E., Comeau, M.R., Delespesse, G., 2007. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol.* 179, 2051-2054.

Alves-Filho, J.C., Sônego, F., Souto, F.O., Freitas, A., Verri, W.A. Jr, Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., McKenzie, A.N., Xu, D., Cunha, F.Q., Liew, F.Y., 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 16, 708-712.

Andersen, H.H., Johnsen, K.B., Moos, T., 2014. Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci.* 71, 1607-1622.

Arakawa, A., Ruzicka, T., Prinz, J.C., 2016. Therapeutic Efficacy of Interleukin 12/Interleukin 23 Blockade in Generalized Pustular Psoriasis Regardless of IL36RN Mutation Status. *JAMA Dermatol.*, doi: 10.1001/jamadermatol.2016.0751.

Arsenian, M.A., 1993. Magnesium and cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 35, 271-310.

## B

Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., Girard, J.P., 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 163, 69-79.

Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L., 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 84, 1045-1049.

Baldrige, C.W., Gerard, R.W., 1932. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.* 103, 235-236.

Banasik, J.L., Copstead, L.C., 2013. *Pathophysiology*, Elsevier Saunders, Sent Luis.



Banerjee, R., Becker, D., Dickman, M., Gladyshev, V., Ragsdale, S., 2008. Redox biochemistry, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken.

Barbour, M., Allan, D., Xu, H., Pei, C., Chen, M., Niedbala, W., Fukada, S.Y., Besnard, A.G., Alves-Filho, J.C., Tong, X., Forrester, J.V., Liew, F.Y., Jiang, H.R., 2014. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* 44, 3320-3329.

Bartemes, K.R., Kita, H., 2012. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. *Clin Immunol.* 143, 222-235.

Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A., 2009. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 89, 27-71.

Basil, M.C., Levy, B.D., 2016. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 16, 51-67.

Baumgardner, K.R., Sulfaro, M.A., 2001. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. *J Endod.* 27, 190-195.

Becker, S.F., Langhe, R., Huang, C., Wedlich, D., Kashef, J., 2012. Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements. *Arch Biochem Biophys.* 524, 30-42.

Beisel, W.R., 1975. Metabolic response to infection. *Annu Rev Med.* 26, 9-20.

Bergers, G., Reikerstorfer, A., Braselmann, S., Graninger, P., Busslinger, M., 1994. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 13, 1176-1188.

Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 81, 1-5.

Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A.A., Rojkind, M., Böttinger, E.P., 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14, 187-197.

Blumenkrantz, G., Stahl, R., Carballido-Gamio, J., Zhao, S., Lu, Y., Munoz, T., Hellio Le Graverand-Gastineau, M.P., Jain, S.K., Link, T.M., Majumdar, S., 2008. The feasibility of characterizing the spatial distribution of cartilage T(2) using texture analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 584-590.

Bois, P., Gascon, A., Beaulnes, A., 1963. Histamine-liberating effect of magnesium deficiency in the rat. *Nature* 197, 501-502.

Bose, N., Chan, A.S., Guerrero, F., Maristany, C.M., Qiu, X., Walsh, R.M., Ertelt, K.E., Jonas, A.B., Gorden, K.B., Dudney, C.M., Wurst, L.R., Danielson, M.E., Elmasry, N., Magee, A.S., Patchen, M.L., Vasilakos, J.P., 2013. Binding of Soluble Yeast  $\beta$ -Glucan to Human Neutrophils and Monocytes is Complement-Dependent. *Front Immunol.* 4, 230.

Bosnjak, M., Ristic, B., Arsikin, K., Mircic, A., Suzin-Zivkovic, V., Perovic, V., Bogdanovic, A., Paunovic, V., Markovic, I., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., Harhaji-Trajkovic, L., 2014. Inhibition of mTOR-dependent autophagy

sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One* 9, e94374.

Bradley, L.M., Dalton, D.K., Croft, M., 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol.* 157, 1350-1358.

Brint, E.K., Fitzgerald, K.A., Smith, P., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Fallon, P.G., O'Neill, L.A., 2002. Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. *J Biol Chem.* 277, 49205-49211.

Broome, C.S., McArdle, F., Kyle, J.A., Andrews, F., Lowe, N.M., Hart, C.A., Arthur, J.R., Jackson, M.J., 2004. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr.* 80, 154-162.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., 2006. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, Elsevier Saunders, Sent Luis.

Bussière, F.I., Gueux, E., Rock, E., Girardeau, J.P., Tridon, A., Mazur, A., Rayssiguier, Y., 2002. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. *Br J Nutr.* 87, 107-113.

Byrne, S.N., Beaugie, C., O'Sullivan, C., Leighton, S., Halliday, G.M., 2011. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol.* 179, 211-222.

C

Cabrera, J., 2005. Texture analyzer. <http://rbs.info.nih.gov/ij/plugins/texture.html>

Camaschella, C., 2013. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013, 1-8.

Cantin, A.M., Bégin, R., 1991. Glutathione and inflammatory disorders of the lung. *Lung* 169, 123-138.

Captur, G., Lopes, L.R., Patel, V., Li, C., Bassett, P., Syrris, P., Sado, D.M., Maestrini, V., Mohun, T.J., McKenna, W.J., Muthurangu, V., Elliott, P.M., Moon, J.C., 2014. Abnormal cardiac formation in hypertrophic cardiomyopathy: fractal analysis of trabeculae and preclinical gene expression. *Circ Cardiovasc Genet* 7, 241-248.

Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., Girard, J.P., 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.

Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P.C., 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 242, 237-239.

Cavallaro, U., Christofori, G., 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118-132.

Cayrol, C., Girard, J.P., 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 9021-9026.

Cekanaviciute, E., Dietrich, H.K., Axtell, R.C., Williams, A.M., Egusquiza, R., Wai, K.M., Koshy, A.A., Buckwalter, M.S., 2014a. Astrocytic TGF- $\beta$  signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system *Toxoplasma* infection. *J Immunol.* 193, 139-149.

Cekanaviciute, E., Fathali, N., Doyle, K.P., Williams, A.M., Han, J., Buckwalter, M.S., 2014b. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia* 62, 1227-1240.

Cevikbas, F., Steinhoff, M., 2012. IL-33: a novel danger signal system in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 132, 1326-1329.

Chhetria, S., Khanb, A., Rathoree, N.S., Ishaq, F., Chandela, A.S., Malhotra, D., 2011. Effect of Lovastatin on Lipoprotein Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Inflammation Induced Hyperlipidemic Rats. *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 52-63.

Choi, Y.S., Choi, H.J., Min, J.K., Pyun, B.J., Maeng, Y.S., Park, H., Kim, J., Kim, Y.M., Kwon, Y.G., 2009. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood* 114, 3117-3126.

Clark, R.A., Klebanoff, S.J., 1977. Myeloperoxidase--H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>--halide system: cytotoxic effect on human blood leukocytes. *Blood*. 50, 65-70.

Coassin, M., Ursini, F., Bindoli, A., 1992. Antioxidant effect of manganese. *Arch Biochem Biophys*. 299, 330-333.

Coggins, M., Rosenzweig, A., 2012. The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease. *Circ Res*. 110, 116-125.

Cohen, S., Bigazzi, P.E., Yoshida, T., 1974. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol*. 12, 150-159.

Copley, S.J., Giannarou, S., Schmid, V.J., Hansell, D.M., Wells, A.U., Yang, G.Z., 2012. Effect of aging on lung structure in vivo: assessment with densitometric and fractal analysis of high-resolution computed tomography data. *J. Thorac. Imaging* 27, 366-371.

Cornish, T.B., 2007. GLCM\_TextureToo.  
<http://tobycornish.com/downloads/imagej/>

Crichton, R., Boelaert, J.R., Braun, V., Hantke, K., Marx, J.J.M., Santos, M., Ward, R., 2001. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*, John Wiley & Sons, Zapadni Saseks.

Crook, M.A., 2012. *Clinical biochemistry and metabolic medicine*, Hodder & Stoughton Ltd, London.

## D

D'Anna, M.C., Giorgi, G., Roque, M.E., 2011. Immunohistochemical Studies on Duodenum, Spleen and Liver in Mice: Distribution of Ferroportin and Prohepcidin in an Inflammation Model. *Int. J. Morphol.* 29, 747-753.

Darshan, D., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Anderson, G.J., 2010. Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene *Hamp* and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide. *Haematologica.* 95, 1660-1667.

Davis, C.D., 2003. Low dietary copper increases fecal free radical production, fecal water alkaline phosphatase activity and cytotoxicity in healthy men. *J Nutr.* 133, 522-527.

de Kozak, Y., Verwaerde, C., 2002. Cytokines in immunotherapy of experimental uveitis. *Int Rev Immunol.* 21, 231-253.

de Larco, J.E., Todaro, G.J., 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 4001-4005.

Delmastro-Greenwood, M.M., Tse, H.M., Piganelli, J., 2014. Effects of metalloporphyrins on reducing inflammation and autoimmunity. *Antioxid Redox Signal.* 20, 2465-2477.

Dey, P., Banik, T., 2012. Fractal dimension of chromatin texture of squamous intraepithelial lesions of cervix. *Diagn Cytopathol* 40, 152-154.

Di Lorenzo, A., Fernández-Hernando, C., Cirino, G., Sessa, W.C., 2009. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14552-14557.

Djordjevich, D.M., De Luka, S.R., Milovanovich, I.D., Janković, S., Stefanović, S., Vesković-Moračanin, S., Cirković, S., Ilić, A.Ž., Ristić-Djurović, J.L., Trbovich, A.M., 2012. Hematological parameters' changes in mice subchronically exposed to static magnetic fields of different orientations. *Ecotoxicol Environ Saf.* 81, 98-105.

Dröge, W., Pottmeyer-Gerber, C., Schmidt, H., Nick, S., 1986. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiology* 172, 151-156.

Du, Q., Yao, H., Yao, L., Zhang, Z., Lei, X., Xu, S., 2016. Selenium Deficiency Influences the Expression of Selenoproteins and Inflammatory Cytokines in Chicken Aorta Vessels. *Biol Trace Elem Res.*, u štampi.

Dunkelberger, J.R., Song, W.C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20, 34-50.

Durham, H. E., 1897. The mechanism of reaction to peritoneal infection. *J. Path. Bact.* 4, 338-382.

## E

Ehlenberger, A.G., Nussenzweig, V., 1977. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med.* 145, 357-371.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82, 70-77.

Espinassous, Q., Garcia-de-Paco, E., Garcia-Verdugo, I., Synguelakis, M., von Aulock, S., Sallenave, J.M., McKenzie, A.N., Kanellopoulos, J., 2009. IL-33



enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol.* 183, 1446-1455.

## F

Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J., 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264-265.

Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15, 1583-1606.

## G

Gächter, T., Werenskiold, A.K., Klemenz, R., 1996. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 271, 124-129.

Gamble, J.R., Vadas, M.A., 1988. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 242, 97-99.

Gärtner, R., Gasnier, B.C., Dietrich, J.W., Krebs, B., Angstwurm, M.W., 2002. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 1687-1691.

Gaspard, K.J., Twite, K., 2005. Hematopoietic Function, u: Porth, C.M. (Ured.), *Pathophysiology: concept of altered health states.* Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfija, str. 277-337.

Giebisch, G., 1998. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol.* 274, F817-833.

Giurgea, N., Constantinescu, M.I., Stanciu, R., Suciu, S., Muresan, A., 2005. Ceruloplasmin - acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. *Med Sci Monit.* 11, RA48-51.

Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23-35.

Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Böggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H., Vestweber, D., 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 110, 583-588.

Grace, P.M., Loram, L.C., Christianson, J.P., Strand, K.A., Flyer-Adams, J.G., Penzkover, K.R., Forsayeth, J.R., van Dam, A.M., Mahoney, M.J., Maier, S.F.,

Gropper, S.S., Smith, J.L., 2013. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, Wadsworth Cengage Learning, Belmont.

Grossman, S., Porth, C.M., 2014. *Porth's Pathophysiology Concepts of Altered Health States*, Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfija.

Günzler, W.A., Kremers, H., Flohé, L., 1974. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 12, 444-448.

Guilford, F.T., Hope, J., 2014. Deficient glutathione in the pathophysiology of mycotoxin-related illness. *Toxins (Basel)*. 6, 608-623.

## H

Haenuki, Y., Matsushita, K., Futatsugi-Yumikura, S., Ishii, K.J., Kawagoe, T., Imoto, Y., Fujieda, S., Yasuda, M., Hisa, Y., Akira, S., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., 2012. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 130, 184-194.

Haralick, R.M., Shanmugam, K., Dinstein, I., 1973. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems Man Cybernetics* 3, 610-621.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 6, 1123-1132.

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., Tominaga, S., 2007. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. 282, 26369-26380.

Hazlett, L.D., McClellan, S.A., Barrett, R.P., Huang, X., Zhang, Y., Wu, M., van Rooijen, N., Szliter, E., 2010. IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51, 1524-1532.

Helle, M., Brakenhoff, J.P., De Groot, E.R., Aarden, L.A., 1988. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol*. 18, 957-959.

Hevel, J.M., White, K.A., Marletta, M.A., 1991. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* 266, 22789-22791.

Hider, R.C., Singh, S., 2012. Iron chelators of clinical significance, u: Silver J. (Ured.), *Chemistry of Iron*, Springer Science & Business Media, Njujork, pogl. 8.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., Kishimoto, T., 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76.

Hopkins, F.G., 1921. XXXII. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 15, 286-305.

Hopkins, F.G., 1929. On glutathione : a reinvestigation. *J. Biol. Chem.* 84, 269-320.

Hoskote, S.S., Joshi, S.R., Ghosh, A.K., 2008. Disorders of potassium homeostasis: pathophysiology and management. *J Assoc Physicians India* 56, 685-693.

Hsu, C.L., Bryce, P.J., 2012. Inducible IL-33 expression by mast cells is regulated by a calcium-dependent pathway. *J Immunol.* 189, 3421-3429.

Hueber, A.J., Alves-Filho, J.C., Asquith, D.L., Michels, C., Millar, N.L., Reilly, J.H., Graham, G.J., Liew, F.Y., Miller, A.M., McInnes, I.B., 2011. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur J Immunol.* 41, 2229-2237.

Hynes, R.O., 2001. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110, 673-687.

## I

Iikura, M., Suto, H., Kajiwara, N., Oboki, K., Ohno, T., Okayama, Y., Saito, H., Galli, S.J., Nakae, S., 2007. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*. 87, 971-978.

Ikegami, K., Lalonde, C., Young, Y.K., Picard, L., Demling, R., 1994. Comparison of plasma reduced glutathione and oxidized glutathione with lung and liver tissue oxidant and antioxidant activity during acute inflammation. *Shock* 1, 307-312.

Ishikawa, K., Yagi-Nakanishi, S., Nakanishi, Y., Kondo, S., Tsuji, A., Endo, K., Wakisaka, N., Murono, S., Yoshizaki, T., 2014. Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx* 41, 552-557.

Ishizaki, N., Kotani, M., Funaba, M., Matsui, T., 2011. Hepcidin expression in the liver of rats fed a magnesium-deficient diet. *Br J Nutr*. 106, 1169-1172.

Ismail, N.A., Okasha, S.H., Dhawan, A., Rahman, A.M.O.A., Hamid, N.A., Shaker, O., 2012. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in children with chronic hepatitis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3, 972-977.

Ito, Y., Kajkenova, O., Feuers, R.J., Udupa, K.B., Desai, V.G., Epstein, J., Hart, R.W., Lipschitz, D.A., 1998. Impaired glutathione peroxidase activity accounts

for the age-related accumulation of hydrogen peroxide in activated human neutrophils. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 53, M169-175.

## J

Jurado, R.L., 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis.* 25, 888-895.

Jutras, I., Desjardins, M., 2005. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 511-527.

## K

Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., Hansbro, P.M., 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.

Kakkar, R., Hei, H., Dobner, S., Lee, R.T., 2012. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem.* 287, 6941-6948.

Kakkar, R., Lee, R.T., 2008. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 7, 827-840.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, Berlington.

Karperien, A. (1999-2013) *FracLac* for *ImageJ*.  
<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fracLac>.

Kasutani, K., Fujii, E., Ohyama, S., Adachi, H., Hasegawa, M., Kitamura, H., Yamashita, N., 2014. Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating itch and dermatitis in mice. *Br J Pharmacol.* 171, 5049-5058.

Kevil, C.G., Pruitt, H., Kavanagh, T.J., Wilkerson, J., Farin, F., Moellering, D., Darley-Usmar, V.M., Bullard, D.C., Patel, R.P., 2004. Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1: implications for inflammation. *FASEB J* 18, 1321-1323.

Kim, J., Kim, W., Le, H.T., Moon, U.J., Tran, V.G., Kim, H.J., Jung, S., Nguyen, Q.T., Kim, B.S., Jun, J.B., Cho, H.R., Kwon, B., 2014. IL-33-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization depends upon CCR2. *J Immunol.* 193, 3792-3802.

Kim, S.K., 1984. Changes in the secretory acinar cells of the rat parotid gland during aging. *Anat Rec.* 209, 345-354.

Kinasewitz, G.T., 1997. Transudative effusions. *Eur Respir J.* 10, 714-718.

Klemenz, R., Hoffmann, S., Werenskiold, A.K., 1989. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 5708-5712.

Knutson, K.L., Disis, M.L., 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 54, 721-728.

Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G., 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 170, 827-845.

Komai-Koma, M., Brombacher, F., Pushparaj, P.N., Arendse, B., McSharry, C., Alexander, J., Chaudhuri, R., Thomson, N.C., McKenzie, A.N., McInnes, I., Liew, F.Y., Xu, D., 2012. Interleukin-33 amplifies IgE synthesis and triggers mast cell degranulation via interleukin-4 in naïve mice. *Allergy* 67, 1118-1126.

Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 37, 2779-2786.

Kumar, S., Minnich, M.D., Young, P.R., 1995. ST2/T1 protein functionally binds to two secreted proteins from Balb/c 3T3 and human umbilical vein endothelial cells but does not bind interleukin 1. *J Biol Chem.* 270, 27905-27913.

Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K.K., Jang, Y.C., Wagers, A.J., Benoist, C., Mathis, D., 2016. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* 44, 355-367.

## L

Lagan, A.L., Melley, D.D., Evans, T.W., Quinlan, G.J., 2008. Pathogenesis of the systemic inflammatory syndrome and acute lung injury: role of iron mobilization and decompartmentalization. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L161-174.

Lagarde, S., Villeneuve, N., Trébuchon, A., Kaphan, E., Lepine, A., McGonigal, A., Roubertie, A., Barthez, M.J., Trommsdorff, V., Lefranc, J., Wehbi, S., des Portes, V., Laguitton, V., Quartier, P., Scavarda, D., Giusiano, B., Milh, M., Bulteau, C., Bartolomei, F., 2016. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy



(adalimumab) in Rasmussen's encephalitis: An open pilot study. *Epilepsia*, doi: 10.1111/epi.13387.

Lai, J.C., Kakuta, I., Mok, H.O., Rummer, J.L., Randall, D., 2006. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *J. Exp. Biol.* 209, 2734-2738.

Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2009a. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev.* 227, 95-105.

Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2009b. IL-33 raises alarm. *Immunity* 31, 5-7.

Lau, A., Chan, L.N., 2013. Electrolytes, other minerals, and trace elements, u: Lee, M. (Ured.), *Basic skills in interpreting laboratory data*, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, str. 119-160.

Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., Falus, A., 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12, 547-554.

Le, H., Kim, W., Kim, J., Cho, H.R., Kwon, B., 2013. Interleukin-33: a mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cells and their progenies. *Front Immunol.* 4, 104.

Le, H.T., Tran, V.G., Kim, W., Kim, J., Cho, H.R., Kwon, B., 2012. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-*Candida albicans* response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J Immunol.* 189, 287-295.

Lefer, A.M., Ma, X.L., Weyrich, A.S., Scalia, R., 1993. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1018-1022.

Lefrançais, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., Girard, J.P., 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 43, 15502-15507.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7, 678-689.

Li, C., Zhou, H.M., 2011. The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. *Enzyme Res.*, 387176.

Li, M., Li, Y., Liu, X., Gao, X., Wang, Y., 2012. IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 247, 25-31.

Lieberman, M., Marks, A.D., 2012. Marks' Basic Medical Biochemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfija.

Liew, F.Y., Pitman, N.I., McInnes, I.B., 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 10, 103-110.

Lima, I.L., Macari, S., Madeira, M.F., Rodrigues, L.F., Colavite, P.M., Garlet, G.P., Soriani, F.M., Teixeira, M.M., Fukada, S.Y., Silva, T.A., 2015. Osteoprotective Effects of IL-33/ST2 Link to Osteoclast Apoptosis. *Am J Pathol.* 185, 3338-3348.

Linhardt, R.J., Toida, T., 2004. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Acc Chem Res.* 37, 431-438.

Liu, S., Mi, W.L., Li, Q., Zhang, M.T., Han, P., Hu, S., Mao-Ying, Q.L., Wang, Y.Q., 2015. Spinal IL-33/ST2 Signaling Contributes to Neuropathic Pain via Neuronal CaMKII-CREB and Astroglial JAK2-STAT3 Cascades in Mice. *Anesthesiology*. 123, 1154-1169.

Löhning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Levinson, D., Radbruch, A., Kamradt, T., 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6930-6935.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-275.

Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., Lavelle, E.C., Martin, S.J., 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.

## M

Malik, I.A., Naz, N., Sheikh, N., Khan, S., Moriconi, F., Blaschke, M., Ramadori, G., 2011. Comparison of changes in gene expression of transferrin receptor-1 and other iron-regulatory proteins in rat liver and brain during acute-phase response. *Cell Tissue Res*. 344, 299-312.

Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L.M., Maxfield, F.R., Muller, W.A., 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*. 421, 748-753.

Manera, M., Dezfuli, B.S., Borreca, C., Giari, L., 2014. The use of fractal dimension and lacunarity in the characterization of mast cell degranulation in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J. Microsc.* 256, 82-89.

Manetti, M., Ibba-Manneschi, L., Liakouli, V., Guiducci, S., Milia, A.F., Benelli, G., Marrelli, A., Conforti, M.L., Romano, E., Giacomelli, R., Matucci-Cerinic, M., Cipriani, P., 2010. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 69, 598-605.

Mantovani, B., Rabinovitch, M., Nussenzweig, V., 1972. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *J Exp Med.* 135, 780-792.

Markiewski, M.M., Lambris, J.D., 2007. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* 171, 715-727.

Martin, N.T., Martin, M.U., 2016. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 17, 122-131.

Matsuda, A., Okayama, Y., Terai, N., Yokoi, N., Ebihara, N., Tanioka, H., Kawasaki, S., Inatomi, T., Katoh, N., Ueda, E., Hamuro, J., Murakami, A., Kinoshita, S., 2009. The role of interleukin-33 in chronic allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 4646-4652.

Mazur, A., Maier, J.A., Rock, E., Gueux, E., Nowacki, W., Rayssiguier, Y., 2007. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys.* 458, 48-56.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244, 6049-6055.

McLaren, J.E., Michael, D.R., Salter, R.C., Ashlin, T.G., Calder, C.J., Miller, A.M., Liew, F.Y., Ramji, D.P., 2010. IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J. Immunol.* 185, 1222-1229.

McLoon, L.K., Wirtschafter, J., 1997. Local injections of corticotropin releasing factor reduce doxorubicin-induced acute inflammation in the eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 834-841.

McMaster, P.D., Hudack, S., 1932. The vessels involved in hydrostatic transudation. *J Exp Med.* 55, 417-430.

Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454, 428-435.

Menkin, V., 1931. Studies on inflammation : VI. fixation of trypan blue in inflamed areas of frogs. *J Exp Med.* 53, 179-183.

Menkin, V., 1934. Studies on Inflammation: X. The Cytological Picture of an Inflammatory Exudate in Relation to its Hydrogen Ion Concentration. *Am J Pathol.* 10, 193-210.

Menkin, V., 1936. Studies on inflammation : XII. mechanism of increased capillary permeability. a critique of the histamine hypothesis. J Exp Med. 64, 485-502.

Menkin, V., 1960. Biochemical Mechanisms in Inflammation. Br Med J. 1, 1521-1528.

Messner, R.P., Jelinek, J., 1970. Receptors for human gamma G globulin on human neutrophils. J Clin Invest. 49, 2165-2171.

Metchnikoff, E., 1905. Immunity in infective diseases, University Press, Cambridge.

Michaud, J., Kohno, M., Proia, R.L., Hla, T., 2006. Normal acute and chronic inflammatory responses in sphingosine kinase 1 knockout mice. FEBS Lett. 580, 4607-4612.

Milanino, R., Conforti, A., Fracasso, M.E., Franco, L., Leone, R., Passarella, E., Tarter, G., Velo, G.P., 1979. Concerning the role of endogenous copper in the acute inflammatory process. Agents Actions 9, 581-588.

Milanino, R., Marrella, M., Gasperini, R., Pasqualicchio, M., Velo, G., 1993. Copper and zinc body levels in inflammation: an overview of the data obtained from animal and human studies. Agents Actions. 39, 195-209.

Milićević, N.M., Trbojević-Stanković, J.B., Drachenberg, C.B., Milićević, Z., 2010. Stereologic analysis of tissue compartments of gunshot-injured and blunt-injured spleen. Pathol Oncol Res. 16, 69-73.

Miller, A.M., Asquith, D.L., Hueber, A.J., Anderson, L.A., Holmes, W.M., McKenzie, A.N., Xu, D., Sattar, N., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2010. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res.* 107, 650-658.

Mills, B.J., Lindeman, R.D., Lang, C.A., 1986. Magnesium deficiency inhibits biosynthesis of blood glutathione and tumor growth in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 181, 326-332.

Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 229, 189-197.

Mitchell, R., Cotran, R., 2003. *Acute and Chronic Inflammation*, U: Cotran, R., Robbins, S.L., Kumar, V. (Ured.), *Robbins Basic Pathology*, W.B. Saunders, Filadelfija, str. 33-34.

Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 328-335.

Mituhashi, T., Hatashita, S., Ogino, I., 2003. Regional distribution of potassium and phosphorus in ischemic brain tissue of rats with X-ray fluorescence analysis. *Acta Neurochir Suppl.* 86, 173-175.

Mizel, S.B., Farrar, J.J., 1979. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors. *Cell Immunol.* 48, 433-436.

Mollà, M., Gironella, M., Salas, A., Closa, D., Biete, A., Gimeno, M., Coronel, P., Piqué, J.M., Panés, J., 2005. Protective effect of superoxide dismutase in

radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 61, 1159-1166.

Morris, D., Guerra, C., Khurasany, M., Guilford, F., Saviola, B., Huang, Y., Venketaraman, V., 2013. Glutathione supplementation improves macrophage functions in HIV. *J Interferon Cytokine Res.* 33, 270-279.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136, 2348-2357.

Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-969.

Mostaço-Guidolin, L.B., Ko, A.C., Wang, F., Xiang, B., Hewko, M., Tian, G., Major, A., Shiomi, M., Sowa, M.G., 2013. Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Sci Rep.* 3, 2190.

Muller, W.A., 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol.* 6, 323-344.

Muller, W.A., 2013. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.* 50, 7-22.

Muñoz, M., García-Erce, J.A., Remacha, A.F., 2011. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol.* 64, 281-286.



Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A., 2009. Harper's Illustrated Biochemistry, The McGraw-Hill Companies, Njujork.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Njujork.

## N

Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature*. 420, 846-852.

Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T., 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 113, 1271-1276.

Nielsen, M.S, Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N.H., 2012. Gap junctions. *Compr Physiol*. 2, 1981-2035.

## O

Opie, E. L., 1922. Intracellular digestion. *Physiol. Rev.* 2, 552-585.

Opie, E.L., 1906. The enzymes in phagocytic cells of inflammatory exudates. *J Exp Med*. 8, 410-436.

Opie, E.L., 1962. On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J Exp Med*. 115, 597-608.

Ouziel, R., Gustot, T., Moreno, C., Arvanitakis, M., Degré, D., Trépo, E., Quertinmont, E., Vercruysse, V., Demetter, P., Le Moine, O., McKenzie, A.N., Delhay, M., Devière, J., Lemmers, A., 2012. The ST2 pathway is involved in acute pancreatitis: a translational study in humans and mice. *Am J Pathol.* 180, 2330-2339.

Ozaydin, A., Onaran, I., Yeşim, T.E., Sargin, H., Avşar, K., Sultuybek, G., 2006. Increased glutathione conjugate transport: a possible compensatory protection mechanism against oxidative stress in obesity? *Int J Obes (Lond).* 30, 134-140.

## P

Paramothayan, N.S., Barron, J., 2002. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J Clin Pathol.* 55, 69-71.

Parsons, M.E., Ganellin, C.R., 2006. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 147, S127-135.

Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrançais, E., Dujardin, A., Ortega, N., Girard, J.P., 2012. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol.* 188, 3488-3495.

Pober, J.S., Sessa, W.C., 2014. Inflammation and the blood microvascular system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, a016345.

Pongratz, G., Straub, R.H., 2014. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther.* 16, 504.

## R

Rajagopalan, V., Liu, Z., Allexandre, D., Zhang, L., Wang, X.F., Pioro, E.P., Yue, G.H., 2013. Brain white matter shape changes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a fractal dimension study. *PLoS One* 8, 73614.

Ramey, G., Deschemin, J.C., Durel, B., Canonne-Hergaux, F., Nicolas, G., Vaulont, S., 2010. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica* 95, 501-504.

Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer WT, Schroeder Jr. HW, Frew AJ, Weyand, CM, 2008. *Clinical Immunology - Principles and Practice*, Elsevier, Filadelfija.

Riley, J.F., West, G.B., 1952. Histamine in tissue mast cells. *J Physiol.* 117, 72P-73P.

Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., De Larco, J.E., Todaro, G.J., 1980. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 3494-3498.

Roehrs, M., Valentini, J., Paniz, C., Moro, A., Charão, M., Bulcão, R., Freitas, F., Brucker, N., Duarte, M., Leal, M., Burg, G., Grune, T., Garcia, S.C., 2011. The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 12, 59.

Rostan, O., Gangneux, J.P., Piquet-Pellorce, C., Manuel, C., McKenzie, A.N., Guiguen, C., Samson, M., Robert-Gangneux, F., 2013. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *MBio.* 4, e00383-13.

Roy, C.N., 2010. Anemia of inflammation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010, 276-280.

Ruch, R.J., 2002. Intercellular communication, homeostasis, and toxicology. *Toxicol Sci*. 68, 265-266.

Ruiz-Cabello, J., Regadera, J., Santisteban, C., Graña, M., Pérez de Alejo, R., Echave, I., Avilés, P., Rodriguez, I., Santos, I., Gargallo, D., Cortijo, M., 2002. Monitoring acute inflammatory processes in mouse muscle by MR imaging and spectroscopy: a comparison with pathological results. *NMR Biomed*. 15, 204-214.

Russell, E.S., Bernstein S. E., 1966. *Blood and Blood Formation*, u: Green E.L. (Ured.), *Biology of the Laboratory Mouse*, Dover publications Inc., Njujork, pogl. 17.

## S

Sakai, N., Van Sweringen, H.L., Quillin, R.C., Schuster, R., Blanchard, J., Burns, J.M., Tevar, A.D., Edwards, M.J., Lentsch, A.B., 2012. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* 56, 1468-1478.

Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N., Fallon, P.G., Ogg, G.S., 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*. 210, 2939-2950.

Sanada, S., Hakuno, D., Higgins, L.J., Schreiter, E.R., McKenzie, A.N., Lee, R.T., 2007. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 117, 1538-1549.

Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., Alenius, H., 2012. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol.* 132, 1392-1400.

Scalco, E., Fiorino, C., Cattaneo, G.M., Sanguineti, G., Rizzo, G., 2013. Texture analysis for the assessment of structural changes in parotid glands induced by radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 109, 384-387.

Scanlan, B.J., Tuft, B., Elfrey, J.E., Smith, A., Zhao, A., Morimoto, M., Chmielinska, J.J., Tejero-Taldo, M.I., Mak, I.u.T, Weglicki, W.B., Shea-Donohue, T., 2007. Intestinal inflammation caused by magnesium deficiency alters basal and oxidative stress-induced intestinal function. *Mol Cell Biochem.* 306, 59-69.

Schaible, H.G., Schmidt, R.F., Willis, W.D., 1987. Enhancement of the responses of ascending tract cells in the cat spinal cord by acute inflammation of the knee joint. *Exp Brain Res.* 66, 489-499.

Schiffmann, E., Corcoran, B.A., Wahl, S.M., 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 1059-1062.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D.M., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1

receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.

Scott, C.S., 1979. Maturation-linked expression of the Fc (IgG) receptor on developing human bone marrow and peripheral blood granulocytes. *Clin Exp Immunol.* 38, 300-305.

Sedhom, M.A., Pichery, M., Murdoch, J.R., Foligné, B., Ortega, N., Normand, S., Mertz, K., Sanmugalingam, D., Brault, L., Grandjean, T., Lefrancais, E., Fallon, P.G., Quesniaux, V., Peyrin-Biroulet, L., Cathomas, G., Junt, T., Chamailard, M., Girard, J.P., Ryffel, B., 2013. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut* 62, 1714-1723.

Seehase, S., Lauenstein, H.D., Schlumbohm, C., Switalla, S., Neuhaus, V., Förster, C., Fieguth, H.G., Pfennig, O., Fuchs, E., Kaup, F.J., Bleyer, M., Hohlfeld, J.M., Braun, A., Sewald, K., Knauf, S., 2012. LPS-induced lung inflammation in marmoset monkeys - an acute model for anti-inflammatory drug testing. *PLoS One* 7, e43709.

Seelig, M.S., Rosanoff, A., 2003. *The Magnesium Factor*, Penguin Group, Njujork.

Shah, N.C., Liu, J.P., Iqbal, J., Hussain, M., Jiang, X.C., Li, Z., Li, Y., Zheng, T., Li, W., Sica, A.C., Perez-Albela, J.L., Altura, B.T., Altura, B.M., 2011. Mg deficiency results in modulation of serum lipids, glutathione, and NO synthase isozyme activation in cardiovascular tissues: relevance to de novo synthesis of ceramide, serum Mg and atherogenesis. *Int J Clin Exp Med.* 4, 103-118.

Sharma, N., Ray, A., Sharma, S., Shukla, K., Pradhan, S., Aggarwal, L., 2008. Segmentation and classification of medical images using texture-primitive features: application of BAM-type artificial neural network. *J. Med. Phys.* 33, 119-126.

Sheikh, N., Tron, K., Dudas, J., Ramadori, G., 2006. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 is released by the noninjured liver in a rat acute-phase model. *Lab Invest* 86, 800-814.

Shukla, G.S., Chandra, S.V., 1981. Manganese toxicity: lipid peroxidation in rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 48, 95-100.

Singh, A.B., Harris, R.C., 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 17, 1183-1193.

Sjöberg, L.C., Gregory, J.A., Dahlén, S.E., Nilsson, G.P., Adner, M., 2015. Interleukin-33 exacerbates allergic bronchoconstriction in the mice via activation of mast cells. *Allergy* 70, 514-521.

Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R., Smith, D.E., 2008. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 20, 1019-1030.

Sobota, A., Strzelecka-Kiliszek, A., Gładkowska, E., Yoshida, K., Mrozińska, K., Kwiatkowska, K., 2005. Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J Immunol.* 175, 4450-4457.

Sprague, A.H., Khalil, R.A., 2009. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 78, 539-552.

Stankovic, M., 2010. Uloga citokina u patogenezi endogenih uveitisa (završni akademski specijalistički rad). Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.

Stankovic, M., Pantic, I., DE Luka, S.R., Puskas, N., Zaletel, I., Milutinovic-Smiljanic, S., Pantic, S., Trbovich, A.M., 2016b. Quantification of structural changes in acute inflammation by fractal dimension, angular second moment and correlation. *J Microsc.* 261, 277-284.

Stankovic, M.S, Turuntas, V., De Luka, S.R., Jankovic, S., Stefanovic, S., Puskas, N., Zaletel, I., Milutinović-Smiljanic, S., Trbovich, A.M., 2015. Effects of IL-33/St2 pathway on alteration of iron and hematological parameters in acute inflammation. *Exp Mol Pathol.* 99, 687-692.

Stankovic, M.S., Janjetovic, K., Velimirovic, M., Milenkovic, M., Stojkovic, T., Puskas, N., Zaletel, I., De Luka, S.R., Jankovic, S., Stefanovic, S., Japundzic-Zigon, N., Petronijevic, N.D., Trajkovic, V., Trbovich, A.M., 2016a. Effects of IL-33/ST2 pathway in acute inflammation on tissue damage, antioxidative parameters, magnesium concentration and cytokines profile. *Exp Mol Pathol.* 101, 31-37.

Starling, E.H., 1896. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol.* 19, 312-326.

Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R., Gately, M.K., 1990.



Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 6808-6812.

Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A., 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22, 539-550.

Su, V., Lau, A.F., 2014. Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Lett.* 588, 1212-1220.

Sukumaran, A., Venkatraman, A., Jacob, M., 2012. Inflammation-induced effects on iron-related proteins in splenic macrophages and the liver in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 49, 11-19.

Sultan, S., Pascucci, M., Ahmad, S., Malik, I.A., Bianchi, A., Ramadori, P., Ahmad, G., Ramadori, G., 2012. LIPOCALIN-2 is a major acute-phase protein in a rat and mouse model of sterile abscess. *Shock* 37, 191-196.

Sun, M., Zigman, S., 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 90, 81-89.

## T

Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Gabay, C., Palmer, G., 2009. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem.* 284, 19420-19426.

Tenekeci, G., Bilen, B.T., Turkoz, Y., Sahin, N., Bulam, N., Erdemli, M.E., 2016. The Effect of Selenium on Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study

on a Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap Model. *J Craniofac Surg.* 27, 242-246.

Terziev, L., Shopova, V., Dancheva, V., Stavreva, G., Atanasova, M., Stoyanova, A., Lukanov, T., Dimitrova, A., 2012. Influence of MnTE-2-PyP on Inflammation and Lipid Peroxidation in Mouse Asthma Model. *Open Journal of Respiratory Diseases* 2, 37-42.

Thornton, S.J., Spielman, D.M., Pelc, N.J., Block, W.F., Crocker, D.E., Costa, D.P., LeBoeuf, B.J., Hochachka, P.W., 2001. Effects of forced diving on the spleen and hepatic sinus in northern elephant seal pups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9413-9418.

Tinggi, U., 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med.* 13, 102-108.

Tominaga, S., 1989. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 258, 301-304.

Tominaga, S., Inazawa, J., Tsuji, S., 1996. Assignment of the human ST2 gene to chromosome 2 at q11.2. *Hum Genet.* 97, 561-563.

Tominaga, S., Kuroiwa, K., Tago, K., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Komatsu, N., 1999. Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun.* 264, 14-18.

Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 13, 251-276.

Tron, K., Novosyadlyy, R., Dudas, J., Samoylenko, A., Kietzmann, T., Ramadori, G., 2005. Upregulation of heme oxygenase-1 gene by turpentine oil-induced localized inflammation: involvement of interleukin-6. *Lab Invest.* 85, 376-387.

## U

Ueda, J., Starr, M.E., Takahashi, H., Du, J., Chang, L.Y., Crapo, J.D., Evers, B.M., Saito, H., 2008. Decreased pulmonary extracellular superoxide dismutase during systemic inflammation. *Free Radic Biol Med.* 45, 897-904.

## V

Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 8, 253-278.

Van Snick, J.L., Masson, P.L., Heremans, J.F., 1974. The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J Exp Med.* 140, 1068-1084.

Verri, W.A. Jr., Souto, F.O., Vieira, S.M., Almeida, S.C., Fukada, S.Y., Xu, D., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Guerrero, A.T., Mattos-Guimaraes, R.B., Oliveira, F.R., Teixeira, M.M., Silva, J.S., McInnes, I.B., Ferreira, S.H., Louzada-Junior, P., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2010. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis.* 69, 1697-1703.

von Andrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E., Butcher, E.C., 1991. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 7538-7542.

## W

Ward, P.A., Lepow, I.H., Newman, L.J., 1968. Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. *Am J Pathol.* 52, 725-736.

Weglicki, W., 2012. Hypomagnesemia and inflammation: clinical and basic aspects. *Annu Rev Nutr.* 32, 55-71.

Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., Nottebaum, A.F., Vestweber, D., 2014. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol.* 15, 223-230.

Williams, J.G., Maier, R.V., 1992. The inflammatory response. *J Intensive Care Med.* 7, 53-66.

Wilson, C.B., Rowell, E., Sekimata, M., 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 9, 91-105.

Winter, N., Meyer, A., Richter, A., Krisponeit, D., Bullerdiek, J., 2009. Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions. *Anticancer Res.* 29, 5013-5017.

X

Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J.H., Liew, F.Y., 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 187, 787-794.

Xu, D., Jiang, H.R., Kewin, P., Li, Y., Mu, R., Fraser, A.R., Pitman, N., Kurowska-Stolarska, M., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2008. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10913-10918.

Y

Yanagisawa, K., Takagi, T., Tsukamoto, T., Tetsuka, T., Tominaga, S., 1993. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett.* 318, 83-87.

Yang, X., Tridandapani, S., Beitler, J.J., Yu, D.S., Yoshida, E.J., Curran, W.J., Liu, T., 2012. Ultrasound GLCM texture analysis of radiation-induced parotid-gland injury in head-and-neck cancer radiotherapy: an in vivo study of late toxicity. *Med. Phys.* 39, 5732-5739.

Yatmaz, S., Seow, H.J., Gualano, R.C., Wong, Z.X., Stambas, J., Selemidis, S., Crack, P.J., Bozinovski, S., Anderson, G.P., Vlahos, R., 2013. Glutathione peroxidase-1 reduces influenza A virus-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 48, 17-26.

Yu, D.H., Yi, J.K., Yuh, H.S., Park, S.j., Kim, H.J., Bae, K.B., Ji, Y.R., Kim, N.R., Park, S.J., Kim, do H., Kim, S.H., Kim, M.O., Lee, J.W., Ryoo, Z.Y., 2012. Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis. *Exp Mol Med.* 44, 529-535.

## **PRILOZI**

## **SPISAK SKRAĆENICA**

ADP (*engl.* adenosine diphosphate) - adenzin difosfat  
Anti-TPO antitela - antitela na antitireoidnu peroksidazu  
ASM (*engl.* angular second moment) - ugaoni drugi momenat  
AST (*engl.* aspartate aminotransferase) - aspartat aminotransferaza  
ATP (*engl.* adenosine triphosphate) - adenzin trifosfat  
CK (*engl.* creatine kinase) - kreatin kinaza  
COR (*engl.* textural correlation) - teksturalna korelacija  
CR (*engl.* complement receptor) - receptor za komplement  
Ct - vrednost pragovnog ciklusa  
Cu - bakar  
Cu/Zn-SOD - bakar/cink-superoksid dizmutaza  
CXCR2 - receptor 2 za CXC hemokin  
D - fraktalna dimenzija  
DEPC (*engl.* diethylpyrocarbonate) - dietilpirokarbonat  
DMT1 (*engl.* divalent metal transporter 1) - transporter dvovalentnih metala tip 1  
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina  
Ec-SOD (*engl.* extracellular superoxide dismutase) - vanćelijska superoksid dizmutaza  
EDTA (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid) - etilen diamin tetra sirćetna kiselina  
Fe - gvožđe  
GLCM (*engl.* grey level co-occurrence matrix) metoda - metoda matrice združenog pojavljivanja nivoa sivog  
GPx (*engl.* glutathione peroxidase) - glutation peroksidaza  
GSH - redukovani glutation  
GSSG - oksidovani glutation  
HMGB1 (*engl.* high-mobility group box-1) - proteinski kompleks visoke mobilnosti 1  
H<sub>2</sub>O - voda



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodonik-peroksid

ICAM-1 (*engl.* intercellular adhesion molecule-1) - interćelijski adhezivni molekul-1

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

IL-1R - receptor za interleukin-1

IL-1RacP (*engl.* IL-1 receptor accessory protein) - IL-1R pomoćni protein

iNKT (*engl.* invariant natural killer T) ćelije - invarijantne NKT-ćelije

iNOS (*engl.* inducible nitric oxide synthase, iNOS) - inducibilna azot-monoksid sintaza

IRAK (*engl.* IL-1 receptor-associated kinase) - kinaza udružena sa IL-1 receptorom

KCl - kalijum hlorid

kDa - kilodalton

KO-C (*engl.* knockout control group) - kontrolna grupa miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor

KO-I (*engl.* knockout inflammatory group) - eksperimentalna grupa miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor kod kojih je izazvano akutno zapaljenje

LFA-1 (*engl.* lymphocyte function-associated antigen-1) - antigen 1 povezan sa limfocitnom funkcijom

MAC (*engl.* membrane attack complex) - kompleks koji oštećuje ćeliju

Mac-1 (*engl.* macrophage-1 antigen) - makrofag-1 antigen

MAP (*engl.* mitogen-activated protein) kinaza - mitogenom aktivirana proteinska kinaza

MCH (*engl.* mean corpuscular hemoglobin) - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu

Mn - mangan

Mn-SOD - mangan-superoksid dizmutaza

mRNK (*engl.* messenger RNK) - glasnička RNK

MyD88 (*engl.* myeloid differentiation primary response gene 88) - protein 88 primarne mijeloidne diferencijacije

NaBH<sub>4</sub> - natrijum borohidrid

NaOH - natrijum hidroksid

NFκB - nuklearni faktor-κB

NF-HEV (*engl.* nuclear factor from high endothelial venules) - nuklearni faktor venula sa visokim endotelom

NK (*engl.* natural killer) ćelije - urođenoubilačke ćelije

NKT (*engl.* natural killer T) ćelije - urođenoubilačke T-ćelije

NO - azot-monoksid

PECAM-1 (*engl.* platelet endothelial cell adhesion molecule 1) - adhezivni molekul 1 trombocita i endotelnih ćelija

qPCR (*engl.* quantitative polymerase chain reaction) - lančana reakcija umnožavanja polimerazom praćena u stvarnom vremenu

qRT-PCR (*engl.* quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) - lančana reakcija umnožavanja polimerazom praćena u stvarnom vremenu sa reverznom transkripcijom

RNK - ribonukleinska kiselina

SOD - superoksid dizmutaza

ST2<sup>-/-</sup> (*engl.* ST2 knockout) - BALB/c miševi kojima je uklonjen gen za ST2 receptor

TGF-beta (*engl.* transforming growth factor beta) - faktor transformacije rasta-beta

Th (T helper) limfociti - pomoćnički T-limfociti

Th2 (T helper type-2 lymphocytes) - pomoćnički T-limfociti tipa 2

TIR - Toll/IL-1 receptor

Tn - broj tačaka koji je padao na nekrotične mišićne ćelije

TNF-alfa (*engl.* tumor necrosis factor alpha) - faktor nekroze tumora-alfa

TRAF6 (*engl.* tumor necrosis factor receptor associated factor 6) - faktor 6 udružen sa receptorom za faktor nekroze tumora-alfa

Tt - ukupan broj test tačaka

Tz - broj tačaka koji je padao na inflamatorne ćelije

VCAM-1 (*engl.* vascular cell adhesion molecule-1) - adhezivni molekul 1 vaskularnih ćelija

Vgn - volumenska gustina nekrotičnih ćelija

Vgz - volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata

VLA-4 (*engl.* very late antigen-4) - veoma kasni antigen-4

WT-C (*engl.* wild-type control group) - kontrolna grupa genetski neizmenjenih miševa

WT-I (*engl.* wild-type inflammatory group) - eksperimentalna grupa genetski neizmenjenih miševa kod kojih je izazvano akutno zapaljenje

Zn - cink

**SPIŠAK ŠHEMA,  
SLIKA I TABELA**

Shema 1. Interleukin (IL)-33 kao potencijalni alarmin koji obaveštava imunski sistem o oštećenju u organizmu i IL-33/ST2 osovina.....11

Shema 2. Predložena uloga IL-33/ST2 osovine u akutnom zapaljenju na osnovu rezultata istraživanja predstavljenih u doktorskoj tezi.....121

Slika 1. Histopatološka analiza upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....51

Slika 2. Volumenska gustina zapaljenjskog infiltrata (Vgz) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....53

Slika 3. Volumenska gustina nekrotičnih ćelija (Vgn) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....55

Slika 4. Aktivnost kreatin kinaze (*engl.* creatine kinase, CK) u serumu genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....57

Slika 5. Aktivnost aspartat aminotransferaze (*engl.* aspartate aminotransferase, AST) u serumu genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....59

Slika 6. Genska ekspresija interleukina-33 (IL-33) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....61

Slika 7. Genska ekspresija ST2 receptora na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....63

Slika 8. Genska ekspresija faktora transformacije rasta-beta (*engl.* transforming growth factor beta, TGF-beta) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....66

Slika 9. Koncentracija gvožđa na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....68

Slika 10. Prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (*engl.* mean corpuscular hemoglobin, MCH) genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....70

Slika 11. Broj eritrocita u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....72

Slika 12. Hematokrit genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....74

Slika 13. Procenat eritrocita u slezini genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....76

Slika 14. Koncentracija hemoglobina u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....78

Slika 15. Broj neutrofila u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....80

Slika 16. Broj limfocita u krvi genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....82

Slika 17. Koncentracija magnezijuma na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....84

Slika 18. Koncentracija kalijuma na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....86

Slika 19. Fraktalna dimenzija upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....90

Slika 20. Ugaoni drugi momenat upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....92

Slika 21. Teksturalna korelacija upaljenog tkiva genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....94

Slika 22. Sadržaj redukovano glutationa (GSH) na mestu zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2-/-) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....96

Slika 23. Aktivnost superoksid dizmutaze (*engl.* superoxide dismutase, SOD) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa

kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....98

Slika 24. Aktivnost glutathion peroksidaze (*engl.* glutathione peroxidase, GPx) na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....100

Tabela 1. Genska ekspresija faktora nekroze tumora-alfa (*engl.* tumor necrosis factor-alpha, TNF-alfa), interleukina-6 (IL-6) i interleukina-12p35 (IL-12p35) na mestu akutnog zapaljenja genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....64

Tabela 2. Koncentracija bakra, mangana i selen na mestu akutnog zapaljenja kod genetski neizmenjenih miševa i miševa kojima je uklonjen gen za ST2 receptor (ST2<sup>-/-</sup>) u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja.....88



**OBJAVLJENI REZULTATI**  
**DOKTORSKE DISERTACIJE**

Publikacije, čiji je prvi autor Spec. dr med. Marija Stanković, u kojima su objavljeni rezultati istraživanja predstavljeni u doktorskoj tezi:

- tri *in extenso* rada u vrhunskim međunarodnim časopisima:
  - Exp Mol Pathol. 2016; 101(1):31-37,
  - Exp Mol Pathol. 2015; 99(3):687-692,
  - J Microsc. 2016; 261(3):277-284,
- jedan izvod sa naučnog skupa koji je štampan u vrhunskom međunarodnom časopisu, i
- šest izvoda iz zbornika međunarodnih naučnih skupova.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Marija Stanković je diplomirala na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2007. godine. Stručni ispit za doktora medicine je položila 2008. godine. Završila je specijalističke akademske studije (oblast Imunologija) na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2010. godine. Zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao asistent. Usavršavala se u Italiji, Španiji, Sjedinjenim Američkim Državama, Nemačkoj, Francuskoj i Rumuniji i bila je dobitnik raznih stipendija i nagrada. Član je većeg broja domaćih i inostranih stručnih udruženja.

## **IZJAVE**

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisana Marija Stanković

broj upisa

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

---

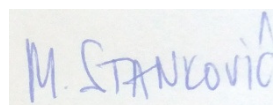
IL-33/ST2 osovina u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 30.05.2016. god.



**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Marija Stanković

Broj upisa

Studijski program

Naslov rada IL-33/ST2 osovina u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

Mentor Prof. dr Aleksandar M. Trbović

Potpisana Marija Stanković

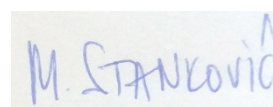
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 30.05.2016. god



### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

---

IL-33/ST2 osovina u eksperimentalnom modelu akutnog zapaljenja

---

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

**③ Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade**

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima

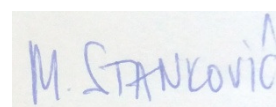
5. Autorstvo - bez prerade

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 30.05.2016. god.





1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.