

Универзитет у Београду
Медицински Факултет

Игор Ж. Барјактаревић

Улога Интерлеукина-23 у превременом
развоју емфизема плућа међу ХИВ-1 +
пушачима

Докторска дисертација

Београд, 2016

Univerzitet u Beogradu
Medicinski Fakultet

Igor Ž. Barjaktarević

Uloga Interleukina-23 u prevremenom
razvoju emfizema pluća među HIV-1 +
pušačima

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL SCHOOL

Igor Ž. Barjaktarevic

The Role of Interleukin-23 in the Early
Development of Emphysema in HIV1+
Smokers

Belgrade, 2016

Dr Igor Ž. Barjaktarević

Mentor: Dr Marija Mostarica-Stojković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

Komentor: Dr Robert Kaner, vanredni profesor, Katedra za genetiku i Katedra za
internu medicinu, Weill Cornell Medical College, Njujork, SAD

Komisija u sastavu:

Prof. dr Branislava Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

Prof. dr Tanja Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

Djordje Miljkovic, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnost:

Ovaj rad je rezultat efikasne saradnje između Medicinskog Fakulteta u Beogradu i *Weill-Cornell Medical College* u Njujorku. Rezultati istraživanja su dobijeni u laboratoriji dr Ronald Crystal-a u Njujorku u periodu 2009-2013 godine, uz direktno mentorstvo dr Robert Kaner-a koji je i komentor ove teze, a same metode rada i verifikacija rezultata je obavljena u konsultaciji i pod nadzorom mentora, prof. dr Marije Mostarice Stojković u Beogradu. Bez nesebične pomoći, upornosti i podrške prof. Mostarice Stojković, prof. Crystal-a i prof. Kaner-a, ovaj rad nikada ne bi bio ostvaren i, ovom prilikom, želeo bih da im se najsrdajnije zahvalim.

Takođe, u realizaciji rada je učestvovao tim stručnjaka pri *Weill-Cornell Medical College*, a posebnu zahvalnost dugujem tehničarima JunMei Hu, Maryna Elnashar; Dr Sci Anja Krause u analizi protočne citometrije; Jacqueline Salit u analizi podataka Affymetrix Microarray baze podataka; Juan-Rodriguez Flores u RNA sekvenciranju; Francisco Santiago u JRFL infekciji *in vitro*; Domenick Falcone u značajnom savetovanju i Nahla Mohamed u pripremi publikacije i slika korišćenih u radu.

Finansijska podrška studije koja je rađena u laboratoriji prof. dr Ronalda Crystal-a je obezbeđena od strane *NIH* grantova R01HL118857, R34HL11735, UL1TR000457 i P50HL084936, Stipendijom JP Smith Clinical Scholar award čiji je nosilac prof. dr Robert Kaner, i *Weill Cornell Medical College* subspecijalizacije iz Pulmologije i Intenzivne nege (*Pulmonary and Critical Care*) u *New York Presbyterian Hospital, Njurok, SAD*

Posebnu zahvalnost za ostvarenje ovog rada dugujem svojoj deci, Milošu i Marku, supruzi dr Jeleni Maletković Barjaktarević, bratu Milanu i roditeljima prof. dr sci med Žarku Barjaktareviću i dr Verici Barjaktarević koji su, svako na svoj način, svojom podrškom, strpljenjem, utrošenim vremenom i energijom, uložili i sebe u ovaj rad.

Naslov:

Uloga Interleukina-23 u prevremenom razvoju emfizema pluća među HIV-1 pozitivnim pušačima

Rezime:

Genska ekspresija matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) je pojačana u alveolarnim makrofagima (AM) HIV-1 pozitivnih pušača obolelih od emfizema pluća. Na osnovu podataka koji ukazuju da supernatant bronhoalveolarnog lavata u plućima HIV-1 pozitivnih pušača sadrži povišene koncentracije inflamatornih citokina u odnosu na ovu tečnost u plućima HIV-1 negativnih pušača, postavili smo hipotezu da povišene koncentracije inflamatornih citokina u populaciji HIV-1 pozitivnih pušača utiču na povišenje koncentracije metaloproteinaza, na taj način dovodeći do ranog razvoja emfizema pluća.

Putem multicitokinske analize, analizirali smo supernatante bronhoalveolarnog lavata 5 različitih fenotipskih grupa: HIV-1 negativnih nepušača, HIV-1 negativnih pušača bez poremećaja disajnih puteva, HIV-1 negativnih pušača sa ranim emfizemom pluća, HIV-1 pozitivnih nepušača i HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća. Pored pojačane ekspresije inflamatornih citokina u plućima pušača zaraženih virusom HIV-1, povišene vrednosti citokina koji indukuju Th-17, pre svega interleukina IL-23, predstavljaju zajedničku karakteristiku HIV-1 pozitivnih nepušača, HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća i HIV-1 negativnih pušača sa ranim emfizemom pluća. Relativna ekspresija IL-23 gena u AM HIV-1 pozitivnih osoba je povišena u odnosu na AM HIV-1 negativnih ispitanika, i značajno je povišena u odnosu na AM HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća. Akutna infekcija HIV-1 virusom *in vitro* dovodi do pojačane ekspresije IL-23 u HIV-1 negativnim AM. Stimulacija kultura AM IL-23 dovodi do pojačane ekspresije MMP-9 gena i pojačane koncentracije MMP-9. S obzirom na to da AM zdravih osoba ne ekspimiraju IL-23 receptor (IL-23R), činjenice da kulture makrofaga prečišćenih adherencijom sadrže izvestan procenat T limfocita i činjenice da dodavanje T

limfocita ovim kulturama pojačava produkciju MMP-9, efekat IL-23 na pojačano lučenje MMP-9 može biti indirektan i zahteva učešće T limfocita u ovom procesu. Uticaj IL-23 na MMP-9 je jedan od mogućih mehanizama koji dovode do ranog razvoja emfizema pluća i ukazuje na mogući uticaj Th-17 indukovanog imunskog odgovora u razvoju ovog fenomena.

Ključne reči:

HIV, alveolarni makrofagi, interleukin-23, matriks metaloproteinaza-9, emfizem, T limfociti, Th-17

Naučna oblast:

Pulmologija, Interna Medicina

Uža naučna oblast:

Imunologija

UDK broj:

Title:

The Role of Interleukin-23 in the Early Development of Emphysema in HIV1+ Smokers

Summary:

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is up-regulated in alveolar macrophages (AM) of HIV1⁺ smokers, who develop emphysema in an accelerated time frame compared to HIV1⁻ smokers. The epithelial lining fluid (ELF) of HIV1⁺ smokers has increased levels of inflammatory cytokines compared to their HIV1⁻ counterparts. To assess the hypothesis that up-regulation of lung cytokines may be functionally related to the increased concentrations of MMP-9, arrays were used to evaluate relative cytokine protein levels in the ELF obtained from 5 groups of individuals: HIV1⁻ healthy nonsmokers, HIV1⁻ healthy smokers, HIV1⁻ smokers with early emphysema, HIV1⁺ nonsmokers, and HIV1⁺ smokers with early emphysema. While several pro-inflammatory cytokines were increased in smoking and HIV1⁺ phenotypes, increased levels of Th17-related cytokines such as IL-23 and IL-17 represented a common finding in HIV1⁻ smokers with early emphysema as well as in HIV1⁺ individuals independently of their smoking history. We further hypothesized that IL-23 is up-regulated in the setting of HIV1 infection and that this pro-inflammatory cytokine may be directly correlated to increased concentrations of MMP-9 in the ELF of HIV1⁺ smokers with early emphysema. Relative gene expression of AM IL-23 is significantly increased in HIV1⁺ individuals, with a trend toward even greater expression in HIV1⁺ smokers with early emphysema. Infection with HIV1 laboratory strain JRFL *in vitro* induced IL-23 expression in normal AM. With the knowledge that AM cultured by the adherence method contain a small number of other cells, including lymphocytes, we hypothesized that in an AM/lymphocyte co-culture system IL-23 would up-regulate MMP-9. Stimulation of AM/lymphocyte co-cultures with IL-23 *in vitro* induced increased MMP-9 gene expression and protein. While AM obtained from healthy individuals do not express IL-23 receptors, T lymphocytes express IL-23R and act as an intermediary to up-regulate AM MMP-9. This

mechanism may contribute to the increased tissue destruction in the lungs of HIV1⁺ smokers and suggests that Th-17 related inflammation may play a role.

Key words:

HIV, alveolar macrophage, Interleukin IL-23, matrix metalloproteinase MMP-9, emphysema, T lymphocytes, Th-17

Field:

Pulmonology

Focus:

Immunology

SADRŽAJ:

Tekst rada

	Strana
1. Uvod	
1.1 Emfizem i Hronična obstruktivna bolest pluća	2
1.2 Metaloproteinaze	4
1.3 Inflamatorne ćelije u COPD	6
1.4 Uloga specifične imunosti u COPD i Th-17 imunski odgovor	7
1.5 HIV-1 infekcija i COPD	12
1.6 Th-17 imunski odgovor u HIV-1 infekciji	13
2. Ciljevi istraživanja	15
3. Materijali i Metode	17
3.1 Koncept studije	17
3.2 Ispitanici	17
3.3 Video bronhoskopija	21
3.4 Izolacija supernatanta BAL i ćelijske kulture	22
3.5 Izolacija alveolarnih makrofaga	23
3.6 Izolacija T ćelja	24
3.7 Eseji sa funkcionalnim antitelima	25
3.8 Protočna citofluorimetrijska analiza	27
3.9 Merenje koncentracije citokina u koncentrisanoj tečnosti BAL ili u medijumu ćelijskih kultura	27
3.10 ELISA metoda za merenje koncentracije citokina	29
3.11 Izolacija RNK	29
3.12 Reverenza transkripcija cDNK	30
3.13 Analiza genske ekspresije	32
3.14 DNK mikročip analiza i ekspresija IL-23 u alveolarnim makrofagima ..	34
3.15 Ćelijske kulture	34
3.16 Merenje koncentracije MMP-9 u medijumu ćelijskih kultura	35

3.17	<i>Infekcija makrofaga sa HIV1 virusom in vitro.</i>	35
3.18	<i>Citokinska stimulacija ćelijskih kultura.</i>	35
3.19	<i>Statistička analiza</i>	36
4.	Rezultati	37
4.1	<i>Multicitokinska analiza tečnosti BAL.</i>	37
4.2	<i>DNK mikročip analiza i ekspresija IL-23 u alveolarnim makrofagima</i>	40
4.3	<i>Koncentracija IL-23 u invitro kulturama AM.</i>	41
4.4	<i>HIV-JRFL virus infekcija AM in vitro.</i>	43
4.5	<i>In vitro stimulacija alveolarnih makrofaga kombinacijom Th-17 indukujućih citokina ili lipopolisaharidom (LPS) indukuje ekspresiju gena za IL-23.</i>	44
4.6	<i>Efekat IL-23 stimulacije AM na pojačanu gensku ekspresiju MMP-9</i>	46
4.7	<i>Efekat IL-23 stimulacije AM na pojačanu koncentraciju MMP-9 u medijumu ćelijskih kultura.</i>	48
4.8	<i>Efekat IL-23 blokirajućeg antitela p40 na pojačanu sekreciju MMP-9 u kulturama AM stimulisanim sa IL-23</i>	50
4.9	<i>AM ne eksprimiraju membranski receptor IL-23R.</i>	51
4.10	<i>Efekat IL-23 na AM nije direktan već moguća posledica prisustva ćelija koje indirektno utiču na AM.</i>	54
4.11	<i>Prečišćeni AM stimulisani sa IL-23 citokinom ne pokazuju pojačanu ekspresiju MMP-9.</i>	56
4.12	<i>Uloga T-ćelija u IL-23 indukovanoj pojačanoj ekspresiji MMP-9.</i>	57
4.13	<i>Ekspresija IL-23R na T-ćelijama.</i>	59
4.14	<i>Mitogenom aktivirani T limfociti reaguju pojačano na stimulaciju interleukinom IL-23.</i>	61
4.15	<i>Efekat dodavanja prečišćenih T-ćelija ko-kulturama AM-limfocita stimulisanih IL-23 citokinom.</i>	62
4.16	<i>Poređenje ekspresije MMP-9 u AM i T-ćelijama izolovanim iz bronhoalveolarnog lavata.</i>	64

4.17	<i>Efekat titracije procenta prisutnih T-ćelija u ko-kulturama AM-limfocita.....</i>	66
4.18	<i>Interferon-gamma kao mogući posredujući citokin između T-ćelija i AM koji pojačano proizvode MMP-9.....</i>	68
4.19	<i>Ekspresija CD-40L liganda na T-ćelijama</i>	70
5.	Diskusija.....	71
6.	Zaključci.....	79
7.	Spisak skraćenica.....	81
8.	Literatura	83

1. UVOD

Uvođenjem anti-retrovirusne terapije (ARV) u lečenju osoba inficiranih HIV-1 virusom, životni vek obolelih i broj infektivnih komplikacija uzrokovanih deficijencijom imunskog sistema se značajno smanjio. Istovremeno, spektar hroničnih oboljenja u ovoj populaciji je značajno proširen tokom protekle decenije. Brojne studije su pokazale povećanu incidencu oboljevanja od određenih maligniteta, plućne arterijske hipertenzije (prema grupisanju Svetske zdravstvene organizacije grupa I), hronične bubrežne insuficijencije i srčanih oboljenja [1-6]. Pored ostalog, HIV-1 pozitivni pušači imaju povećan rizik oboljevanja od različitih hroničnih oboljenja pluća [7], a posebno hronične obstruktivne bolesti pluća (COPD) [8, 9]. Prve studije, objavljene još 1992. ukazale su na povezanost dugotrajne infekcije HIV-om i emfizema pluća [10]. U studiji objavljenoj nekoliko godina kasnije od strane iste grupe autora, upoređivanjem nalaza kompjuterizovane tomografije (CT) pluća, *Diaz i saradnici* su pokazali da, za razliku od HIV-1 negativnih pacijenata među kojima je učestalost emfizema pluća oko 2%, u populaciji HIV-1 pozitivnih pacijenata je ovaj procenat daleko viši, čak 15% [11].

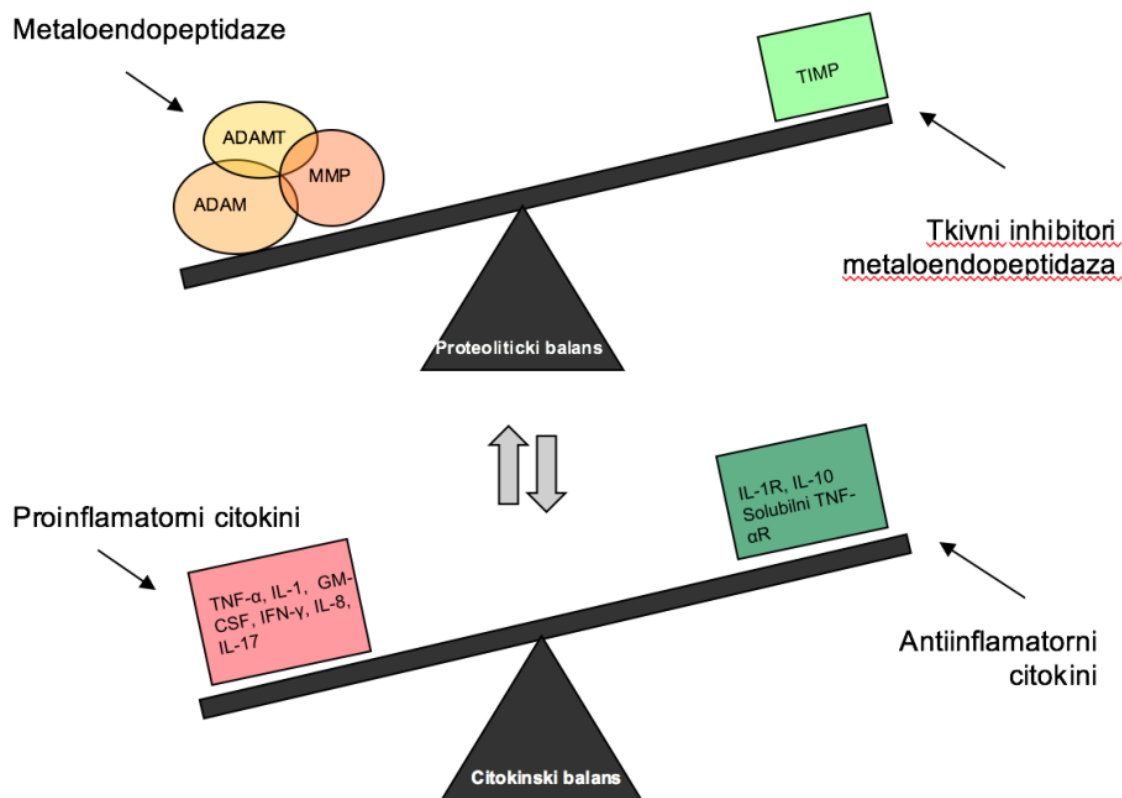
Najveća studija koja je ukazala na jasnu povezanost HIV infekcije i razvoja emfizema pluća je obavljena u populaciji američkih vojnih veterana (*Veterans Aging Cohort 5 Site Study*) [9]. Ova studija je identifikovala HIV-1 infekciju kao značajan faktor za razvoj COPD, pre svega emfizema, nezavisno od starosti, rase i etničke pripadnosti kao ni od godina pušačkog staža, istorije korišćenja narkotika ili alkoholizma. Prema ovoj studiji, HIV-1 pozitivni pušači imaju 50% povišene šanse da obole od emfizema pluća. Pored pojačanog rizika za razvoj COPD, HIV-1 infekcija ubrzava deterioraciju plućne funkcije kod HIV pozitivnih osoba sa COPD i neke od skoro objavljenih studija [12] ukazuju na potrebu skrininga u cilju ranog otkrivanja COPD u populaciji HIV-1 pozitivnih pušača. Na osnovu svih ovih informacija, Američko Torakalno Udruženje (*American Thoracic Society*) je 2010. godine izdalo zvanično saopštenje u kome se HIV infekcija navodi kao nezavisan faktor rizika za razvoj COPD.

1.1 Emfizem i hronična obstruktivna bolest pluća

Hronična obstruktivna bolest pluća, (engl. *chronic obstructive pulmonary disease* - COPD), predstavlja heterogeni skup hroničnih patoloških promena na plućima koji uključuje oboljenje proksimalnih i distalnih disajnih puteva (bronhitis i bronhiolitis) i plućnog parenhima (emfizem) koji nastaju pod uticajem toksičnog dejstva iritantnih gasova ili inhaliranih čestica [13]. Klinički posmatrano, COPD je definisana na osnovu spirometrijske analize koja pokazuje obstrukciju disajnih puteva koja nije u potpunosti reverzibilna [14]. Iako na spirometrijskim vrednostima zasnovan koncept dijagnoze COPD može biti praktičan iz kliničke perspektive, jasno je da je takav pristup i rigidan, jer onemogućava ranu terapiju osobama u čijim plućima postoje značajne promene uzrokovane duvanskim dimom koje će kasnije dovesti do razvoja klinički evidentnog COPD. Tokom poslednjih godina sve više pažnje je usmereno ka ranoj detekciji i ranoj terapiji promena na plućima u fazi pre nego što je obstruktivna bolest pluća razvijena, pre svega zbog velikog značaja ove bolesti u pogledu opšteg morbiditeta i mortaliteta ljudi obolelih od COPD [15]. U tom smislu, pravilno tumačenje ranih simptoma [16] zajedno sa detektovanjem ranih emfizematoznih promena i hroničnog zadebljanja disajnih puteva na kvantitativnoj CT sken analizi [17] ili praćenje stepena sniženja kapaciteta membranske difuzije [18] dobija sve više na značaju u globalnoj borbi protiv ove bolesti [16, 19]. Na globalnom nivou, COPD je jedna od najsmrtonosnijih bolesti obzirom da predstavlja četvrti po učestalosti uzrok smrti u svetu, uz tendenciju ka povećanju prevalencije tokom narednih godina [20]. Iako je tačan mehanizam nastanka emfizema pluća još uvek nedovoljno jasan, brojna istraživanja pokazala su da u ovom procesu značajnu ulogu igraju mehanizmi urođene i stečene imunosti koji dovode do stanja hronične lokalne inflamacije uz učešće brojnih citokina, prisustvo disbalansa između *proteaza* i njihovih inhibitora, *anti-proteaza* u plućnoj mikrosredini, kao i odnos oksidantnih and antioksidantnih jedinjenja [21, 22].

Poremećen odnos proteaznih enzima i njihovih inhibitora dovodi do razlaganja vezivnog tkiva, pre svega elastina, što predstavlja jedan od ključnih mehanizama za

razvoj emfizema pluća. Ova teorija je podržana činjenicom da u eksperimentalnim životinjskim modelima, aplikacija elastaze u plućima laboratorijskih životinja dovodi do razvoja emfizema [23, 24]. Takođe, prisustvo papaina u plućima dovodi do sličnog efekta [25]. Jedan od primera koji potvrđuje da proteazno-antiproteazni disbalans dovodi do emfizema pluća je *Sindrom deficijencije α -1-antitripsina*, jednog od glavnih anti-proteaznih enzima. Još pre više od pola veka, pokazano je da nedostatak ovog enzima dovodi do razvoja emfizema pluća i kliničkog sindroma plućne insuficijencije [26], a purifikovani humani α -1 anti-tripsin se već godinama koristi u lečenju odmaklih stadijuma emfizema među pacijentima sa nedostatkom ovog enzima [27]. Uticaj spoljašnjih faktora takođe može biti neophodni stimulans koji dovodi do proteazno-antiproteaznog disbalansa. Duvanski dim u plućima se smatra jednim od glavnih induktora infiltracije plućne mikrosredine inflamatornim ćelijama; ove ćelije tada proizvode proteazne enzime čija aktivnost u tom slučaju dominira u odnosu na aktivnost anti-proteaza [28].



Slika 1: Proteolitički balans u plućima: Dejstvo tkivnih inhibitora metaloendopeptidaza unosi ravnotežu u odnosu na proteolitički potencijal metaloendopeptidaza kao što su matriksne metaloproteinaze (MMP). Promene u koncentracijama proinflamatornih i antiinflamatornih citokina oslikavaju poremećaj proteazno-antiproteaznog balansa u organizmu.

1.2 Metaloproteinaze

Pedeset procenata proteazne aktivnosti u alveolarnoj mikrosredini potiče od strane matriksnih metaloproteinaza (MMP) [29]. Metaloproteinaze predstavljaju grupu matriks-proteinaznih enzima koji razgrađuju ekstraćelijski matriks. Ova grupa enzima se sintetiše u latentnoj formi (zimogeni) i oslobadja u ekstraćelijski matriks u

formi proenzima koji zahtevaju aktivaciju pre ispoljavanja svog dejstva. Ovi enzimi su podeljeni u subklase prema specifičnosti i strukturnim razlikama na: kolagenaze (MMP-1, 8, 13), stromelizine (MMP-3,10,11), matrilizine (MMP-7), želatinaze (MMP-2, 9) [30]. Značaj MMP prevazilazi prostu razgradnju ćelijskog matriksa obzirom da ovi enzimi igraju važnu ulogu u procesuiranju različitih bioaktivnih molekula [30-32]. MMP mogu da učestvuju u obradi ćelijskih receptora, aktivaciji i deaktivaciji citokina i hemokina kao i oslobađanju apoptotskih liganda. Samim tim, ovi enzimi direktno utiču na ćelijsku proliferaciju, migraciju, diferencijaciju, apoptozu i imunski odgovor. Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) predstavljaju grupu specifičnih endogenih inhibitora metaloproteinaza koji, u patološkim uslovima disregulisane aktivnosti MMP, igraju važnu ulogu u neutralizaciji aktivnosti metaloproteinaza [33].

Želatinaza MMP-9 (takođe poznata kao želatinaza B – GELB) razgrađuje proteine kao što su kolagen tipa IV, elastin, vitronektin, ali i druge proteine koji nisu strukturni delovi matriksa, kao što su hemokini [34, 35]. Konstitutivna ekspresija gena za MMP-9 je karakteristična za neutrofile, makrofage, endotelne ćelije, ali je poznato da je ovaj gen inducibilan u endotelnim ćelijama, fibroblastima itd. MMP-9 je prisutna u malim koncentracijama u normalnim plućima, međutim njen nivo je značajno povišen u različitim plućnim oboljenjima kao što su astma, idiopatska plućna fibroza (IPF) i COPD [34]. Takođe, još jedna značajna uloga MMP-9 je u njenom doprinosu razvoju tumora, angiogenezi, invaziji okolnih tkiva i metastaziranju [36]. Na osnovu studija na miševima deficijntnim za MMP-9, ova proteinaza igra ulogu u migraciji ćelija epitla bronhija, destrukciji i permeabilosti alveola [34].

Patohistološki gledano, ireverzibilni gubitak alveolarnih površina i gubitak plućnog elastina predstavljaju osnovnu karakteristiku emfizema pluća. MMP-9, zajedno sa MMP-2 i MMP-12, razgrađuje elastin. Pušači sa ranim emfizemom pluća imaju povećan broj neutrofila i aktiviranih makrofaga u tečnosti bronhoalveolarnog lavata (BAL), a stepen opadanja plućne funkcije direktno koreliše sa povećanim

prisustvom obe pomenute vrste ćelija [37]. MMP-9, kao elastolitički enzim sekretovan od strane i makrofaga i neutrofila, ima veliki značaj u razvoju emfizema pluća.

Povišen nivo MMP-9 u tečnosti bronho-alveolarnog lavata je dokazan među pušačima i pušačima sa emfizemom pluća [29, 38, 39]. Ispitivanjem makrofaga izolovanih iz pluća pušača, pokazano je da duvanski dim pojačava produkciju MMP-9 u ovim ćelijama [40]. Činjenica da su povišene koncentracije MMP-9 prisutne u mikrosredini emfizematoznih pluća ne znači da MMP-9 igra samo negativnu ulogu u razvoju emfizema; mogućnost kompleksne uloge MMP-9 u modulaciji drugih enzima i citokina je značajan i ova uloga može biti suštinski značajna u procesima destrukcije i popravke tkiva pluća [34]. U skladu sa tim, stoji i podatak da povišene koncentracije MMP korelišu sa citokinskim disbalansom koji rezultuje u povišenoj koncentraciji inflamatornih citokina [32, 41].

1.3 Inflamatorne ćelije u COPD

Hronična inflamacija respiratornog sistema u COPD se karakteriše akumulacijom neutrofila, makrofaga i limfocita, posebno u distalnim disajnim putevima [42]. Tečnost bronho-alveolarnog lavata pluća pušača sadrži povišen broj ćelija u odnosu na BAL nepušača [43]. Najveći procenat leukocita koji infiltrišu bronhijalni epitel i submukozu čine mononuklearne ćelije koje se sastoje prevashodno od makrofaga i T limfocita, dok neutrofil predstavlja manji procenat [13]. Pojačano prisustvo neutrofila u tečnosti BAL je uobičajeno među pušačima [28], međutim funkcionalni status ovih ćelija može biti kompromitovan u određenim situacijama [42]. Pojačano prisustvo eozinofila se mnogo češće susreće među osobama obolelim od astme, i karakteriše astma-COPD *overlap syndrome* (ACOS), međutim ova pojava nije neuobičajena u plućima pušača sa COPD i često koreliše sa dobrim kliničkim odgovorom na terapiju steroidima [44].

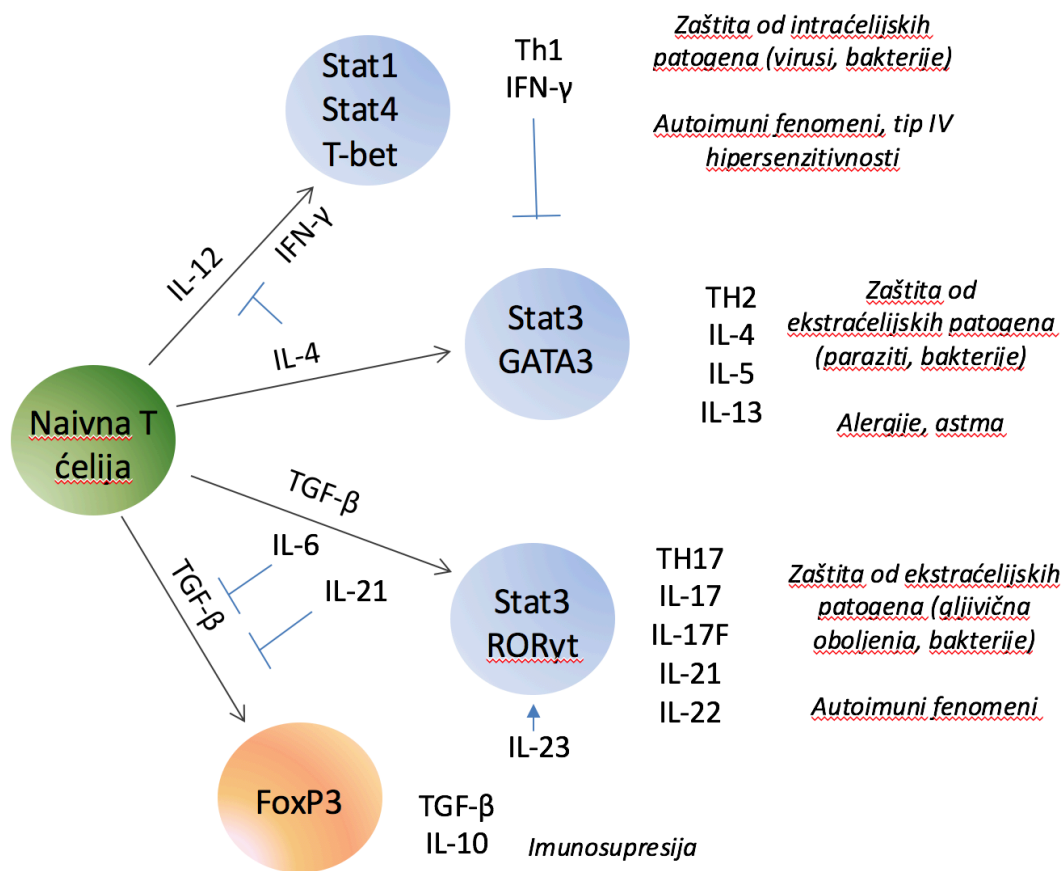
Alveolarni makrofagi (AM) predstavljaju procentualno najbrojnije (oko 90%) ćelije u tečnosti BAL nepušača i istovremeno predstavljaju glavne i neposredne izvršioce urođenog imunskog odgovora [45]. U BAL tečnosti pušača sa emfizemom pluća njihov procenat može biti smanjen u korist limfocita ili neutrofila, međutim apsolutni broj ovih ćelija je i dalje višestruko povećan, a njihov broj koreliše sa stepenom uznapredovalosti COPD [13]. Ove ćelije predstavljaju osnovu nespecifične odbrane pluća, to jest, imaju ulogu glavnih čuvara alveolarno-krvne barijere od respiratornih patogena. Alveolarni makrofagi mogu da eliminišu male čestice tipičnih mikroorganizama koji u normalnim uslovima bivaju svakodevno aspirirani. Ova eliminacija patogena odvija se putem fagocitoze i intraćelijskog ubijanja mikroba ili putem produkcije kiseoničnih metabolita, lizozima, antimikrobnih peptida i proteaza. U slučaju susretanja velikog broja infektivnih čestica ili vrlo virulentnih patogena koji ne mogu biti neutralisani od strane samih alveolarnih makrofaga, ove ćelije se aktiviraju i sekretuju brojne citokine, hemokine, metabolite arahidonične kiseline i metaloproteinaze, na taj način angažujući druge vrste ćelija i inicirajući aktivaciju odgovora sistema stečene i urođene imunosti.

1.4 Uloga specifične imunosti u COPD i Th-17 imunski odgovor

T-ćelije igraju značajnu ulogu u razvoju emfizema pluća [46] ukazujući na značaj sistema stečene imunosti u ovom procesu. Odnos CD8+ and CD4+ T limfocita je promenjen u korist CD8+ ćelija [47], a broj regulatornih T-ćelija i ekspresija FoxP3 proteina su uvećani u ćelijama izolovanim putem BAL [48, 49]. T limfociti izolovani iz sputuma pušača su aktivirani i mogu da sekretuju TNF- α , perforine i granzime [50].

CD4+ T limfociti se, nakon aktivacije i sazrevanja, razvijaju u različite T-ćelijske podtipove sa specifičnim citokinskim profilom i efektornim ulogama. Sve do nekoliko godina unazad, postojalo je uverenje da su efektorske T-ćelije podeljene na Th-1 i Th-2 podtip na osnovu svojih funkcija i spektra citokina koje sekretuju

{Harrington, 2006 #65}, pri čemu je COPD generalno smatran za oboljenje karakterisano pretežno Th-1 imunitetom. Regulatorne T-ćelije, CD4+CD25+FoxP3+ su po citokinskom profilu koji dovodi do njihove diferencijacije donekle slične Th17 ćelijama, a istovremeno antagonizuju Th-17 ćelije [51-53]{Oukka, 2007 #240}. Razvoj Th-17 imunskog odgovora inhibira diferencijaciju T-regulatornih ćelija tako da je poremećen odnos ova dva sistema identifikovan u mnogim hroničnim patološkim stanjima. Diferencijacija Th-17 ćelija je zavisna o TGF- β (kao i diferencijacija T regulatornih ćelija), IL-1 β , IL-6 i verovatno IL-21. Rast i stabilizacija Th-17 imunskih ćelija je zavisna o IL-23, kao i transkripcionim faktorima STAT-3, ROR γ t i ROR α [52, 53]. Citokini koji stimulišu razvoj Th-1 ćelija kao što su IFN- γ i IL-4, inhibiraju diferencijaciju Th-17 ćelija [52, 54]. Th-17 ćelije proizvode interleukine IL-17F, IL-17A i IL-22 koji igraju značajnu efektorsku ulogu u procesima inflamacije tkiva u akutnim infekcijama, no isto tako igraju značajnu ulogu u procesima inflamacije tokom autoimunskih procesa. Th-17 ćelije sekretuju interleukin IL-21 koji predstavlja jedan od značajnih citokina kojim Th-17 ćelije komuniciraju sa ostalim ćelijama imunskog sistema.



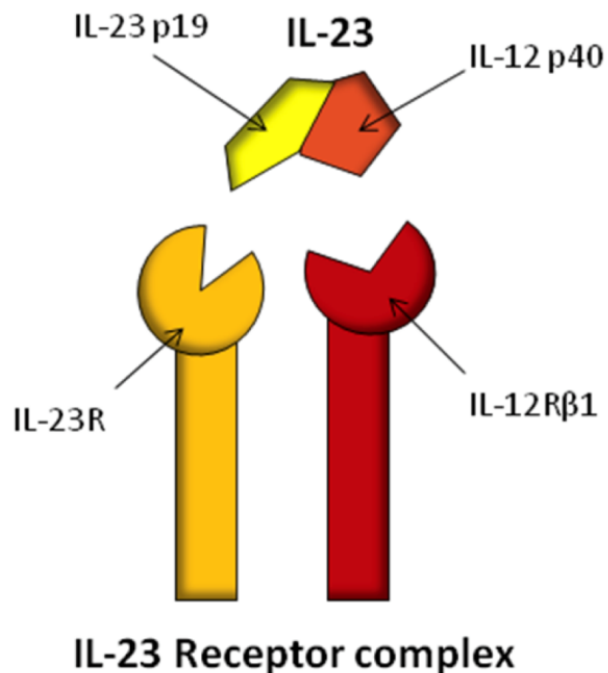
Slika 2: Th ćelijski imunski odgovor: Pored Th-1 (prethodno označen kao Tip I) i Th-2 (prethodno Tip II), i Th-17 i FoxP3 (T-regulatorni) su prepoznati kao putevi specifičnog razvoja i sazrevanja CD4 T limfocita. Kao posledica izlaganja organizma infektivnim agensima ili različitim stimulansima imunskog sistema, T-ćelije se diferenciraju u jedan od ovih odgovara, na taj način angažujući različite citokine koji dalje aktiviraju različite ćelije sistema urođene ili stečene imunosti.

Značaj Th-17 imunskog odgovora je prvobitno opisan u patološkim stanjima kao što su multipla skleroza i eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), psorijaza, reumatoidni artritis ili Kronova bolest [55]. Daljim istraživanjem je utvrđena uloga Th-17 ćelijskog imunskog odgovora na nivou antibakterijske imunosti na epitelnim i mukoznim barijerama [56]. Th-17 ćelije imaju ulogu u

aktivaciji, regrutaciji i migraciji neutrofila. Sistemski nedostatak Th-17 ćelija vodi do razvoja oportunističkih infekcija [57-60]. Snažna indukcija inflamacije od strane Th-17 ćelija može biti umešana u karcinogenezu [61]. Prethodno otkriću Th-17 ćelija, mnogobrojni efekti hronične inflamacije bili su pripisani inteleukinu IL-12 koji karakteriše Th-1 odgovor. Saznanjem da *p40*, jedan od dva molekula koji čine IL-12, u kombinaciji sa molekulom *p19* čini interleukin IL-23, postalo je očigledno da neki od efekata prethodno pripisivani su IL-12 ustvari efekti IL-23 [62]. Pored zajedničke subjediniče, IL-23 i IL-12 dele i neke zajedničke funkcije: oba citokina su sekretovana od strane dendritskih ćelija i makrofaga u odgovor na različite endogene signale [63], sa tim da IL-12 indukuje razvoj Th-1 imunskog odgovora, a IL-23 igra značajnu ulogu u ekspresiji i lučenju pro-inflamatornog citokina IL-17. Na osnovu istraživanja u oblasti EAE, koji predstavlja mišiji model multiple skleroze, utvrđeno je da IL-23 igra značajnu ulogu u održavanju hronične inflamacije [64], a daljim istraživanjem je njegova uloga potvrđena u drugim inflamatornim stanjima kao što su artritis, intestinalna inflamacija i psorijaza [65-67].

IL-23 je važna veza između urođene i stečene imunosti. Iako tačna funkcija ovog citokina nije u potpunosti objašnjena, izvesno je da nedovoljna ekspresija IL-23 može dovesti do neadekvatnog imunskog odgovora u odbrani organizma od brojnih patogena [58, 68], dok prekomerna ekspresija ovog citokina može dovesti do brojnih autoimunskih fenomena. Veoma pojačana ekspresija *p19* gena u transgenim miševima dovodi do zaostajanja u razvoju, sistemske inflamacije, infertiliteta i smrti pre 3 meseca starosti [69]. IL-23 je eksprimiran i sekretovan od strane aktiviranih makrofaga i dendritskih ćelija. IL-23 receptor (receptor za *p19* subjedinicu) je eksprimiran od strane memorijskih ali ne i naivnih T-ćelija. Alveolarni makrofagi eksprimiraju IL-23 nakon što su izloženi antigenima mikobakterija, što može ukazati na imunostimulatornu ulogu ovog citokina tokom akutne infekcije [70]. Uloga IL-23 u patologiji plućnih bolesti nije dovoljno razjašnjena, ali je izvesno da igra određenu ulogu u interakciji sa Th-2 odgovorom u regulisanju aktivnosti alergijske astme [71], tuberkuloze [72], *Mycoplasma pneumoniae* infekciji [73],

hroničnoj infekciji mukoidnim *Pseudomonas aeruginosa* u cističnoj fibrozi [74], karcinoma pluća [75, 76] i sarkoidozi [77].



Slika 3: Interleukin 23 se sastoji od dve subjedinice, p40, koju ovaj citokin deli sa IL-12, i p-19, specifičnom za IL-23. Receptor za IL-23 se takođe sastoji od dve subjedinice od kojih je jedna, IL-12R β 1 zajednička za ovaj citokin i IL-12

COPD je tradicionalno smatrana za hronično inflamatorno stanje vezano za Th-1 imunski odgovor. Iako značaj uloge Th-17 imunosti u razvoju COPD nije detaljno utvrđen do današnjeg dana, izvesno je da COPD predstavlja poremećaj ne samo Th-1 imunog sistema, već uključuje i disbalans sistema urođene imunosti, kao i odnosa T-regulatornih i Th-17 ćelija. Tokom prethodnih godina, istraživanja su pokazala da su nivoi IL-17 citokina povišeni među COPD pacijentima [53, 78, 79]. Takođe, u eksperimentima u kojima su miševi izloženi duvanskom dimu, nivoi IL-17 bili su povišeni u serumu; genetski modifikovani miševi bez IL-17 gena (*knock-out*) su zaštićeni od razvoja emfizema pluća pod uticajem duvanskog dima [78]. Intranazalna aplikacija IL-23 u mišjim modelima čega pojačava nivoe MMP-9 u

supernatantima tečnosti BAL, a alveolarni makrofagi ovih miševa pojačano eksprimiraju IL-17 [80].

In vitro, patogene bakterije poput *Haemophilus* ili *Moraxella species* indukuju 3-5 veću produkciju IL-23 od strane plućnih dendritskih ćelija u odnosu na standardnu nepatogenu bakterijsku floru [81], što ukazuje na mogućnost da hronična kolonizacija patogenim bakterijama vodi do pojačanja inflamacije, što dalje dovodi do razvoja COPD ili čak karcinoma pluća [82, 83].

1.5 HIV-1 infekcija i COPD

Postoje brojne teorije koje objašnjavaju uticaj HIV-a na ubrzani razvoj COPD među obolelim pušačima. Određena grupa autora je sklona da razvoj COPD u ovoj populaciji pripiše infekcijama od kojih HIV oboleli pacijenti oboljevalju; prema nekim od ovih hipoteza, plućne infekcije dovode do multiplih epizoda inflamacije i povrede plućnog tkiva što dovodi do razvoja COPD [84]. Među sličnim hipotezama, interesantna je ona koja kontinuiranu kolonizaciju disajnih puteva sa *Pneumocystis Jiroveci* povezuje sa kontinuiranom inflamacijom koja doprinosi razvoju COPD [85]. Druga grupa autora veruje da sama HIV-1 infekcija doprinosi kontinuiranom inflamatornom stanju u disajnim putevima zbog povišenog relativnog broja CD8+ T ćelija i povišenih koncentracija IFN- γ [86], ili poremećenog balansa antioksidantnih materija [87] ili putem indukovanja apoptoze endotelnih ćelija [88].

Izvesno je da alveolarni makrofagi igraju značajnu ulogu u HIV-1 infekciji. Pre svega, AM su podložni infekciji HIV-1 zbog činjenice da na svojoj površini eksprimiraju CD4, CCR5 i CXCR4 receptore koji omogućuju ulazak HIV-1 u ćeliju [89]. Iako je procenat HIV-1 inficiranih AM kod osoba sa dobro kontrolisanom hroničnom HIV-1 infekcijom ustvari relativno mali [89], izvesno je da je fagocitna sposobnost inficiranih AM delimično kompromitovana [90-92]. Snižena ekspresija CD206 i HLA-DR koja je posledica infekcije AM HIV-1 virusom je jedno od mogućih objašnjenja

modifikovane funkcionalnosti AM kod zaraženih osoba. Takođe, povišeni nivoi TNF- α koji predstavljaju posledicu snižene fosforilacije ERK1/2 mogu da kompromituju adekvatnost imunskog odgovora na bakterijsku infekciju [93].

Na osnovu objavljenih podataka izvesno je da matriksne metaloproteinaze doprinose razvoju patološkim promenama u različitim organima uzrokovanim HIV-infekcijom i to putem remodelovanja ekstraćelijskog matriksa [94]. MMP su povezane sa patogenezom Kapoši sarkoma, učestvuju u razvoju dentalne patologije, HIV nefropatije, kao i mogućim procesima angiogeneze i tumorskog napredovanja. HIV-1 inficirani makrofagi pokazuju indukciju ekspresije MMP-9 i MMP-12 u poređenju sa neinficiranim AM [95]. Na modelu HIV-indukovane encefalopatije kod pacova, pokazano je da *gp120* utiče na pojačanu ekspresiju MMP-2 i MMP-9 u kojim ćelijama [96]. Prema prethodno publikovanim podacima iz laboratorije u kojoj je i ova studija rađena (dr Ronald Crystal laboratorija, *Weill Cornell Medical College*, Njujork, SAD), koncentracija MMP-9 u *tečnosti alveolarnog lavata*, kao i genska ekspresija MMP-9 u kojim uzorcima su značajno povećane kod HIV-1 pozitivnih pušača sa emfizemom pluća u odnosu na HIV-1 negativne pušače sa emfizemom pluća [38].

1.6 Th-17 imunski odgovor u HIV-1 infekciji

Izvesno je da Th-17 imunski odgovor igra značajnu ulogu u organizmu inficiranom HIV-1 virusom. Istraživanje uloge ovog odgovora na ljudima su pokazala da nedostatak Th-17 ćelija dovodi do diseminacije patogena iz gastrointestinalnog trakta i progresije HIV infekcije [97]. Th-17 ćelije su lokalizovane u mukozi pluća i creva, a HIV-1 infekcija vodi do značajnog gubitka Th-17 ćelija u ovim tkivima [98, 99]. I pored toga, izvesno je da totalni broj CD4+ ćelija u *tečnosti BAL* nije smanjen u plućima obolelih od HIV-1 u odnosu na pluća zdravih ljudi [100, 101]. Poznato je da IL-17 indukuje produkciju MMP-9 u želudačnoj mukozi *in vitro*, a IL-17 blokirajuće

antitelo, odnosno IL-17RO *knock-out* genetski modificirani miševi imaju snižene nivoe MMP [97, 102].

Na osnovu ovih podataka koji ukazuju na mogući značaj Th-17 imunskog odgovora u razvoju COPD i evoluciji HIV-1 infekcije, odlučili smo da ispitamo mogućnost združenog efekta ovih patoloških stanja koje vodi do ubrzanog razvoja emfizema među HIV-1 obolelim pušačima kao i ulogu Th-17 imunskog odgovora u ranom razvoju ove bolesti. U cilju određivanja uloge različitih fenotipskih karakteristika koje mogu da utiču na nivoe MMP-9 u plućima HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća, odlučili smo da analiziramo citokinski profil BAL među osobama koji predstavljaju pet fenotipskih grupa: HIV-1 negativne nepušače (NP), HIV-1 pozitivne nepušače (H+NP), HIV-1 pušače (P), HIV-1 negativne pušače sa ranim emfizemom pluća (PRE) i HIV-1 pozitivne pušače sa ranim emfizemom pluća (H+PRE) i uporedimo eventualne razlike među ovim fenotipovima.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Činjenica da potvrda HIV-1 pozitivnog serološkog statusa ne predstavlja “smrtnu presudu” kao što je to bio slučaj do nekoliko godina unazad, otvorila je mogućnost observacije dugotrajnih posledica HIV infekcije i povišene incidence različitih hroničnih oboljenja. HIV-1 pozitivni pušači imaju pojačanu predispoziciju ka razvitku emfizema pluća u odnosu na pušače sa istim nivoom izloženosti duvanu koji su HIV-1 negativni, čak i kada se svi faktori uticaja spoljne sredine i životnog stila uzmu u obzir. Pošavši od dostupnih podataka koji ukazuju da su proteazni i citokinski balans kompromitovani kod ovih osoba, t.j. činjenice da supernatanti bronhoalveolarnih lavata ovih osoba sadrže povišene koncentracije metaloproteinaza i različitih, pre svega Th-17 indukujućih citokina, odlučili smo da istražimo uzročno-posledičnu vezu između ovih fenomena. Ovim su postavljeni sledeći ciljevi:

- Istražiti etiologiju i molekularno-biološku osnovu ranog razvoja emfizema pluća među HIV-1 pozitivnim pušačima
- Utvrditi citokinski profil i razlike u prisustvu citokina među različitim kliničkim fenotipovima koji uključuju nepušače, pušače i pušače sa ranim emfizemom koji su HIV-1 pozitivni ili HIV-1 negativni
- Utvrditi osnovu citokinskog disbalansa koji dovodi do pojačanog prisustva MMP-9 u plućima HIV-1 pozitivnih pušača
- Utvrditi ulogu Th-17 imunskog odgovora u razvoju emfizema pluća među HIV-1 inficiranim pušačima
- Utvrditi mogući uticaj i mehanizam dejstva IL-23 na produkciju MMP-9 u alveolarnim makrofagima

Da bismo ostvarili ove ciljeve, formulisali smo radne hipoteze:

1. *Infekcija virusom HIV-1 koreliše sa pojačanim inflamatornim odgovorom u alveolarnoj mikrosredini pluća*
2. *Citokini koji karakterišu stanje hronične inflamacije putem Th-17 imunskog odgovora igraju značajnu ulogu u ovom procesu*
3. *IL-23, jedan od ključnih citokina koji karakterišu razvoj Th-17 imunskog odgovora, pojačano je prisutan u plućima HIV-1 pozitivnih pušača u odnosu na HIV-1 negativne pušače*
4. *Prisustvo IL-23 ima direktan uticaj na pojačanu produkciju MMP-9 u plućima HIV-1 pozitivnih pušača*
5. *Citokinski disbalans koji dovodi do povišenih koncentracija IL-23 doprinosi ranom razvoju emfizema pluća medju HIV-1 pozitivnim pušačima putem pojačane ekspresije MMP-9*

3. MATERIJAL I METODE:

3.1 Koncept studije

Studija je sponzorirana od strane Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država (NIH, *National Institute of Health*), odobrena je od strane *Weill Cornell* Institucionalnog Etičkog Odbora za nadgledanje kliničkog istraživanja (*Institutional Review Board*, IRB) i sprovedena je u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Ova translaciona studija uključuje višegodišnju analizu promena u plućnoj mikrosredini među pušačima. Ispitanici različitih kliničkih fenotipova su podvrgnuti serijskim bronhoskopijama kojima su sakupljeni uzorci BAL tečnosti. Eksperimentalne procedure su rađene pri Institutu za Genetiku, *Weill Cornell Medical College* u Njujorku, SAD u periodu 2007 - 2016.

3.2 Ispitanici

Svi kandidati za učešće u studiji su evaluirani pri *Weill Cornell NIH* Centru za klinička i translaciona istraživanja i Centru za kliničko istraživanje Katedre za genetsku medicinu ovog Univerziteta. Etički odbor ustanove (*IRB broj 1204012331, "Collection of Airway, Blood and/or Urine Specimens from Subjects for Research Studies"*) je prethodno odobrio sve protokole korišćene u studiji. Nakon što je svaki pacijent detaljno upoznat sa svim postupcima i rizicima učešća u studiji, dobrovoljni obavešteni pristanak je dobijen potpisom pacijenta u prisustvu svedoka.

U okviru evaluacije kandidata, svaki potencijalni ispitanik je prošao niz testova kojima smo utvrdili podobnost za dalje učešće u projektu. Uzimanjem detaljne anamneze, kandidati trenutno oboleli od akutnih plućnih infekcija, tumora, loše kontrolisane HIV-1 infekcije ili drugih značajnih hroničnih oboljenja su eliminisani iz daljeg učešća u studiji. Aktivno kozumiranje inhalacionih ili intravenskih droga,

konzumiranje značajnih količina alkohola ili značajna istorija izlaganja inhalacionim iritansima ili okupacionim hazardima su takođe bili razlozi za eliminaciju iz dalje participacije u studiji. Svaki ispitanik je prošao detaljan lekarski pregled uz analizu osnovnih laboratorijskih testova, test plućne funkcije, elektrokardiogram i radiološki pregled pluća. Na ovaj način su isključena druga aktivna oboljenja i utvrđena sposobnost ispitanika da toleriše invazivne procedure kao što je bronhoskopija dok su, istovremeno, ispitanici stratifikovani u različite grupe na osnovu, prema prethodno utvrđenim kriterijumima prepoznatih kliničkih fenotipova. Analiza krvi je uključivala kompletnu krvnu sliku, parametre koagulacije, elektrolite uključujući testove bubrežne i hepatske funkcije, HIV-1 status i, u slučaju pozitivnog testa, broj virusnih čestica i broj CD4+ ćelija, hepatitis skrining (A, B i C), anti-nuklearna antitela, sedimentaciju i reumatoidni faktor. Pušački status je verifikovan i usklađen prema nivou nikotina i njegovog derivata kotinina u urinu, kao i nivou karboksihemoglobina u krvi. Testovi plućne funkcije su rađeni i tumačeni prema preporuci Američkog torakalnog udruženja (*American Thoracic Society, ATS*) [103-106]. Pušačima sa niskom membranskom difuzijom (DL_{CO}) <80% predviđenih vrednosti je, ukoliko je to moguće, preporučena kompjuterizovana tomografija pluća (CT sken) koja je urađena u većini slučajeva. Učesnici u studiji su podvrgnuti serijskim (maksimalno četiri) bronhoskopijama uz korišćenje kontrolisane anestezije pri kojima su uzimani uzorci proksimalnih i distalnih epitela disajnih puteva i izvršen bronhoalveolarni lavat distalnih disajnih puteva.

Sve osobe uključene u studiju su podeljene u pet kliničkih fenotipova a njihove karakteristike i demografski podaci su prikazani u *Tabeli 1*:

a) *HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom pluća (H⁺PRE)*: Ova grupa (n=8) uključuje osobe koje su HIV-1 pozitivne i aktivni pušači. Kao i svi ostali HIV-1 pozitivni učesnici u studiji, ove osobe su aktivno lečene sa antivirusnom HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) terapijom. Svaki od učesnika je prošao testove plućne funkcije koji su pokazali normalne rezultate spirometrije uključujući

normalnu FEV1 (*forced expiratory volume in 1 sec*), FVC (*forced vital capacity*), odnos FEV1/FVC kao i totalni plućni kapacitet (TLC), međutim snižene vrednosti predviđene membranske difuzije (DLco) <80%. Značaj sniženih vrednosti DLco u razvoju COPD još nije u potpunosti razjašnjen, no izvesno je da postoji značajna korelacija sniženih vrednosti DLco sa razvojem COPD kao i prisustva ranog emfizema pluća [17, 18, 107-109]. Evaluacija snimaka CT pluća među ovim ispitanicima ukazala je na prisustvo, čak i bez evaluacije sa kvantitativnim radiološkim metodama, minimalnog do umerenog emfizema kod većine ovih osoba (7/8).

b) HIV-1 negativni pušači sa ranim emfizemom pluća (PRE): Ova grupa (n=9) po karakteristikama je identična sa prethodnom grupom, izuzevši njihov HIV-1 negativni status. Učesnici studije koji pripadaju ovoj grupi su takođe imali CT snimanje pluća što je, na sličan način kao i u prethodnoj grupi, ukazalo da većina učesnika ima značajan, rutinskom evaluacijom CT snimka i bez kvantitativne analize evidentan, rani emfizem pluća (7/9)

c) HIV-1 negativni pušači (P): Osobe regrutovane za studiju iz ove grupe (n=23) su aktivni pušači sa normalnim fizikalnim nalazom, normalnim testovima plućne funkcije i normalnom radiografijom pluća, pri tome pozitivnim skriningom urina na pušenje.

d) HIV-1 negativni nepušači (NP): Ove osobe (n=12) nemaju nikakav pušački staž i tokom skrininga su imali normalan fizikalni pregled, kao i normalne testove plućne funkcije i radiološki pregled pluća.

e) HIV-1 pozitivni nepušači (H+NP): Kao i u prethodnoj grupi, ispitanici (n=4) su nepušači koji su inficirani virusom HIV-1 i aktivno lečenim antiretroviralnom terapijom HAART tako da je njihova HIV-1 infekcija smatrana dobro kontrolisanom u trenutku izvođenja studije.

		Fenotip				
		H+NP	H+PRE	NP	P	PRE
Demografski podaci	N	4	8	12	23	9
	Starost	44.3 ± 12.4	53.5 ± 10.0	43.8 ± 7.8	50.5 ± 8.7	53.9 ± 11.8
	Muškarci	0.50	0.38	0.83	0.83	1.00
	Rasa (C-B-H-O)	2-1-1-0	6-0-2-0	6-3-3-0	11-2-9-1	8-1-0-0
Plućna funkcija i radiološka fenotipizacija	FVC%	104 ± 21	113 ± 11	101 ± 6	111 ± 12	107 ± 12
	TLC%	101 ± 17	93 ± 12	91 ± 13	94 ± 10	88 ± 6
	FEV1%	104 ± 21	107 ± 14	102 ± 8	105 ± 13	98 ± 15
	FVC%	82 ± 3	77 ± 6	82 ± 4	77 ± 5	72 ± 9
	DLCO %	91 ± 5	68 ± 10	90 ± 13	85 ± 6	58 ± 12
	Emfizem	0/4	7/8	0/12	0/12	7/9
HIV-1 status	HIV-1	Pozitivni	Pozitivni	Negativni	Negativni	Negativni
	Apsolutni broj CD4	1213 ± 1202	981 ± 704	N/A	N/A	N/A
Izloženost duvanskom dimu	Godine pušenja	0	24.5 ± 15.2	0	23.5 ± 10.5	42.0 ± 19.3
	CO (%)	0	2.7 ± 2.5	0.5 ± 0.4	—	0.9 ± 0.8
	Nikotin (ng/ml)	< 2	777 ± 380	<2	—	2136 ± 1240
	Kotinin (ng/ml)	<5	1081 ± 871	<5	—	1457 ± 1068
Bronhoalveolarni lavaž (% ćelija)	AM	89 ± 5	87 ± 6	88 ± 6	94 ± 3	94 ± 3
	Li	6 ± 4	10 ± 8	7 ± 6	3 ± 2	3 ± 1
	Ne	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
	Eo	1 ± 2	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1
	Epi	1 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 3	0 ± 0

Tabela 1: Demografski podaci i osnovne karakteristike ispitanika u studiji. Svi podaci su prikazani u srednjim vrednostima ± standardna greška.

- Fenotipovi: **H+NP** – HIV-1 pozitivni nepušači; **H+PRE** – HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom pluća; **NP** – HIV-1 negativni nepušači ; **P** – HIV-1 negativni pušači i **PRE** – HIV-1 negativni pušači sa ranim emfizemom pluća
- Rase: C – crnci, B – belci, H – Hispano poreklo i O – ostali

- Parametri plućne funkcije: FVC, forced vital capacity (% očekivanih vrednosti); FEV1, forced expiratory volume u prvoj sekundi; FEV1/FVC (%); TLC, total capacity (% očekivanih vrednosti); DLCO, diffusion capacity (% očekivanih vrednosti).
- Emfizem se smatra pozitivnim ukoliko je očigledno njegovo prisustvo na CT snimku pluća, bez kvantitativne analize, golim okom radiologa
- Godine pušenja su predstavljene u vrednosnom ekvivalentnu pušenja jednog paketa cigareta dnevno. Nikotin u urinu i Kotinin >200 = aktivni pušač, 50 - 200 = pasivni pušač; <50 nepušač; podaci predstavljaju srednje vrednosti dva merenja tokom skrininga i prve bronhoskopije. Karboksihemoglobin u krvi (CO) predstavlja sekundarni marker pušenja, nepušači imaju najčešće nivoe <1.5%.
- Čelijijski satav BAL: AM – alveolarni makrogafi, Li – limfociti, Ne – Neutrofili, Eo – eozinofili, Epi – Epitellne ćelije, N/A – nije aplikabilno
- Celokupna baza podataka sa pojedinačnim vrednostima parametara je deo Priloga tekstu rada

3.3 Video bronhoskopija

Prethodno svakoj pojedinačnoj bronhoskopiji, svaki ispitanik je detaljno upoznat sa rizicima procedure i dao je svoju pismenu saglasnost za izvođenje procedure. Neposredno pred početak procedure, svaki ispitanik je podvrgnut lokalnoj anesteziji sa nebulizatorom u kome je administriran 4% lidokain; nakon nebulizatora, usta i ždrelo su ispirana 2% viskoznom lidokainom, a zatim je distalni deo ždrelo izložen citakainu u formi spreja. Bronhoskopija je izvedena u kontrolisanoj anesteziji korišćenjem malih doza intravenskog fentanila i midazolama do uspostavljanja adekvatne sedacije. Video bronhoskop je korišćen putem oralnog pristupa, sa pacijentom u ležećem položaju u supinaciji i operatorom koji stoji pored glave ispitanika. Lidokain 1% tečnost je korišćena u inkrementima od 1ml iznad glasnica neposredno pre ulaska u traheju, a zatim po potrebi tokom daljeg uvođenja bronhoskopa u bronhije i distalne disajne puteve. Totalna doza 1% lidokaina korišćena tokom procedure je ograničena na 5mg/kg telesne težine. Nakon

inspekcije svih disajnih puteva, bronhoalveolarni lavat je izveden administracijom fiziološkog rastvora u regiji srednjeg režnja desnog pluća sa maksimalnim volumenom od 150ml; po potrebi, lavat lingule je pridodat sa dodatnih 150ml fiziološkog rastvora. Unešena tečnost je aspirirana administracijom negativnog pritiska sa 50ml špricom povezanim sa kanalom bronhoskopa, a volumen BAL tečnosti dobijene aspiracijom špricom je varirao od 20 do 125ml na svakih 150ml unete tečnosti. Nakon lavata, uzorci distalnih disajnih puteva, uzorci proksimalnih disajnih puteva i uzorci endobronhijalne mukoze su takođe uzeti korišćenjem četkica ili forcepsa, a dalje korišćeni za potrebe drugih istraživanja u okviru odeljenja za genetiku *Weill Cornell Medical* centra. Po završetku procedure, ispitanici su observirani u post-operativnoj jedinici, unos hrane nije dozvoljen dva tokom naredna dva sata, a odlazak kući je omogućen adekvatno oporavljenim ispitanicima koji imaju obezbeđenu pratnju. Iako značajnih komplikacija nije bilo, u slučajevima u kojima otpuštanje kući nije delovalo bezbedno nakon standardnog vremena oporavka, ponuđeni su prekoćni prijem u bolnicu i medicinska nega.

3.4 Izolacija supernatanta BAL i ćelijske kulture

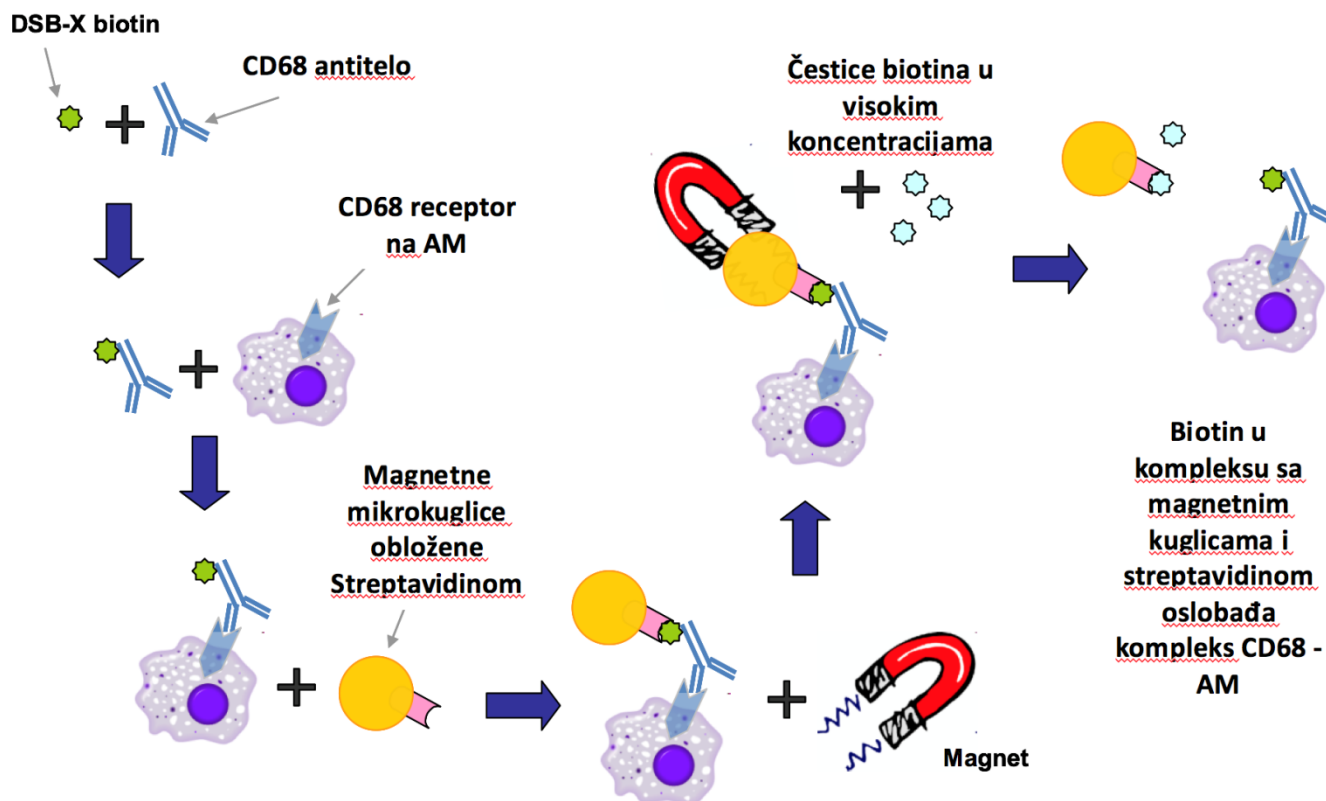
Supernatant dobijen centrifugiranjem BAL tečnosti, je koncentrisan 10x pomoću *Centricon (Millipore, Billerica, MA, SAD)* filtera a zatim zamrznut na -20°C sve do trenutka analize. Metodom dilucije uree u supernatantima BAL i poređenjem optičke gustine uzoraka (*Urea Assay Kit, Biovision, San Francisco, SAD*) utvrđene su fiziološke koncentracije tečnosti koja oblaže epitelijum čime je dalje omogućena realna komparacija koncentracije citokina u dobijenim uzorcima.

Ćelijske komponente BAL tečnosti su izolovane centrifugiranjem, a dobijene ćelije, nakon kvantifikacije putem mikroskopa, mikrocitometra i *Tripán* plavog bojenja, su korištene direktno u *in vitro* eksperimentima (protočna citometrijska analiza (FACS) ili izolacija RNK) ili su kultivisane u odgovarajucim uslovima za kultivaciju ćelija u kompletnom RPMI medijumom (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

bez prisustva fetalnog telećeg seruma, u inkubatoru sa vlažnom atmosferom i 5%CO₂ (Cole Parmer, SAD) na 37°C.

3.5 Izolacija alveolarnih makrofaga

Alveolarni makrofagi su standardno izolovani prethodno opisanom metodom adherencije na ćelijskim pločama pri čemu su neadherentne ćelije ispirane nakon 4 sata kultivacije. Čistoća ovakvih kultura je procenjena >94%. Za potrebe eksperimenata za koje je bila neophodna pozitivna selekcija neadherentnih makrofaga i viši procenat čistoće AM, ćelije sveže izolovane iz BAL su tretirane smešom anti-CD68 antitela (*BioLegend, San Diego, CA 92121*) konjugovanog sa magnetnim mikrokuglicama *FlowComp Flexi detachable beads (Invitrogen Dynal, Life Technologies, Grand Island, NY)*, zatim su pozitivno izolovane pomoću magneta, a onda oslobođene od konjugovanih magnetnih mikrokuglica pomoću streptavidina prema uputstvu proizvođača (shema je predstavljena na *Slici 4*).



Slika 4. Shema izolacije alveolarnih makrofaga pomoću anti-CD68 antitela konjugovanog sa magnetnim mikrokuglicama

3.6 Izolacija T ćelja

Za izolaciju T-ćelija za potrebe funkcionalnih eksperimenata, korišćene su metode formiranja rozeta T-ćelija pomoću vezivanja CD2 proteinskog receptora se ugljenohidratnim LFA-3 homologom koji se nalazi na površini ovčjih eritrocita pretretiranih neuraminidazom. Ukratko, komercijalno pripremljeni ovčji eritrociti (*Innovative Research, Novi, MI, SAD*) su čuvani u *Alseverovom* rastvoru sve do pripremanja eksperimenta kada su isprani i rastvoreni u HBSS-u (*Hanks Balanced Salt Solution*) a zatim su tretirani sa 1 U/ml neuraminidazom (liofilizirani prah, tip X; *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*) i inkubirani 1 sat na telesnoj temperature od 37°C. Rozete T-ćelija su formirane u 15 ml tubama sa okruglim dnom inkubacijom

mešavine neuraminidazom-tretiranih eritrocita sa ćelijskim talogom koji sadrži od $1-10 \times 10^6$ mononuklearnih ćelija, a zatim izolovane pomoću separacije ostalih ćelija sa *Ficoll-Hypaque* rastvorom. Izolovane rozete su lizirane pomoću kratkog izlaganja hipotoničnom rastvoru, a broj oslobođenih prečišćenih T limfocita utvrđen putem mikrocitometra.

Za izolaciju T-ćelija za analizu kvantitativne ekspresije gena korišćene su anti-CD2 magnetne mikrokuglice *Dynabeads® CD2 Pan T (Invitrogen Dynal, Life Technologies, Grand Island, NY)* konjugovane sa anti-CD2 antitelom koje su, po vezivanju sa ćelijskim receptorima pozitivno izolovane pomoću magneta, a onda oslobađane od konjugovanih magnetnih mikrokuglica pomoću streptavidina prema uputstvu proizvođača.

3.7 Eseji sa funkcionalnim antitelima

U eksperimentima su korišćena monoklonalna mišja anti-humana antitela prikazana u Tabeli 2, koja u gornjem delu pokazuje listu antitela korišćenih u eksperimentima protočne citometrije prema protokolu opisanom u poglavlju 3.8. U donjem delu *Tabele 2* nalazi se lista funkcionalnih antitela korišćenih u esejima blokiranja funkcije citokina ili prečišćavanja ćelijskih kultura putem magnetnih mikrokuglica kao što je to opisano u prethodnim poglavljima. Anti-IL23 *p40* neutralizaciono antitelo i anti-IL23 *p19* neutralizaciono antitelo (*Biolegend, San Diego, CA, SAD*) su dodata kulturama AM i inkubirana tokom 30 minuta; nakon ispiranja PBS-om, kulture se stimulisane sa IL-23 prema standardnom protokolu, a blokirajući efekat antitela je evaluiran putem RT-PCR analize. Anti-CD2 i anti-CD3 antitela su korišćena u eksperimentima nespecifične aktivacije T limfocita prema uputstvu proizvođača. Anti-CD68 antitelo je korišćeno u eksperimentima izolacije AM, a nakon fiksacije antitela i ćelija, magnetne mikrokuglice su nespecifično vezane za antitela prema uputstvu proizvođača. *Dynabeads CD2 Pan T (Invitrogen Dynal, Life*

Technologies, Grand Island, N) koristi anti-CD2 antitelo konjugovano sa mikrokuglicama prema uputstvu proizvođača.

Antitela korišćena u ELISA ili *Proteome Profiler™* multicitokinskim esejima su nabavljena u okviru prethodno pripremljenih paketa kao što je opisano u poglavljima 3.9 i 3.10.

Antitelo	Konjugat	Poreklo	Proizvođač	Pun naziv
CD68	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD68
IL23R	CFS	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Carboxyfluorescein (CFS)-conjugated mouse monoclonal anti-human IL-23 R
IgG	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Normal Human IgG Control, Human IgG
CD45RA	FITC	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	FITC anti-human CD45RA Antibody
CD45RO	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	PE anti-human CD45RO Antibody
MMP9	FITC	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Anti-human MMP-9-Fluorescein Monoclonal Antibody
CD14	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Human CD14 PE-conjugated Antibody
CD11c	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Human CD11c PE-conjugated Antibody
CD16	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Human Fc gamma RIII (CD16) PE-conjugated Antibody
CD3	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Human CD3 epsilon PE-conjugated Antibody
CD2	PE	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	PE anti-human CD2 Antibody
CD69	PE	Mišje	<i>R&D, Mineapolis, MN, SAD</i>	Human CD69 PE-conjugated Antibody
CD8	PE	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	PE anti-human CD8a Antibody
CD25	PE	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	PE anti-human CD25 Antibody
CD4	FITC	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	PE anti-human CD4 Antibody
CD4	APC	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	APC anti-human CD4 Antibody
Fukcionalno antitelo	Poreklo	Proizvođač	Pun naziv	
Anti-IL23p40	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	LEAF™ Purified anti-human IL-12/IL-23 p40 (monomer, dimer, heterodimer) Antibody	
Anti-IL23p19	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	LEAF™ Purified anti-mouse IL-23 (p19) Antibody	
Anti-CD68	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	Purified anti-CD68 Antibody	
Anti-CD2	Mišje	<i>Biolegend, San Diego, CA</i>	LEAF™ Purified anti-human CD2 Antibody	

Tabela 2. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju ćelija putem protočne citometrije ili u eksperimentima evaluacije ćelijske funkcije

3.8 Protočna citofluorimetrijska analiza

Ćelije koju se sveže izolovane iz BAL ili makrofagi koji su prečišćeni na prethodno opisani način putem adherencije na ćelijskim pločama, a zatim odvojeni od ćelijskih ploča korišćenjem 5mM EDTA, su ispirane u 0.1% BSA (bovine serum albumine, albumini goveđeg seruma) a zatim inkubirane sa različitim koncentracijama antitela (1:50 ili 1:100), pre svega anti-CD68-PE (PE – fikoeritrin) ili anti-IL-23R-PE antitela (*R&D Systems, Minneapolis, MN*) na 4°C tokom 30 minuta. Ćelije su potom fiksirane i permeabilizovane, a zatim i analizirane pomoću *FACSCalibur* instrumenta (*Becton-Dickinson, San Jose, Calif, USA*) i *CellQuest™* softvera kao što je opisano [110]. Neposredno pre analize protočnom citometrijom, AM su inkubirani sa razblaženjima kristal violet boje (0.2% u puferizovanom fiziološkom rastvoru, tj *phospahte-buffered saline, PBS*) u cilju atenuacije autofluorescencije AM. Eksperimenti sa T-ćelijama iz lavata pluća ili periferne krvi su rađeni po istom protokolu sa tim da je njihova autoflorescencija značajno manja i samim tim, atenuacija pomoću kristal violet boje nije bila neophodna. Za fenotipsku karakterizaciju ćelija korišćena su antitela navedena u *Tabeli 2*.

3.9 Merenje koncentracije citokina u koncentrisanoj tečnosti BAL ili u medijumu ćelijskih kultura

Za semi-kvantitativnu analizu koncentracije citokina u 10x koncentrisanim pomoću *Centricon* centrifugalnih mikrofiltera (*Millipore, Bellerica, Masačusets, SAD*) supernatantima BAL korišćen je *Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Panel A* (*R&D Systems, Minneapolis, MN*) koji je baziran na membranskoj metodi sendvič antitelo-antigen reakcije i koji omogućuje simultanu analizu koncentracija različitih citokina, prema uputstvu proizvođača (www.rndsystems.com), a vrednosti luminiscencije su kvantifikovane pomoću *IMAGE J* softvera (<https://imagej.nih.gov>). U *Tabeli 3* su prikazani svi analizirani citokini i navedena je njihova nomenklatura.

Simbol	Aletrnativni naziv	Naziv
G-CSF	CSF β	Granulocyte colony-stimulating
GM-CSF	CSF α , CSF-2	Granulocyte-macrophage colony
IFN γ	Type II IFN	Type II interferon
IL-2		Interleukin-2
IL-4		Interleukin-4
IL-5		Interleukin-5
IL-6		Interleukin-6
IL-10		Interleukin-10
IL-13		Interleukin-13
IL-1F1	IL-1 α	Interleukin-1 alpha
IL-1F2	IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1F3	IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist
TNF α		Tumor necrosis factor-alpha
IP-10	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand
IL-8	CXCL8	Interleukin-8
GRO α	CXCL1	Growth-related oncogene alpha
MCP-1	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	MIP-1 α	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL4	MIP-1 β	Chemokine (C-C motif) ligand 4
RANTES	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
I-TAC	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand
SDF-1	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand
I-309	CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
IL-12p70		Interleukin-12p70
IL-32 α		Interleukin-32 alpha
IL-16	LCF	Interleukin-16
IL-23		Interleukin-23
IL-27		Interleukin-27
IL-17	IL-17A	Interleukin-17
IL-17E	IL-25	Interleukin-17E
sICAM-1	CD54	Soluble intercellular adhesive
MIF	GIF	Macrophage inhibition factor
PAI-1	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor-1
C5a	C5	Complement Component 5a
CD40 L	CD154	CD40 ligand
sTREM-1		Soluble triggering receptor

Tabela 3. Nomenklatura citokina koji su deo analize u Proteome Profiler, Human Cytokine Array Panel A (R&D Systems, Minneapolis, MN).

3.10 ELISA metoda za merenje koncentracije citokina

Nivoi citokina u supernatantima ćelijskih kultura ili supernatantima BAL je takođe određena pomoću ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) metode. U tu svrhu korišćeni su komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje odgovarajućih citokina. Koncentracija IL-23 u medijumu ćelijskih kultura AM je merena pomoću Human IL-23p19 ELISA kit-a (*Human IL-23 ELISA Ready-SET-Go!® Set 2 plates, eBioscience, San Diego, SAD ili Beckman Coulter, Miami, FL, SAD*). Supernatanti kultura ili lavata su odvajani od ćelija centrifugiranjem (12000 g, 3 minuta), a zatim su zamrzavani na -20°C i čuvani do analize. Sam postupak izvođenja ELISA metode obavljan je sa reagenasima i rastvorima prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Tipičan protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa primarnim antitelom preko noći na 4°C, ispiranje i blokiranje praćeno inkubacijom uzoraka, ispiranje praćeno inkubacijom sa avidin-enzimskim kompleksom, ispiranje praćeno inkubacijom sa supstratom a zatim zaustavljanje reakcije sa H₂SO₄ i očitavanje apsorbancije pomoću spektrofotometra (*Millipore, Billerica, MA, SAD*) korišćenjem filtra za 450 nm. Koncentracija citokina određivana je merenjem intenziteta hemiluminiscencije i korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za rekombinantni citokin poznate koncentracije koji je prethodno serijski razblažen.

3.11 Izolacija RNK

Za utvrđivanje relativne ekspresije gena IL-23, IL-23R, MMP-9 IL-17 ili IFN- γ , RNK je izolovana iz svežih AM uz pomoć *TRIzol*® Reagensa i paketa za izolaciju RNK (*Quiagen, Valensija, CA, SAD*). Ukratko, uzorci koji su sadržavali 1-10 x 10⁶ ispitivanih ćelija prenošeni su u epruvete od 2 ml, centrifugirani (2000 g, 3 minuta) i po odstranjivanju medijuma, lizirani su blagim pipetiranjem u 1ml *TRIzol*® reagensa. Potom su dopunjavani sa 200 μ l hloroforma, izmešani tokom 10 sekundi, ostavljani 15 minuta na 4°C i centrifugirani 10 minuta (10000 g, 4°C). Nakon

centrifugiranja i formiranja tri faze u epruveti, vodena faza koja sadrži izdvojenu RNK prenošena je u drugu epruvetu (preostala tečnost u tubi je izdvojena i čuvana za izolaciju DNK) i RNK je precipitirana dodavanjem 100% etanola u zapremini koja je bila jednaka zapremini prenete vodene faze (oko 500 μ l). Nakon blagog mešanja, 700 μ l ovog uzorka je dodato u *RNeasy MinElute* centrifugirajuće patrone (*RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen*) a ove su zatim centrifugirane 15 sekundi na 14000 g. Po završetku centrifugiranja, talog je odbačen a preostala RNK mešavina etanola i vodene faze dodata u iste *RNeasy MinElute* centrifugirajuće patrone i proces centrifugiranja je ponovljen, a talog je ponovo odbačen po završetku ovog procesa. Patrone su zatim isprane centrifugiranjem sa RPE puferom i 80% etanolom iz *RNeasy MinElute Cleanup Kit-a*, a zatim i same centrifugirane dodatnih 5 minuta na 14000 g. Tako iscentrifugiranim *RNeasy MinElute* centrifugirajućim patronama, postavljenim u nove Ependorf tube koje su sterilne i, od strane proizvođača osigurane da nemaju prisutne tragove RNAze, dodato je 18 μ l *RNAsecure* sterilne vode (*Ambion, Walham, MA, SAD*), a zatim su centrifugirane još jedan minut pre maksimalnoj brzini. Koncentracija izolovane RNK je utvrđena merenjem apsorpcije na 260 nm i poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu, odnosno ispitan je stepen njene čistoće na 280 nm talasne dužine na kojoj je maksimalna moć apsorpcije aromatičnih amino kiselina. (Odnos $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu korišćen je *NanodropTM* spektrofotometar (*Wilmington, DE, SAD*).

3.12 Reverenza transkripcija cDNK

cDNK je sintetisana iz RNK pomoću *TaqMan Reverse Transcriptase Reaction Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD*). Nakon izolacije i merenja, zapremina koja je sadržavala 1 μ g rastvorene RNK je dopunjavana do 50 μ l demineralizovanom (DEPC-tretiranom) vodom u smeši koja je sadržala 2.5 μ l heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci (*Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA*) 10 μ l dezoksiribonukleotid-trifostata (*dNTP, Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA*) u

količini koja odgovara finalnoj koncentraciji od 1 mM za svaki dNTP, 11 μ l MgCl₂, 1 μ l inhibitora RNAze, 5 μ l 100x RT pufera i 1.25 μ l reverzne transkriptaze (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase, Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA*). Ovako dobijeni uzorci su mešani i inkubirani na 25 °C, 10 minuta, a potom na 42 °C, 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 95 °C, 5 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Reakcija reverzne transkripcije obavljena je u epruvetama od 200 μ l (*Eppendorf, Nemačka*), a inkubacija na različitim temperaturama je obavljena pomoću odgovarajućeg aparata (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*). U cilju provere postojanja kontaminacije, u svakoj reakciji korišćena je i negativna kontrola koja je sadržavala sve reagense osim RNK.

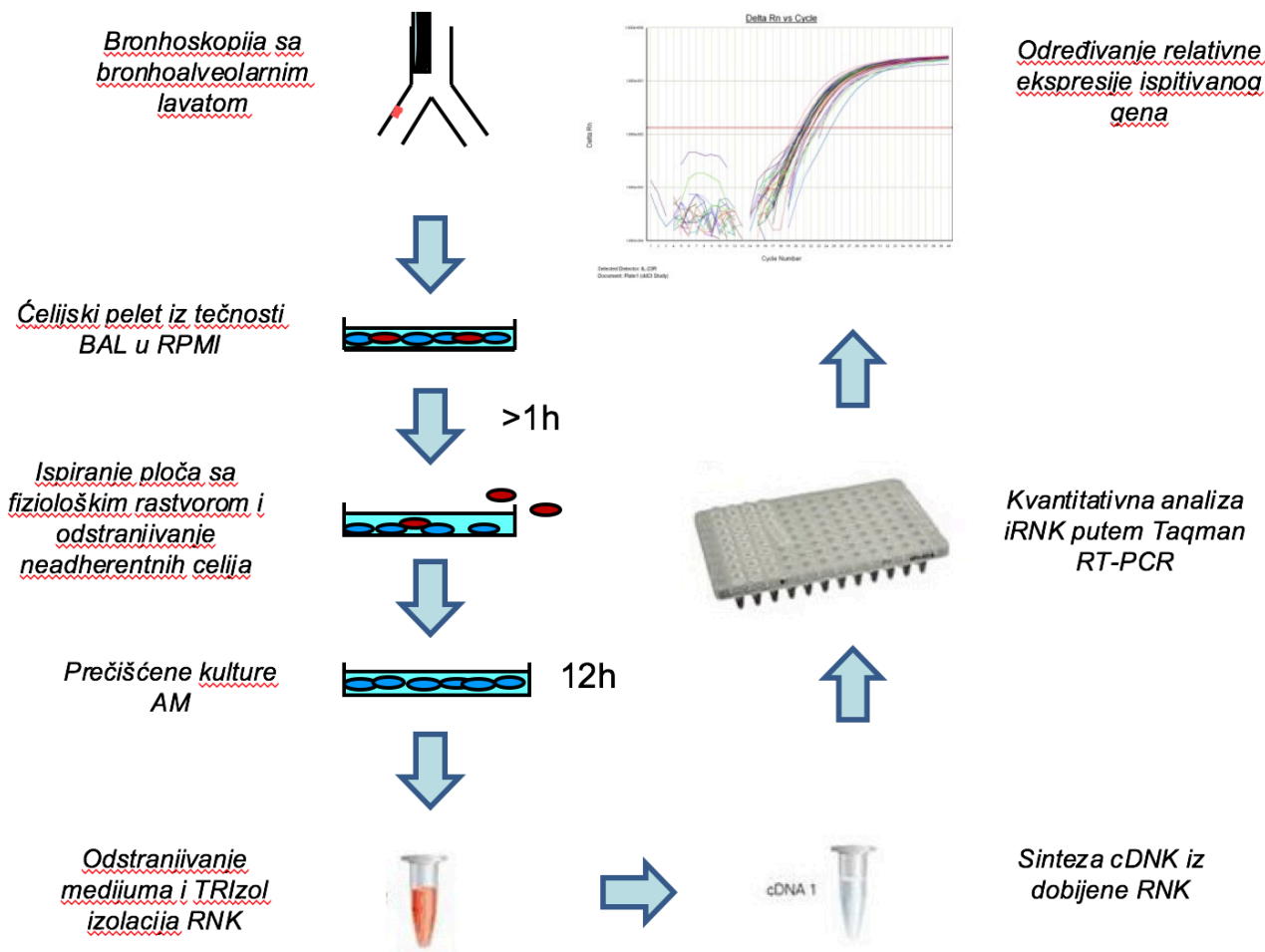
Prajmeri korišćeni u PCR reakciji dizajnirani su na osnovu sekvenci dostupnih u bazi podataka ENTREZ korišćenjem odgovarajućeg kompjuterskog programa (*Primer Express® software v2.0, Applied Biosystems, SAD*). Sekvence i finalne koncentracije prajmera koji su korišćeni za umnožavanje i detektovanje cDNK za Granzim B, β -aktin i citokine navedeni su u *Tabeli 4*.

Gen	Prajmer/probe set	Proizvođač
IL-17	Hs00174383_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
IFNgamma	Hs00989291_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
IL-23	Hs00900829_g1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
MMP-9	Hs00234579_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
GZMB	Hs00188051_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
B2M	Human beta-2-microglobulin Endogenous Control (VIC / MGB Probe, Primer Limited)	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
IL23R	Hs00332759_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA
IL12RB1	Hs00538167_m1	Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA

Tabela 4. Komercijalni prajmeri i probe korišćeni u PCR reakciji

3.13 Analiza genske ekspresije

Kvantitativna real-time PCR (*Taqman RT-PCR*) analiza uzoraka cDNA je izvođena pomoću *Applied Biosystems Sequence Detection Sistema 7700* korišćenjem univerzalnog *PCR Master Miksa* i prajmera specifičnih za svaki od testiranih gena ponaosob (ID: MMP-9 - Hs00234579_m1, IL-23a - Hs00900829_g1, IL-23R - Hs00332759_m1) i endogenih kontrola Humani β -2-mikroglobulin (*VIC® / MGB Probe, Primer Limited*) i Humana β -aktin endogena kontrola (*VIC®/MGB Probe, Primer Limited*) (svi prajmeri poreklom iz *Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD*). Svi uzorci su izmereni u 1:10 i 1:100 dilucijama i u duplikatu pripremljeni za amplifikaciju u separatnim bunarčićima na ploči koja je zapečaćena optičkim adhezivnim filmom (*Applied Biosystems, SAD*) i koja je centrifugirana 2 minuta na 1000 g, a zatim prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (*ABI Prism 7500, Applied Biosystems, SAD*). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95 °C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95 °C i 1 minut na 60 °C. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (*7500 System software*) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (*Applied Biosystems, SAD*) i $\Delta\Delta C_t$ metoda. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin ili gena za β -2-Mikroglobulin detektovanog u istom bazenčiću, a iskazan je kao srednja vrednost relativne ekspresije informacione RNK (iRNK) dobijena iz duplikata uzorka.



Slika 5: Analiza genske ekspresije – shema predstavlja neophodne korake koji počinju bronhoskopijom, nastavljaju se izolacijom i kultivisanjem ćelija BAL, zatim prečišćavanjem adherentnih ćelija koje predstavljaju mahom AM; nakon uklanjanja tečnosti ćelijskog medijuma i oslobađanja AM sa ćelijskih ploča, ove ćelije su prvo zamrzavane sa TRlzol® reagensom, a kasnije je iz njih izolovana i prečišćena RNK koja je, nakon utvrđivanja koncentracije i čistoće, korišćena u procesu reverzne transkripcije za dobijanje cDNK koja je dalje korišćena za kvantitativni PCR putem Taqman RT-PCR metode i analizu ekspresije ispitivanog gena

3.14 DNK mikročip analiza i ekspresija IL-23 u alveolarnim makrofagima

Relativna ekspresija IL-23 i IL-23R je utvrđena korišćenjem podataka DNK mikročip analize AM pomoću komercijalnog DNK mikročipa *GeneChip® HG-U133 Plus 2.0 microarray* (Affymetrix, Santa Clara, CA, SAD). Ukratko, nakon dobijanja cDNK kao što je prethodno opisano, uzorci su analizirani pomoću *Affymetrix* DNK mikročipa, a rezultati bioinformatički obrađeni putem *GeneSpring Affymetrix* analize (136 HG-U133 plus 2.0 mikročip podaci) pri čemu su sekvence odabrane iz banaka podataka GenBank®, dbEST, and RefSeq i usklađene prema brojnim javnim bazama podataka kao što su *Washington University EST trace repository* ili *University of California, Santa Cruz Golden-Path human genome database* (dokumentovana u Prilogu rada)

3.15 Čelijske kulture

Sve ćelije su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 6 ili 24 bazenčića ravnog dna (Corning® Costar®, Sigma, SAD) u koncentraciji 10^6 ćelija/ml u inkubatoru sa vlažnom atmosferom (Cole Parmer, SAD), na temperaturi od 37°C i pri koncentraciji CO₂ od 5 %. Vreme inkubacije i način stimulacije ćelija varirali su u zavisnosti od eksperimenta.

Kulture alveolarnih makrofaga su pripremane prema klasičnoj metodi korišćenja osobine ćelijske adherencije, pri čemu inkubiranje tokom 4-24 sata u pločama sa ravnim dnom i uslovima opisanim u prethodnom paragrafu omogućava adherenciju AM za dno ploča; ponavljanjem laganog ispiranja fiziološkim rastvorom neadherentne ćelije kao što su limfociti, eozinofili ili neutrofilni bivaju odstranjene, a novoformirane kulture AM razblažene sa svežim RPMI su korišćene u daljim eksperimentima.

3.16 Merenje koncentracije MMP-9 u medijumu ćelijskih kultura

48 sati nakon stimulisanja AM, medijum u kome su ćelije kultivisane je centrifugiran i supernatant je analiziran putem želatin zimografije (Novex Zymogram Gels, Invitrogen, SAD) prema uputstvima proizvođača. Ukratko, uzorci koncentrisanih supernatanta BAL pomešani sa Novex Tris-Glicin *SDS Sample Buffer* rastvorom su dodati u pripremljene bazenčice u okviru komercijalnih gelova, a zatim je vršena elektroforeza na 125V, 10-30mA, tokom 90 minuta. Tako obrađeni gelovi su inkubirani u *Zymogram Renaturing Buffer*-u tokom 30 minuta na 37°C, a zatim ispirani sa ovim rastvorom i u istom inkubirani na 37°C preko noći. Tako pripremljeni gelovi su obojeni sa *SimplyBlue™ Safestain* (Invitrogen, SAD)

Vrednosti optičke gustine dobijenih gelova su kvantifikovane pomoću *IMAGE J* softvera, besplatno dostupnog naučnog servisa za fotografsku obradu rezultata, a relativne vrednosti rezultata su upoređene, statistički analizirane i prikazane grafički.

3.17 Infekcija makrofaga sa HIV-1 virusom *in vitro*

HIV-1 negativni AM su inficirani *in vitro* pomoću laboratorijskog tipa HIV-1 virusa, JRFL. Nakon 12 dana inkubacije JRFL-inficiranih AM, RNK je izolovana. Produktivna infekcija sa JRFL-om je prethodno potvrđena kvantifikacijom *p24* antigena u supernatantu medijuma putem ELISA testa (*Beckman Coulter, Miami, FL, SAD*) prema prethodno opisanom protokolu i uputstvu proizvođača.

3.18 Citokinska stimulacija ćelijskih kultura

Kulture AM, prethodno prečišćene metodom adherencije ili pozitivne selekcije CD68+ ćelija, ili obogaćene ne-adherentim ili izolovanim T-ćelijama, tretirane su

različitim koncentracijama purifikovanog rekombinantnog IL-23 (1290-IL, *R&D, Minneapolis, MN, SAD*) tokom 6-24 sata u zavisnosti od tipa eksperimenta, u suplemetovanom RPMI bez fetalnog telećeg seruma, pri 5% CO₂ na 37°C. Koncentracije IL-23 su pažljivo testirane i titrirane u nizu eksperimenata (neprikazani podaci) i utvrđeno je da vrednosti od 10 ng/ml predstavljaju optimalnu koncentraciju za dobijanje maksimalnog efekta na pojačanje ekspresije MMP-9 gena. AM kultivisani u istim uslovima bez dodatih citokina su korišćeni kao kontrola. U eksperimentima testiranja specifičnosti uloge IL-23, blokirajuće humano anti IL-12/IL-23 *p40* (anti-IL-23) antitelo (*R&D, Minneapolis, MN, SAD*) je dodavano kulturama AM 30 minuta pre dodavanja rekombinantnog IL-23 citokina. Stimulacija AM sa ostalim rekombinantnim citokinima poput (IL-1β, TNF-α, IL-6, INF-γ, LPS) je urađena na osnovu preporučenih koncentracija od strane proizvođača uz proveru efekta titriranjem ovih koncentracija. U svim eksperimentima u kojima su rekombinantni citokini korišćeni za stimulaciju IL-23, AM kojima ovi citokini nisu dodati su korišćeni kao negativna kontrola.

3.19 Statistička analiza

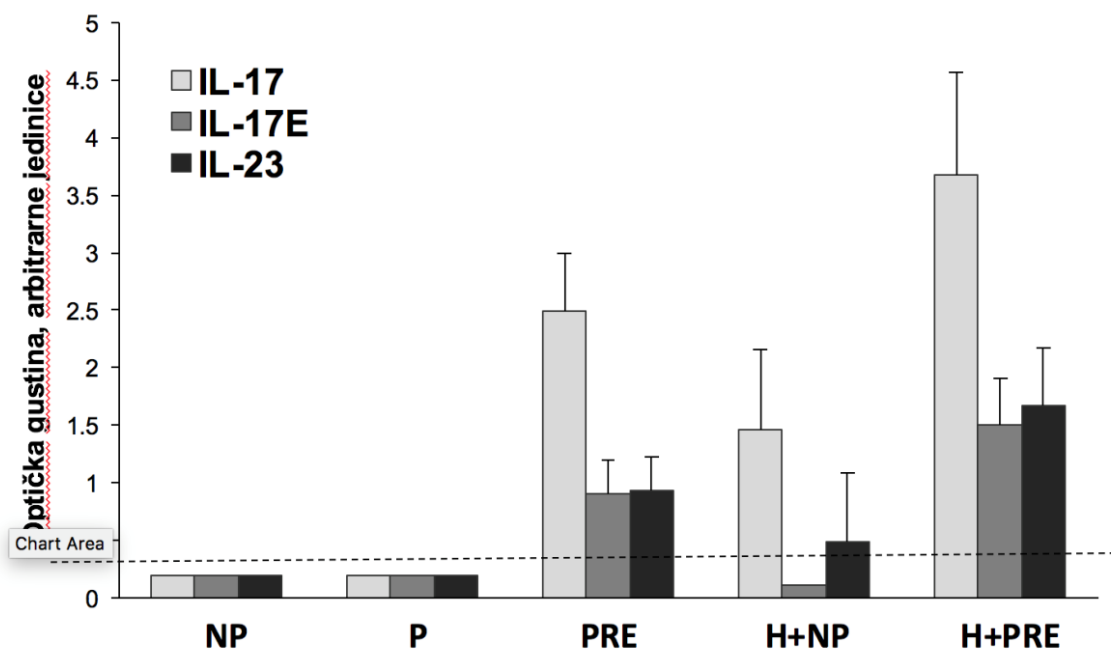
Za donošenje statističkih zaključaka eksperimenti su ponovljeni na najmanje 3 uzorka, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti +/- vrednosti standardnih devijacija. Relativne vrednosti kao što su relativna ekspresija iRNK ili relativna optička gustina su prikazane na analognoj ili logaritamskoj skali, a statistički značaj je testiran pomoću ANOVA ili *Kruskal-Wallis* analize odnosno Studentovog t-testa ili *Wilcoxon-ovog Signed-Rank* testa. Vrednost parametra *p* manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI:

4.1 Multicitokinska analiza tečnosti BAL

Uzorci supernatanta BAL tečnosti 27 ispitanika (NP=6, P=7, PRE=6, H+NP=4, H+PRE=4), prethodno skladišteni na -20°C su otopljeni i analizirani pomoću *Preteome Profiler™*, testa koji semi-kvantitativnom analizom utvrđuje koncentracije 36 različitih citokina čija nomenklatura je prikazana u *Tabeli 3* u poglavlju *Materijali i metode 3.9*.

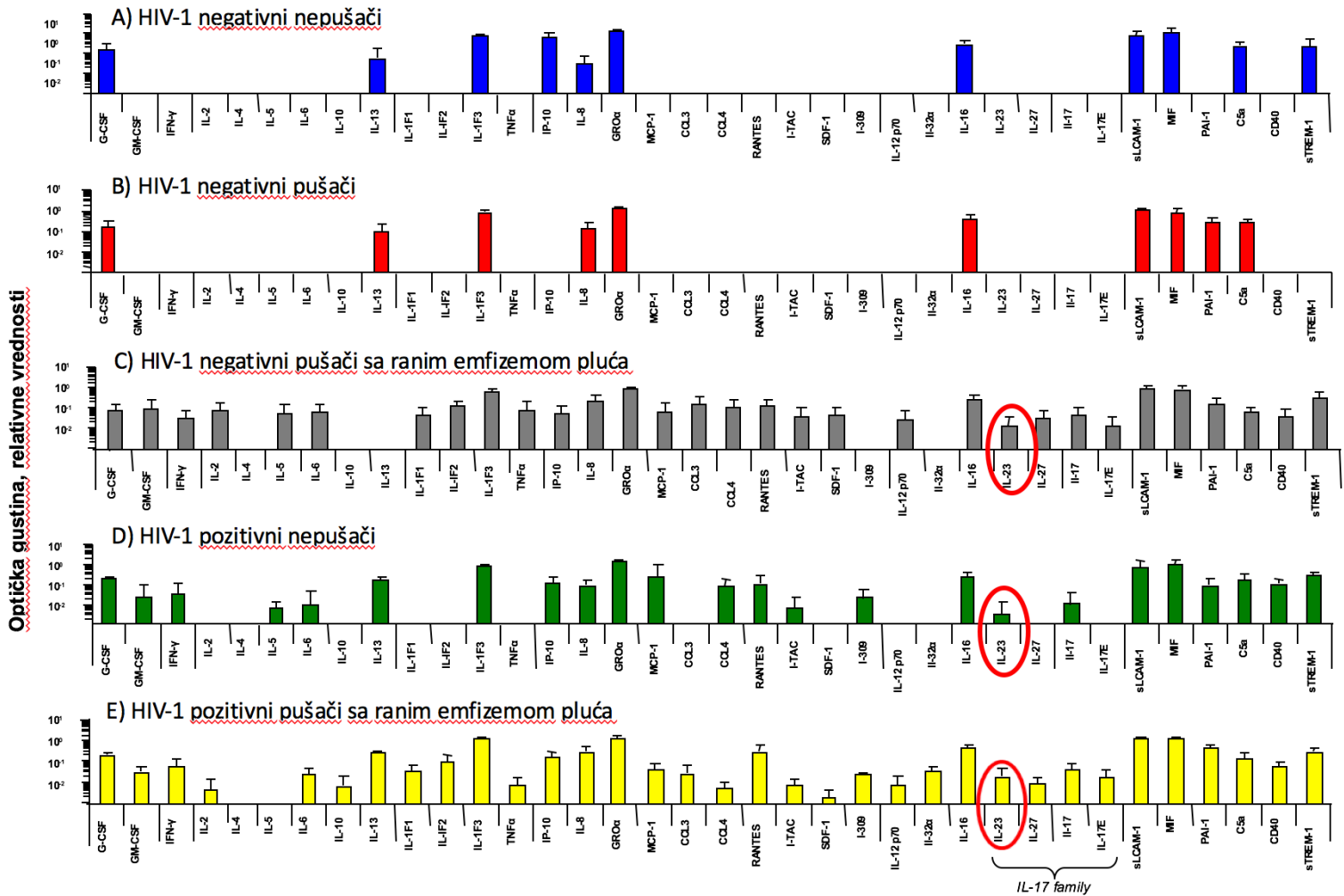
U ovom eksperimentu, relativne koncentracije citokina su određene semi-kvantitativnom analizom intenziteta reakcije putem *IMAGE J* softverske analize optičke gustine. Srednje vrednosti relativnih optičkih gustina su posebno predstavljene za svaku fenotipsku kategoriju, a u okviru fenotipskih kategorija, ove vrednosti su predstavljene za svaki pojedinačni analizirani citokin. Kao što je predstavljeno na *Slici 6*, relativno mali broj citokina je detektovan u supernatantima tečnosti BAL i HIV-1 negativnih nepušača i HIV-1 negativnih pušača. Nasuprot njima, pušači sa ranim emfizemom pluća imaju povišene koncentracije proinflammatoryh citokina (kao što su IL-1, TNF- α , IL-6 i IL-12) u supernatantima tečnosti BAL nezavisno od HIV statusa što je očekivano na osnovu prethodno objavljenih podataka [111]. Koncentracije IL-1, IL-6, GM-CSF (faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), TNF- α i IFN- γ su takođe povišene u BAL tečnosti HIV-1 pozitivnih individua čak i u potpunom odsustvu oportunističkih infekcija [86, 112]. Poredivši citokinski profil NP ili P sa H+NP, očigledna je značajno povišena koncentracija i broj detektovanih citokina u supernatantima BAL tečnosti HIV-1 pozitivnih nepušača. Citokinski profil H+NP, PRE i H+PRE je sličan i karakteriše se prisustvom ne samo citokina koji su povezani sa Th-1 ćelijama (IFN- γ , IL-12), već i citokina koji su povezani sa Th-17 ćelijama kao što su IL-17 i IL-23 čije prisustvo nije detektovano u uzorcima NP ili P.



Slika 6: Koncentracija Th-17 citokina u supernatantima BAL. Citokini su izmereni putem Proteome Profiler™ testa. (NP) - HIV-1 negativni nepušači (n=6), (P) - HIV-1 negativni pušači (n=7), (PRE) - HIV-1 negativni pušači sa ranim emfizemom pluća (n=6), (H+NP) - HIV-1 pozitivni nepušači (n=4), i (H+PRE) - HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom pluća (n=4). Optička gustina je definisana pomoću arbitrarnih jedinica koje predstavljaju relativnu optičku gustinu u odnosu na standard

Pored pojačanog prisustva IFN- γ i Th-17 familije citokina, citokinski profil HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća deli još nekoliko zajedničkih karakteristika sa H+NP i PRE (Slika 7): sve tri fenotipske grupe karakteriše pojačano prisustvo hemokina CXCL-11(I-TAC) koji igra značajnu ulogu u mobilizaciji aktiviranih T-ćelija [113], kao i pojačano prisustvo GM-CSF koji takođe učestvuje u aktivaciji T-ćelija [114]. Povišeni nivoi ovih citokina ukazuju na moguću ulogu stečene imunosti i T-ćelija u ranom razvoju emfizema pluća među HIV-1 pozitivnim pušačima, i posebno značajnu ulogu Th-17 imunskog odgovora u patogenezi ove bolesti. Kako je poznato da IL-23 moduliše homeostazu neutrofila i infiltraciju neutrofila putem indukcije IL-17 i GM-CSF [115], i na taj način je pre uzrok nego

posledica pojačanog prisustva svih ovih faktora u supernatantima BAL HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća, u narednim eksperimentima smo se primarno fokusirali na ovaj citokin.

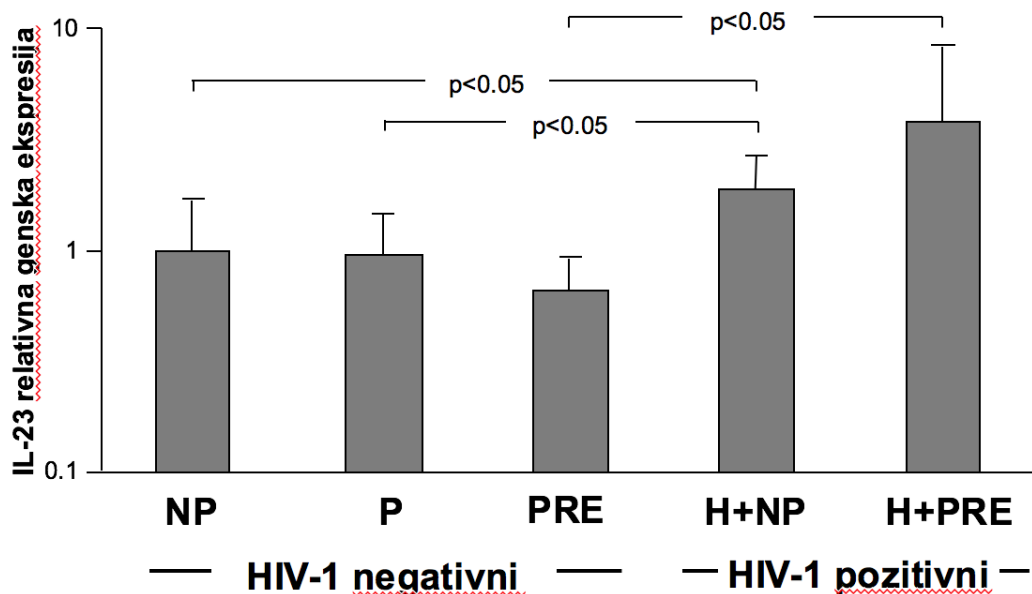


Slika 7: Poređenje relativnih koncentracija 36 citokina supernatanta putem Proteome Profiler™ testa: Koncentracije citokina su predstavljene na osnovu relativnih vrednosti optičkih gustina dobijenih ovih testom, a horizontalno predstavljene, u 5 različitim fenotipskih grupa su ispitivani citokini: A. HIV-1 negativni nepušači (n=6), B. HIV-1 negativni pušači (n=7), C. HIV-1 negativni pušači sa ranim emfizemom pluća (n=6) D. HIV-1 pozitivni nepušači (n=4), i E. HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom pluća (n=4)

4.2 DNK mikročip analiza i ekspresija IL-23 u alveolarnim makrofagima

U cilju potvrde pretpostavke da je IL-23 eksprimiran u humanim alveolarnim makrofagima, odlučili smo da proverimo gensku ekspresiju putem DNK mikročip analize. Nakon izolacije RNK i dobijanja cDNK, uzorci bronhoskopiranih subjekata su analizirani pomoću *Affymetrix* mikročipa, a rezultati bioinformatički obrađeni putem *GeneSpring Affymetrix* analize (*136 HG-U133 plus 2.0* mikročip podaci). DNK mikročip analiza IL-23 iRNK (*Probeset 220054_at*) je pokazala da je IL-23 eksprimiran u AM, pri tome pokazujući statistički značajno pojačnu ekspresiju u AM H+PRE u odnosu na AM PRE (neprikazani podaci).

Da bi smo uporedili relativnu ekspresiju IL-23 u AM u zavisnosti od uticaja HIV-1 infekcije i pušenja, uzorci RNK svih 5 fenotipova (NP (n=5), P (n=5), PRE (n=4), H+NP (n=4) i H+PRE (n=4)) su analizirani putem Taqman kvantitativnog *PCR* eseja u realnom vremenu. Uporedivši srednje vrednosti relativne genske ekspresije među ovim fenotipovima, pokazali smo da je IL-23 gen pojačano eksprimiran među HIV-1 pozitivnim ispitanicima nezavisno od pušačkog staža u odnosu na NP, P ili PRE ($p < 0.05$, *Kruskal-Wallis*; *Slika 8*). Nasuprot razlici u ekspresiji IL-23 među HIV-1 pozitivnim i HIV-1 negativnim ispitanicima, razlika u ekspresiji IL-23 između pušačkih i nepušačkih fenotipova nije pokazala statistički značaj. Ovi podaci ukazuju na postojanje korelacije između HIV-1 infekcije i pojačane ekspresije IL-23 u AM.

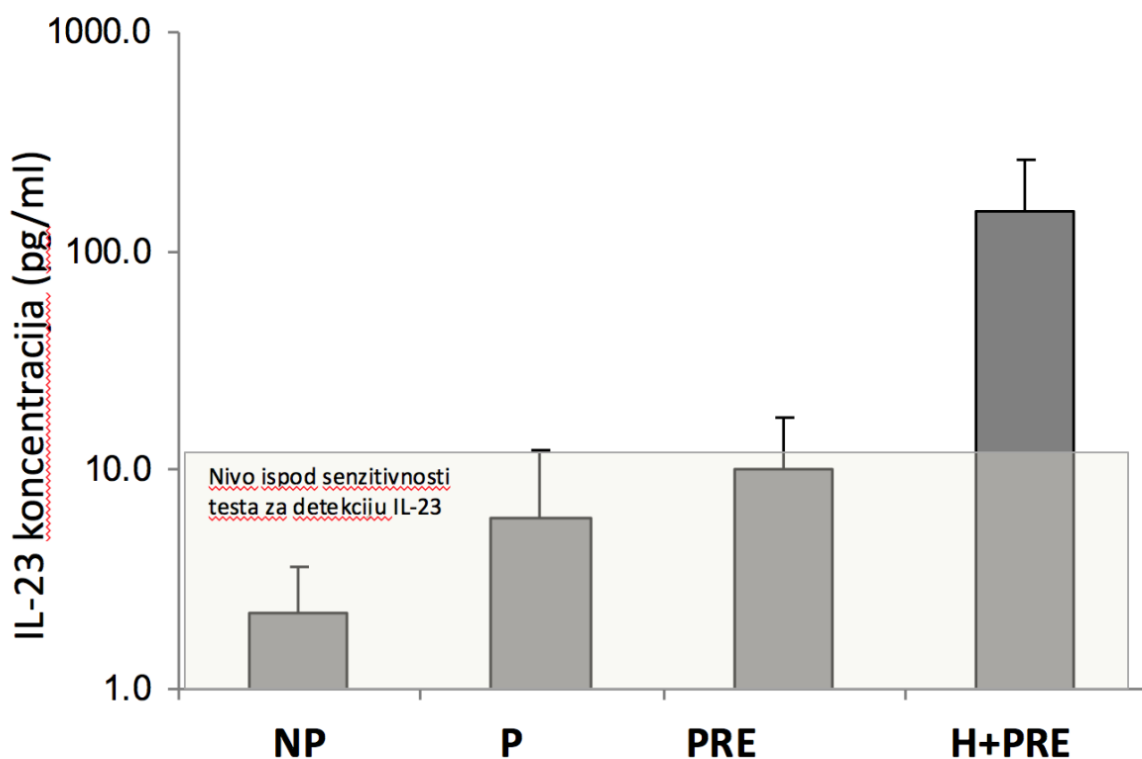


Slika 8: Relativna genska ekspresija IL-23 u alveolarnim makrofagima. IL-23 je pojačano eksprimiran u plućima HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća i HIV-1 pozitivnih nepušača u odnosu na HIV-1 negativne nepušače, pušače i pušače sa ranim emfizemom pluća (stubići predstavljaju srednje vrednosti relativne genske ekspresije IL-23 za svaku fenotipsku kategoriju ponaosob (NP (n=5), P (n=5), PRE (n=4), H+NP (n=4) i H+PRE (n=4), $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test)

4.3 Koncentracija IL-23 u in-vitro kulturama AM

Znajući da povišena ekspresija IL-23 može, ali ne mora da vodi do povišenih koncentracija solubilnog IL-23 u supernatantima BAL, odlučili smo da testiramo ćelijski medijum u kome su kultivisani AM. Alveolarni makrofagi 26 subjekata (NP (n=7), P (n=15), PRE (n=3), H+PRE (n=2)) su kultivisani *in vitro* tokom 48 sati, a zatim je njihov ćelijski medijum prečišćen od ćelija putem centrifugiranja nakon čega smo analizirali nivoe IL-23 u ovim uzorcima putem ELISA metode. Kao što je prikazano na Slici 9, detektibilni nivo IL-23 (prema uputstvu proizvođača,

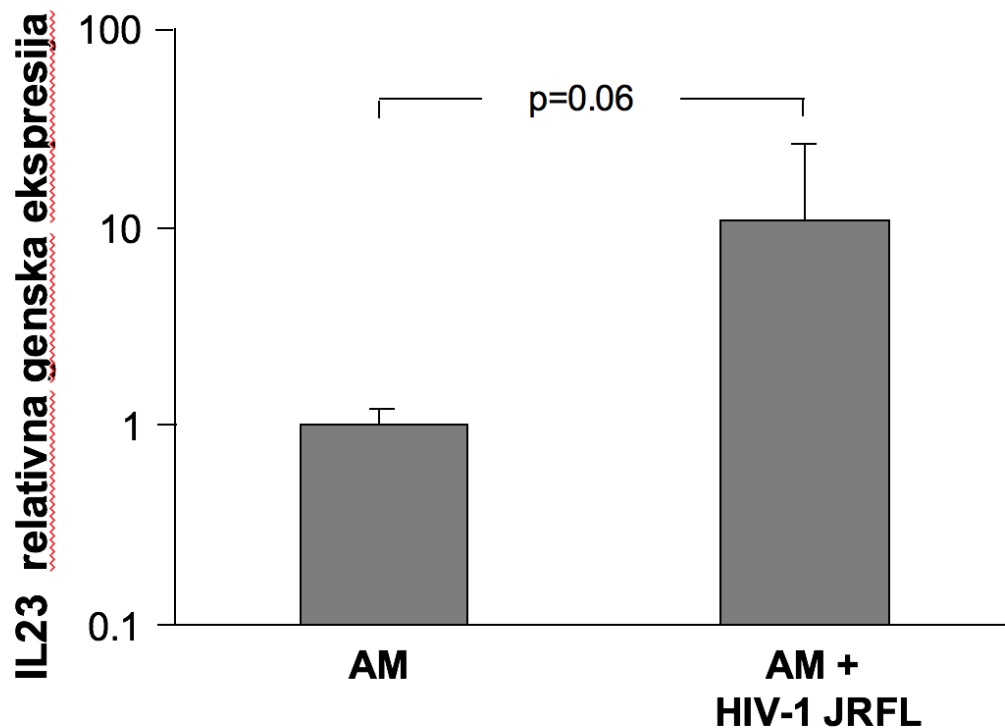
minimalna koncentracija koja sa sigurnošću može biti izmerena je 15pg/ml) je jedino izmeren u supernatantima kultura ćelija koje potiču od HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća (prikazane su srednje vrednosti nivoa IL-23, statistički značaj nije utvrđen s obzirom da su dostupna samo 2 uzorka H+PRE). Ovi rezultati dalje ukazuju na mogućnost da HIV-1 infekcija dovodi do pojačanog lučenja IL-23 u alveolarnim makrofagima.



Slika 9: Koncentracije IL-23 supernatantima kultura alveolarnih makrofaga različitog fenotipa. Koncentracije IL-23 su kvantifikovane pomoću ELISA, Srednje vrednosti i standardne devijacije izmerenih koncentracija IL-23 su prikazane za četiri različita fenotipa alveolarnih makrofaga ((NP (n=7), P (n=15), PRE (n=3), H+PRE (n=2))

4.4 HIV-JRFL virus infekcija AM *in vitro*

Sa ciljem da proverimo hipotezu da infekcija HIV-1 virusom dovodi do pojačane ekspresije IL-23, koristili smo prethodno utvrđeni model *in vitro* infekcije alveolarnih makrofaga sa HIV-1 laboratorijskim tipom virusa, JRFL [116]. IL-23 ekspresija je upoređena između normalnih i JRFL-inficiranih AM pušača kultivisanih *in vitro* tokom 12 dana. Po izolaciji RNA i analize kvantitativne ekspresije IL-23 putem Taqman PCR metode u realnom vremenu, utvrdili smo da JRFL-inficirani AM pokazuju 10 puta pojačanu ekspresiju gena za IL-23 u odnosu na kontrolne AM ($p=0.06$, Vilkokson Signed-rank test, *Slika 10*).

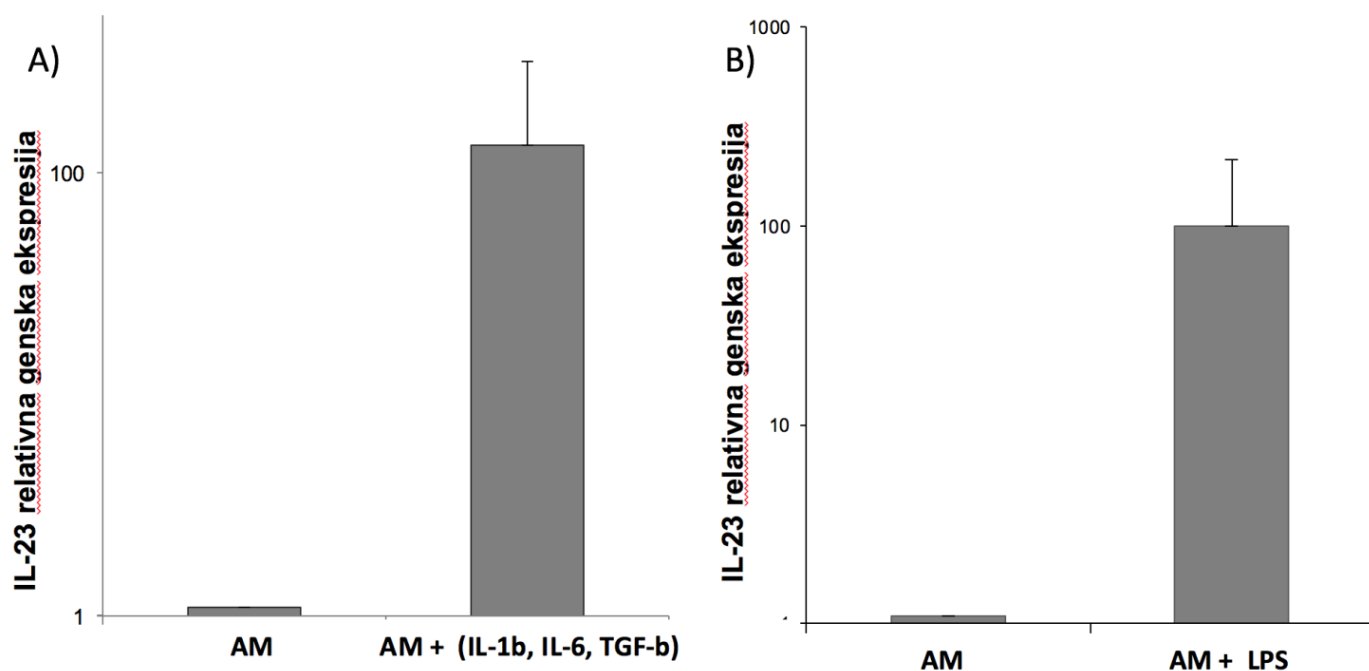


*Slika 10: Pojačana ekspresija IL-23 u makrofagima pušača nakon infekcije JRFL HIV-1 virusom. Nakon izolacije iz BAL, AM pet HIV negativnih osoba su izloženi JRFL HIV-1 virusu *in vitro* i kultivisani tokom 12 dana. Kvantitativna analiza genske ekspresije IL-23 ukazuje da HIV-1 infekcija indukuje ekspresiju IL-23*

Ova serija *in vitro* eksperimenata sa velikom verovatnoćom ukazuje da HIV-1 infekcija alveolarnih makrofaga dovodi do pojačanog prisustva IL-23 u plućima inficiranih osoba i potvrđuje pretpostavku da je sama HIV-1 infekcija, a ne neka od indirektnih posledica infekcije alveolarnih makrofaga (oportunističke infekcije) faktor koji dovodi do pojačane ekspresije IL-23.

4.5 In vitro stimulacija alveolarnih makrofaga kombinacijom Th-17 indukujućih citokina ili lipopolisaharidom (LPS) indukuje ekspresiju gena za IL-23

Da bi pokazali da ekspresija IL-23 od strane makrofaga nije specifična isključivo za HIV-1 infekciju, tj, da je ovaj proinflamatorni citokin inducibilan u uslovima inflamacije pluća, postavili smo seriju eksperimenata u kojima smo *in vitro* kultivisane AM izložili proinflamatornim signalima. Na *Slici 11A* predstavljene su srednje vrednosti četiri eksperimenta u kojima su upoređene srednje vrednosti ekspresije gena za IL-23 AM kultivisanih u sterilnom medijumu (kontrolni AM) i AM kojima je dodata smeša Th-17 inducibilnih citokina koja je sadržala niske koncentracije IL-1 β (1 ng/ml), IL-6 (1 ng/ml) i TGF- β (1 ng/ml). IL-23 genska ekspresija je povišena u AM koji su bili izloženi Th-17 citokinima tokom 12h, no statistička značajnost ovog efekta nije pokazan zbog visoke varijanse (n=4, t-test, p=0.09). Slično prethodnom eksperimentu, *Slika 13B* pokazuje da izlaganje AM lipopolisaharidu (LPS, endotoksin, 0.1 μ g/ml) tokom 12 sati kultivacije *in vitro* takođe može da dovede do povišene ekspresije gena za IL-23, takođe bez statističkog značaja (*Slika 11B*, n=4, t-test p=0.12)



Slika 11: Indukcija ekspresije IL-23 u AM. A) Relativna genska ekspresija IL-23 je povišena u kulturama AM stimulisanih niskim koncentracijama IL-1 β (1 ng/ml), IL-6 (1 ng/ml) i TGF- β (1 ng/ml), ($n=4$, t -test, $p=0.09$). B) Relativna genska ekspresija IL-23 je takođe indukovana stimulacijom kultura AM LPS (0.1 μ g/ml) ($n=4$, t -test $p=0.12$)

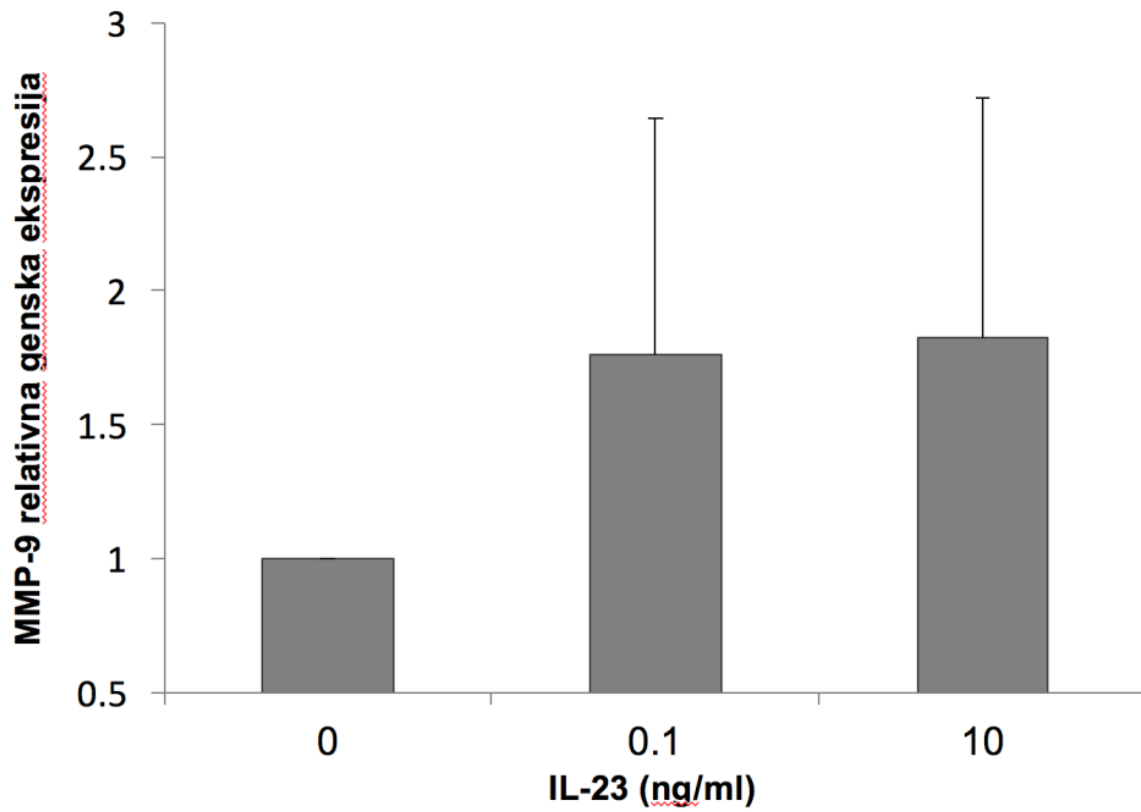
Ovi eksperimenti ukazuju da ekspresija i povišeno prisustvo IL-23 u plućnoj mikrosredini može biti posledica prisustva različitih hroničnih inflamatornih stanja uključujući COPD, što je konzistentno sa prethodno publikovanim podacima [78, 80, 117, 118]. Iako planirani dizajn eksperimenata za utvrđivanje indukcije ekspresije IL-23 nije fokusiran na AM osoba sa uznapredovalom i neadekvatno kontrolisanom HIV-1 infekcijom, eksperementi sa kulturama dva AM ispitanika takvog profila koje su analizirane su pokazale spontanu sekreciju IL-23 *in vitro*, deset puta veću u odnosu na, na isti način kultivisane kulture HIV-1 negativnih AM (neprikazani podaci).

4.6 Efekat IL-23 stimulacije AM na pojačanu gensku ekspresiju MMP-9

Povišeni nivoi IL-23 u plućima HIV-1 pozitivnih pušača ukazuju na inflamaciju i ukazuju na mogućnost da citokini vezani za Th-17 imunski odgovor mogu imati značajnu ulogu u indukciji ili održanju ovih procesa. Međutim, izvesno je da ovaj citokin nema direktnu ulogu u patogenezi emfizema i direktnoj razgradnji plućnog matriksa. Prethodno publikovani podaci ukazuju na mogućnost direktne veze između stimulacije ćelija sa IL-23 i pojačane sekrecije MMP-9 [80, 115]. U skladu sa tim, odlučili smo da testiramo uzročno posledičnu vezu između IL-23 i metaloproteinaze MMP-9.

Želatinaza MMP-9 razgrađuje proteine ekstraćelijskog matriksa, međutim takođe ima ulogu u aktivaciji velikog broja bioaktivnih molekula koji ne učestvuju u izgradnji matriksa [34, 119]. Na osnovu prethodno pokazanih podataka koji ukazuju na pojačano prisustvo IL-23 u plućnoj mikrosredini HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća i na osnovu publikovanih podataka koji pokazuju da je MMP-9 ekspresija pojačana u AM HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća, odlučili smo da istražimo potencijalnu direktnu vezu između ovih molekula.

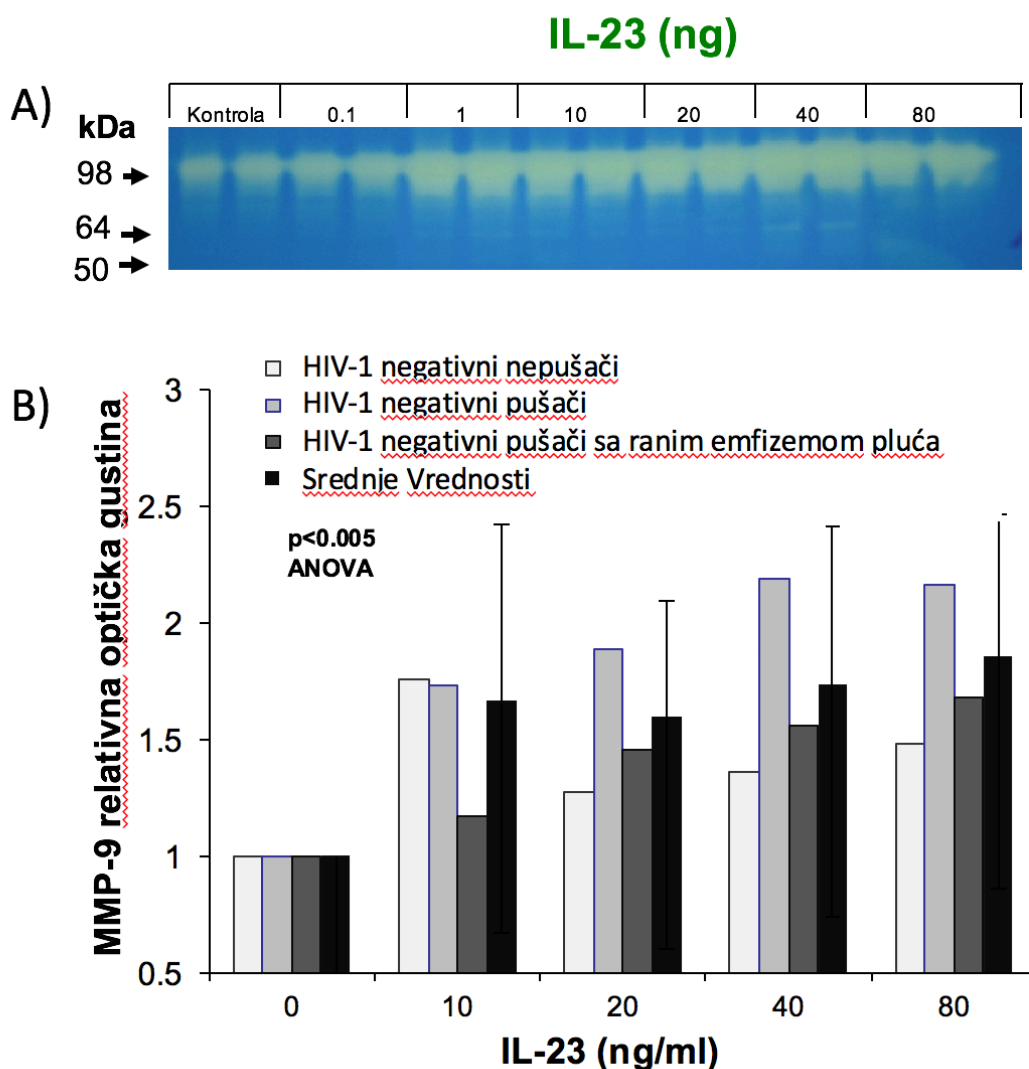
U cilju ispitivanja potencijalnog dejstva IL-23 na alveolarne makrofage i njihovu produkciju MMP-9, koristili smo kulture purifikovanih AM dobijenih bronholaveolarnim lavatom HIV-1 negativnih pušača. Nakon stimulacije kultura ćelija purifikovanim citokinom IL-23 *in vitro*, RNK je izolovana iz adherentnih ćelija, a relativna ekspresija iRNK MMP-9 je kvantifikovana pomoću Taqman RT-PCR tehnike. Stimulacija AM sa IL-23 dovodi do nevelike ali veoma konzistentno povišene ekspresije MMP-9 (*Slika 12*; n=13, srednje vrednosti \pm vrednosti standardne devijacije $p < 0.005$, ANOVA).



Slika 12: Stimulacija AM razlicitim koncentracijama IL-23 (0.1 ili 10 ng/ml) indukuje pojačanu ekspresiju MMP-9 gena (n=13, p<0.005, ANOVA)

4.7 Efekat IL-23 stimulacije AM na pojačanu koncentraciju MMP-9 u medijumu ćelijskih kultura

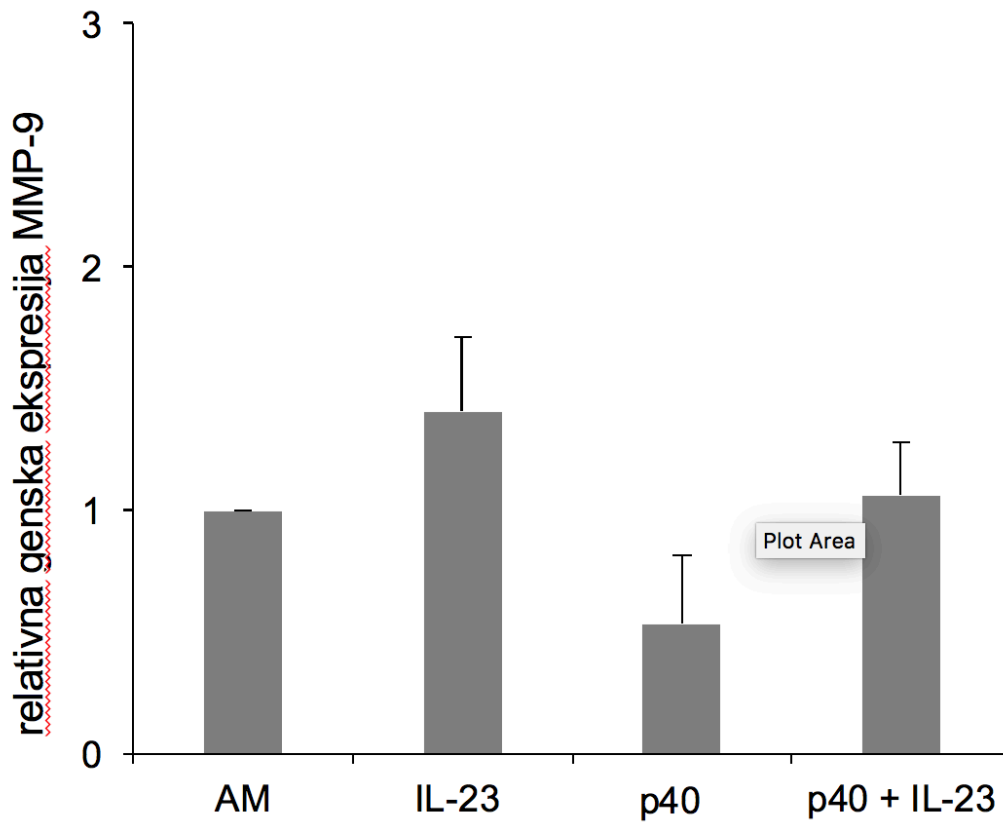
S obzirom da je MMP-9 genska ekspresija pojačana pod dejstvom IL-23, odlučili smo da ispitamo vrednosti koncentracije solubilnog MMP-9 u kulturama AM HIV-1 negativnih pušača po dodavanju IL-23. Vrednosti koncentracija MMP-9 u ćelijskim medijima obogaćenim različitim koncentracijama IL-23 su određene pomoću želatin zimografije, a kvantifikovane pomoću optičke analize putem *IMAGE J* softvera. *Slika 13A* prikazuje reprezentativni zimogram koji oslikava rezultat ponovljenih eksperimenata koji konzistentno ukazuju na pojačane koncentracije MMP-9 u ćelijskim medijumima izloženim IL-23. Srednje vrednosti rezultata kvantifikacije želatin zimografske analize aktivnosti MMP-9 u supernatantima kultura AM su prikazane na *Slici 13B* koja ukazuje da IL-23 indukuje pojačano lučenje MMP-9 nezavisno od fenotipskih karakteristika ispitivanih AM (rezultati prikazuju srednje vrednosti optičkih gustina 10 nepušača, 9 pušača i 5 pušača sa ranim emfizemom pluća). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da povišene koncentracije IL-23 direktno dovode do pojačane sekrecije metaloproteinaza u plućima, i samim tim, do prevremenog razvoja emfizema u plućima HIV-1 pozitivnih pušača.



Slika 13: Koncentracija MMP-9 je povišena u supernatantima ćelijskih kultura stimulisanih različitim koncentracijama IL-23. A) Primer želatin zimograma (reprezentativni rezultat multiplih eksperimenata) koji ukazuje na dozno-zavisnu uticaj IL-23 na koncentraciju MMP-9 i indukciju pojačane sekrecije MMP-9 od strane kultura AM koje su stimulisane sa IL-23 B) Grafik predstavlja srednje vrednosti rezultata kvantifikacije želatin zimogramske analize aktivnosti MMP-9 u supernatantima kultura AM HIV-1 negativnih nepušača ($n=10$), HIV-1 negativnih pušača ($n=9$) i HIV-1 negativnih pušača sa ranim emfizemom pluća ($n=5$) stimulisanih različitim koncentracijama IL-23 (0-80ng/ml). Srednje vrednosti svih uzoraka zajedno nezavisno od fenotipa su prikazane kao četvrti, posebni stubić ($n=24$, $p<0.005$, ANOVA)

4.8 Efekat IL-23 blokirajućeg antitela p40 na pojačanu sekreciju MMP-9 u kulturama AM stimulisanim sa IL-23

Polazeći od činjenice da su alveolarni makrofagi osetljivi na dejstvo različitih signalnih molekula i da je sekrecija metaloproteinaza prilično nespecifična za makrofage koje prolaze kroz aktivaciju, odlučili smo da ispitamo da li je dejstvo IL-23 specifično za sam citokin ili je opaženi efekat posledica neprepoznate kontaminacije kultura; prema specifikaciji proizvođača, purifikovani IL-23 ima nemerljivu koncentraciju endotoksina i zagarantovanu čistoću, a sami eksperimenti su postavljeni u sterilnim uslovima. U cilju eliminisanja mogućnosti da kontaminacija purifikovanog citokina može doprineti postizanju uočenog efekta, postavili smo eksperiment u kome su ćelijske kulture AM izložene solubilnom IL-23 blokirajućem antitelu anti-*p40*, specifičnom za IL-23 *p40* subjedinicu ovog citokina. Kao što je prikazano na *Slici 14*, rezultat tri eksperimenta nije pokazao statistički značajnu supresiju ali ukazuje na jasan trend da anti IL-23 *p40* atenuira efekat pojačane genske ekspresije MMP-9 u alveolarnim makrofagima stimulisanim sa IL-23 (n=3, ANOVA p=0.92).



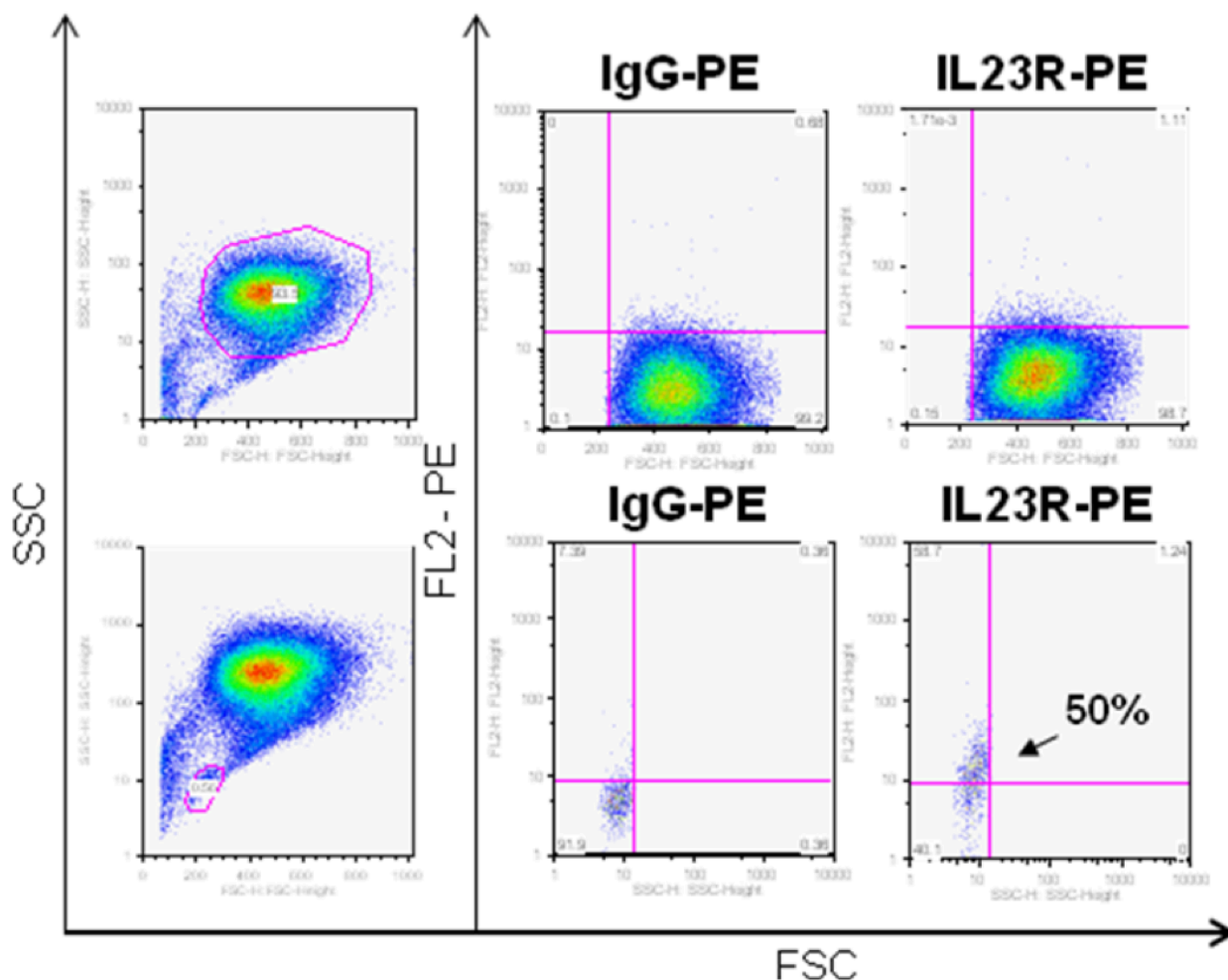
Slika 14: Efekat blokirajućeg anti-p40 antitela na IL-23-indukovanu ekspresiju MMP-9. Kulture AM koje su inkubirane sa anti-p40 antitelom, a zatim stimulisane sa IL-23 ne pokazuju pojačanu ekspresiju MMP-9, efekat koji je observiran u kulturama izloženim samo IL-23 bez blokirajućeg antitela

4.9 AM ne ekspimiraju membranski receptor IL-23R

IL-23 je produkovan od strane različitih ćelija imunskog sistema, a svoju funkciju ovaj citokin ostvaruje interakcijom sa IL-23 receptorom (IL-23R) koji je ekspimiran na limfocitima [120]. Obzirom da je prisustvo IL-23 opisano na AM u plućima obolelim od različitih hroničnih bolesti, odlučili smo da ispitamo mogućnost prisustva i ekspresije ovog molekula na normalnim AM. Koristeći *GeneSpring Affymetrix* analizu sa *P-call value* od 20% kao donju granicu detekcije genske

ekspresije, analizirali smo transkriptome 87 individua (24 NP, 34 P, 18 PRE i 11 H+PRE) i došli do zaključka da IL-23R nije eksprimiran na AM. Ovaj rezultat je konzistentan sa istim rezultatima analize transkriptoma 9 HIV-1 negativnih individua pomoću *RNK-seq* podataka (*Whole Transcriptome shotgun Sequencing*) prethodno urađenim u ovoj laboratoriji (neprikazani podaci).

U cilju analize mogućeg prisustva IL-23R na površini AM, izvršili smo analizu sveže izolovanih ćelija iz tečnosti BAL putem protočne citometrije. Ćelije korišćene za ove analize nisu prethodno kultivisane u cilju minimalizovanja oštećenja ćelijske membrane adherencijom. Analizom ćelija BAL tečnosti, IL-23R nije pronađen na membranama alveolarnih makrofaga (*Slika 15*, gornji red), pri čemu ova analiza predstavlja reprezentativni uzorak najmanje pet sličnih eksperimenata analize AM različitih individua. Kao pozitivna kontrola prisustva IL-23R na površini ćelija, iskorišćena je mala populacija selektovanih morfološki značajno različitih, neadherentnih ćelija tečnosti BAL-a koju predstavljaju predominantno limfociti i neutrofilni (*Slika 15*, donji red). Ovaj podatak je ujedno i dokaz da je, iako neeksprimiran na AM, IL-23R prisutan u makrosredini pluća pušača.

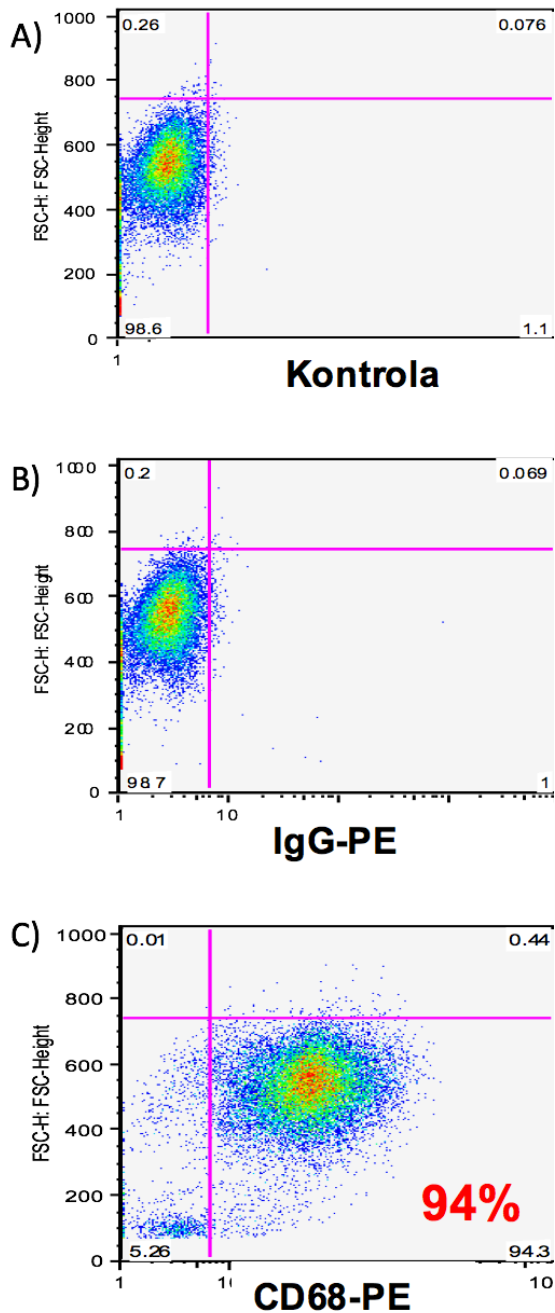


Slika 15: AM ne eksprimiraju membranski receptor IL-23R. Analiza BAL HIV-1 negativnog pušača sa ranim emfizemom pluća putem protočne citometrije. Čelije su inkubirane sa humanim IgG-PE kao negativnom kontrolom i mišijim anti-humanim IL-23R-PE antitelom u odnosu 1:50. U gornjem redu, selektovana populacija ćelija koje morfološki odgovaraju populaciji AM ostaje negativna nakon izlaganja IL-23R-PE. U donjem redu, selektovana populacija ćelija koje odgovaraju limfocitima i/ili neutrofilima po veličini i procentu pokazuje umeren pozitivan efekat sa više od 50% ćelija koje su pozitivne na IL-23R bojenje.

Podaci dobijeni putem DNK mikročip analize, RNK sekvenciranjem, Taqman RT-PCR i protočnom citometrijom zajedno ukazuju da IL-23R nije eksprimiran na AM HIV-1 negativnih nepušača, HIV-1 negativnih pušača sa ranim emfizemom pluća kao ni na AM HIV-1 pozitivnih osoba. Iako je mogućnost ekspresije IL-23R opisana u ćelijama BAL u sarkoidozi [77], mi nismo našli nikakav dokaz da alveolarni makrofagi eksprimiraju ovaj receptor. Odsustvo ekspresije IL-23R na AM implicuje da mogući efekat IL-23 na indukciju ekspresije MMP-9 u AM, nije posledica direktnog dejstva ovog citokina na membranski receptor na AM.

4.10 Efekat IL-23 na AM nije direktan već je moguća posledica prisustva ćelija koje indirektno utiču na AM

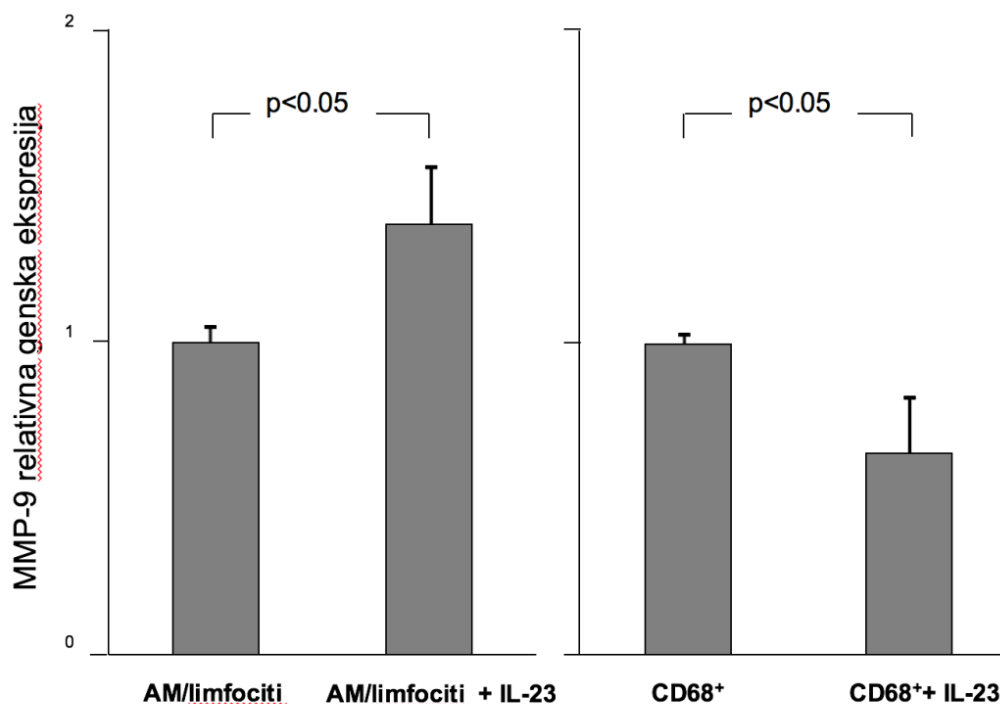
Mogućnost da ćelije koje nisu AM igraju posrednu ulogu u indukciji MMP-9 je istražena kao jedno od mogućih objašnjenja ovog fenomena. Anti CD-68 antitela, koja kao svoj specifični antigen imaju CD-68, glikoprotein eksprimiran od strane AM ali ne i limfocita, su korišćena za bojenje ćelija koje predstavljaju standardne kulture AM dobijenih adherencijom tokom inkubiranja na telesnoj temperaturi u ćelijskim pločama bunara ravnog dna. Adherencijom prečišćene kulture AM su dalje obrađene niskom koncentracijom EDTA koja je omogućila odlepljivanje AM zarad analize čistoće ovakvih kultura. AM koji su na ovaj način dobijeni su obojeni anti CD-68 antitelom konjugovanim sa fikoeritriinom a zatim je procenat pozitivnih ćelija kvantifikovan putem protočne citometrije (*Slika 16*). Procenat pozitivnih ćelija je 94%, što ukazuje na sledeće: a) da su kulture AM pripremane klasičnom metodom adherencije adekvatno prečišćene i da je njihova čistoća u skladu sa podacima iz literature (više od 90%) b) da, uz najbolje napore da čistoća ćelija bude adekvatna, postoji značajan broj ćelija koje mogu da doprinesu malom, no dovoljno klinički značajnom fenomenu hronične pojačane indukcije MMP-9. Samim tim, standardne kulture AM u suštini predstavljaju ko-kulture AM sa drugim ćelijama, uključujući i limfocite, dominantnu populaciju preostalih ćelija.



Slika 16: Procenat CD68+ ćelija u populaciji alveolarnih makrofaga dobijenih klasičnim postupkom adhezije za plastiku. Čistoća kultura AM je proverena bojenjem sa makrofagnim markerom CD-68; A) i B) predstavljaju negativne kontrole, bez antitela, i ćelije bojene anti-humanim IgG antitelom dok slika C) ukazuje da je čistoća ovakvih kultura visoka (94%) i u skladu je sa stručnom literaturom, no takođe pokazuje da ovakve kulture verovatno predstavljaju "ko-kulture" AM-limfocita

4.11 Prečišćeni AM stimulirani IL-23 ne pokazuju pojačanu ekspresiju MMP-9

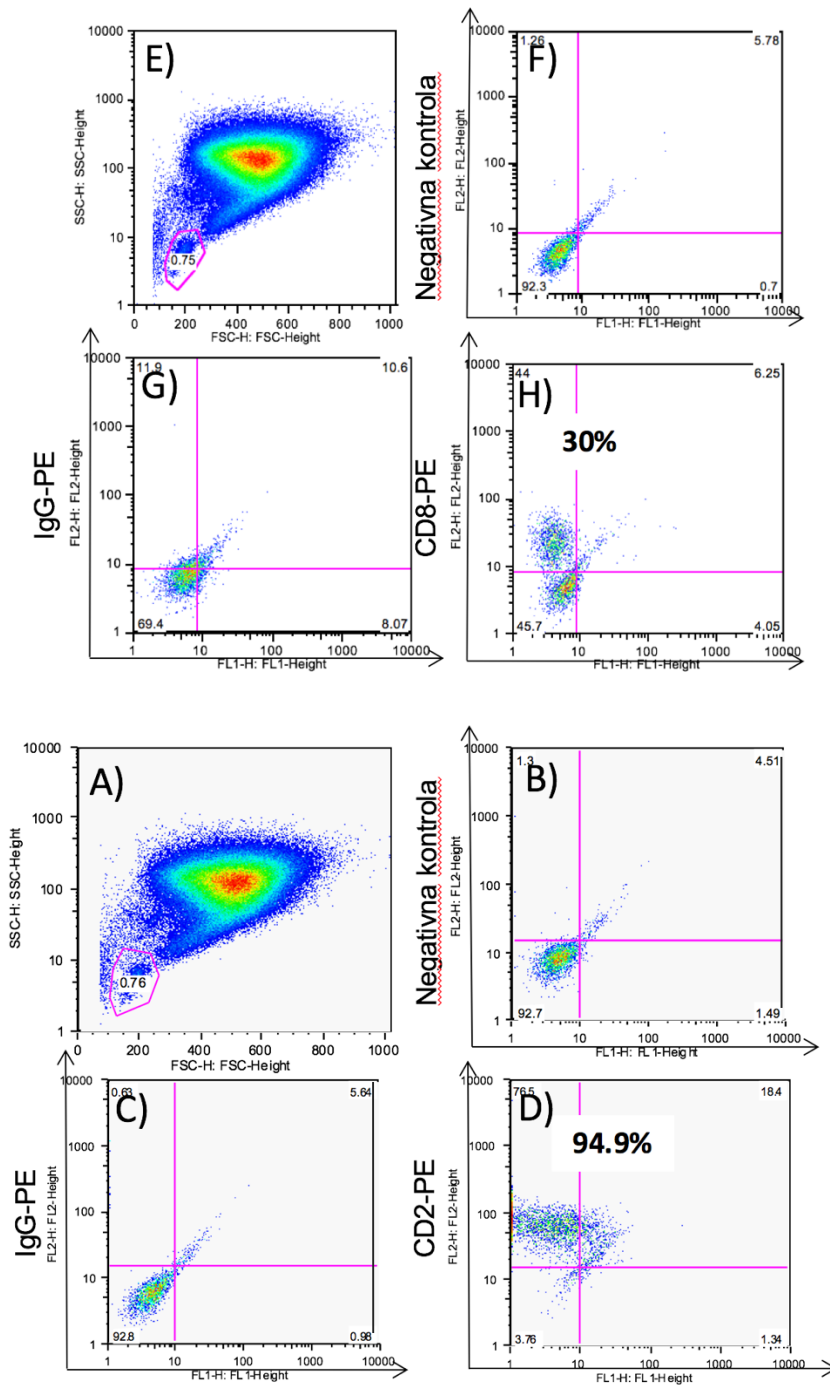
Efekat AM na stimulaciju IL-23 je dalje analizirana putem dodatnog prečišćavanja kultura AM. Anti CD68 antitela su pripremljena zajedno sa magnetnim mikrokuglicama, na taj način stvarajući antitelo-magnetna kuglica kompleks koji omogućava pozitivnu selekciju i separaciju CD68 pozitivnih AM. Nakon inkubacije ovog antitelo/magnetna mikrokuglica kompleksa sa ćelijama iz BAL, alveolarni makrofagi za koje su pričvršćeni namagnetisani kompleksi su izolovani putem magneteta, a zatim oslobođeni veze sa antitelom uz pomoć biotina. Na taj način prečišćeni AM su kultivisani u ćelijskim pločama i stimulirani sa IL-23 na prethodno standardizovan način korišćen u drugim eksperimentima. Kao kontrolni eksperiment, AM - tj, u ovom slučaju verovatne ko-kulture AM/limfocita - su kultivisane na standardan način i stimulirane istim koncentracijama IL-23. AM prečišćeni imunsko-magnetnim kompleksima nisu pokazali pozitivan efekat pojačane ekspresije MMP-9 koji je viđen u prethodnim kao i kontrolnim eksperimentima (*Slika 17*). Iako dodatni korak prečišćavanja ćelija teoretski može da umanjí adekvatnost ćelijskih mehanizama odgovora na citokinsku stimulaciju, i samim tim ukaže na alternativna objašnjenja rezultata eksperimenta, ovi rezultati su u skladu sa hipotezom da efekat IL-23 na pojačanu indukciju ekspresije i sekrecije MMP-9 može biti indirektan.



Slika 17. Prečišćene kulture AM ne reaguju na IL-23 stimulaciju pojačanom ekspresijom MMP-9. Kulture CD68+ prečišćenih AM su stimulisane sa IL-23 a kao pozitivna kontrola su korišćene ko-kulture AM-limfocita koje su dobijene na standardan način. U odnosu na ko/kulture AM-limfocita koje odgovaraju na IL-23 povišenom ekspresijom MMP-9, kulture prečišćenih ćelija ne odgovaraju na ovaj tretman povišenjem ekspresije MMP-9.

4.12 Uloga T-ćelija u IL-23 indukovanoj pojačanoj ekspresiji MMP-9

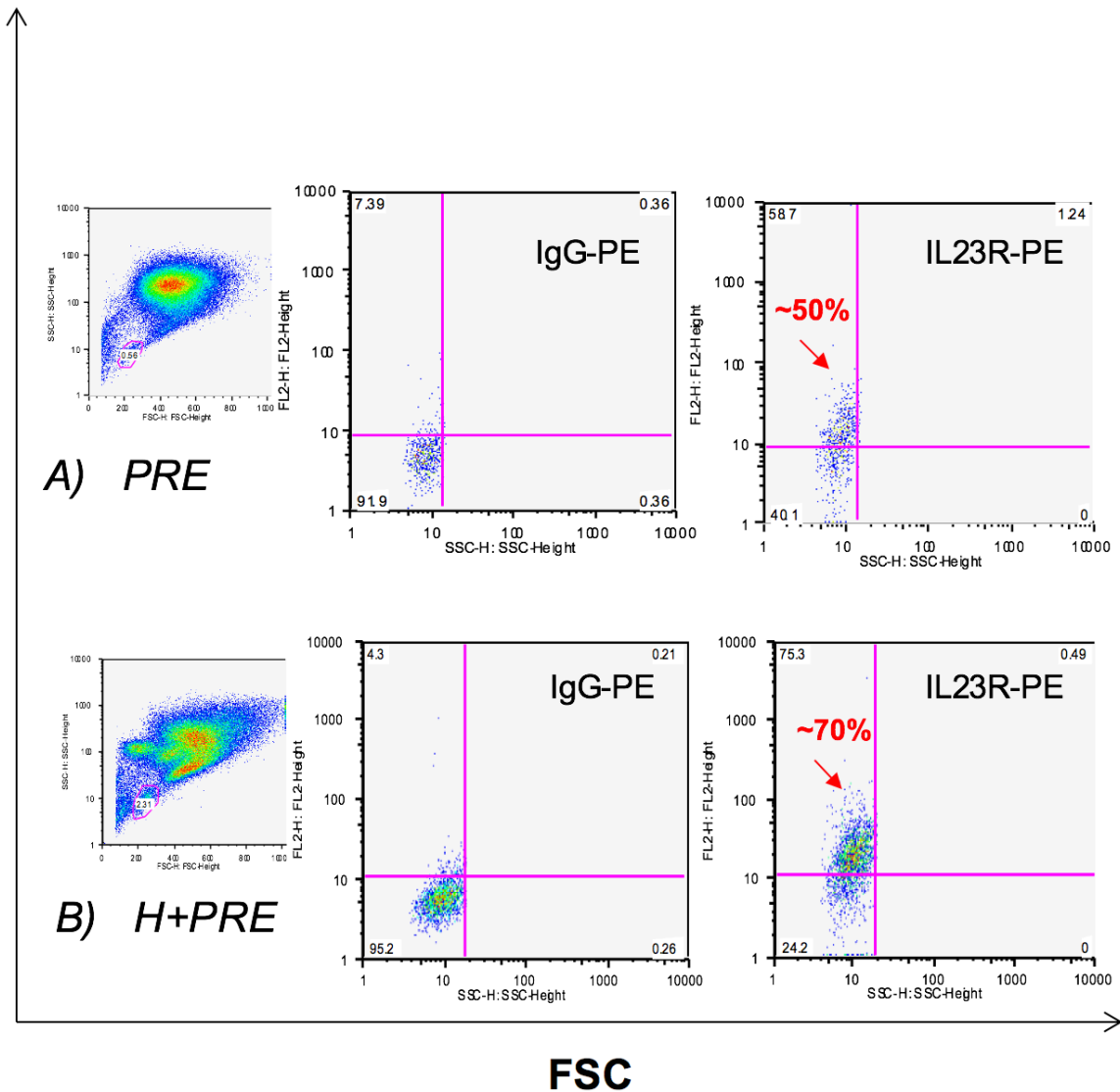
Ćelije kultura AM kao i sveži izolati BAL su analizirani pomoću protočne citometrije i selektovana populacija ćelija koje morfološki i po stepenu autoflorescencije odgovaraju limfocitima su selektovane i analizirane na prisustvo CD2 i CD8 ćelijskih markera. Bojenje ovih ćelija sa anti- CD2 i anti-CD8 antitelima konjugovanim sa fikoeritrinom ukazuje da T-ćelije predstavljaju visoki procenat ovih ćelija i da CD8 limfociti predstavljaju značajan procenat ovih T-ćelija (Slika 18).



Slika 18: Citofluorimetrijska analiza ćelija iz BAL. A) i E) predstavljaju selektovane populacije ćelija koje morfološki odgovaraju limfocitima B) i F) negativne kontrole bez antitela C) i G) predstavljaju negativne kontrole koje isključuju nespecifično vezivanje sa IgG-PE. D) prikazuje CD-2 pozitivne (94.9%) ćelije i B) prikazuje CD-8 pozitivne (>30%) ćelije

4.13 Ekspresija IL-23R na T-ćelijama

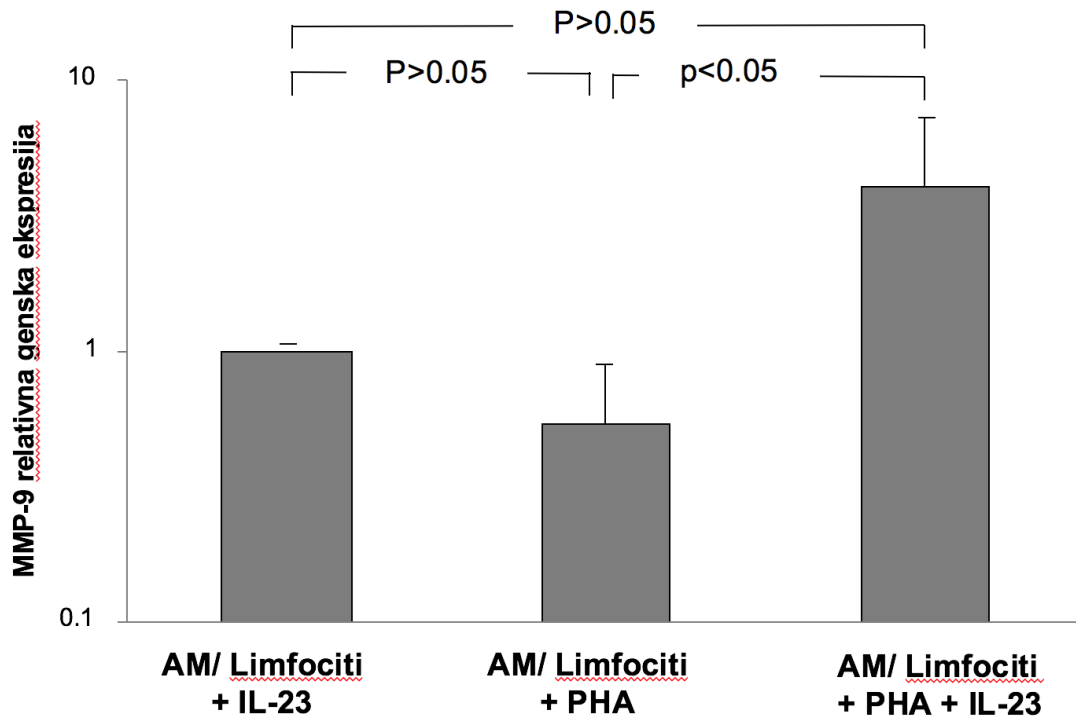
Publikovana literatura ukazuje da T-ćelije eksprimiraju IL-23R putem koga IL-23 ostvaruje direktan uticaj na limfocite [53, 57, 77, 121]. Da bi dokazali ovu tvrdnju, protočnom citometrijom smo analizirali populaciju ćelija iz BAL za koju smo prethodno pokazali da sadrži visoki procenat T-ćelija. Koristeći anti IL-23R antitela, pokazali smo da je IL-23R prisutan na ovim ćelijama među pušačima sa ranim emfizemom pluća nezavisno od njihovog HIV-1 statusa (*Slika 19*). Na osnovu ovih podataka, realno je pretpostaviti da T-ćelije igraju ulogu u modulaciji odgovora na IL-23 u mikrosredini pluća HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom putem angažovanja IL-23R.



Slika 19: IL23R na T-ćelijama HIV-1 negativnog i HIV-1 pozitivnog pušača sa ranim emfizemom pluća. A) Selektovana populacija je analizirana i predstavljena nakon bojenja sa negativnom IgG-PE kontrolom kao i bojenja sa IL23R-PE koje pokazuje da oko 50% ćelija pokazuje umereno pozitivno bojenje sa IL23R B) Primer analize ćelija HIV-1 pozitivnog pušača sa ranim emfizemom pluća pokazuje da se oko 70% limfocita umereno pozitivno boji nakon inkubacije sa anti-IL23R antitelom

4.14 Mitogenom aktivirani T limfociti reaguju pojačano na IL-23 stimulaciju

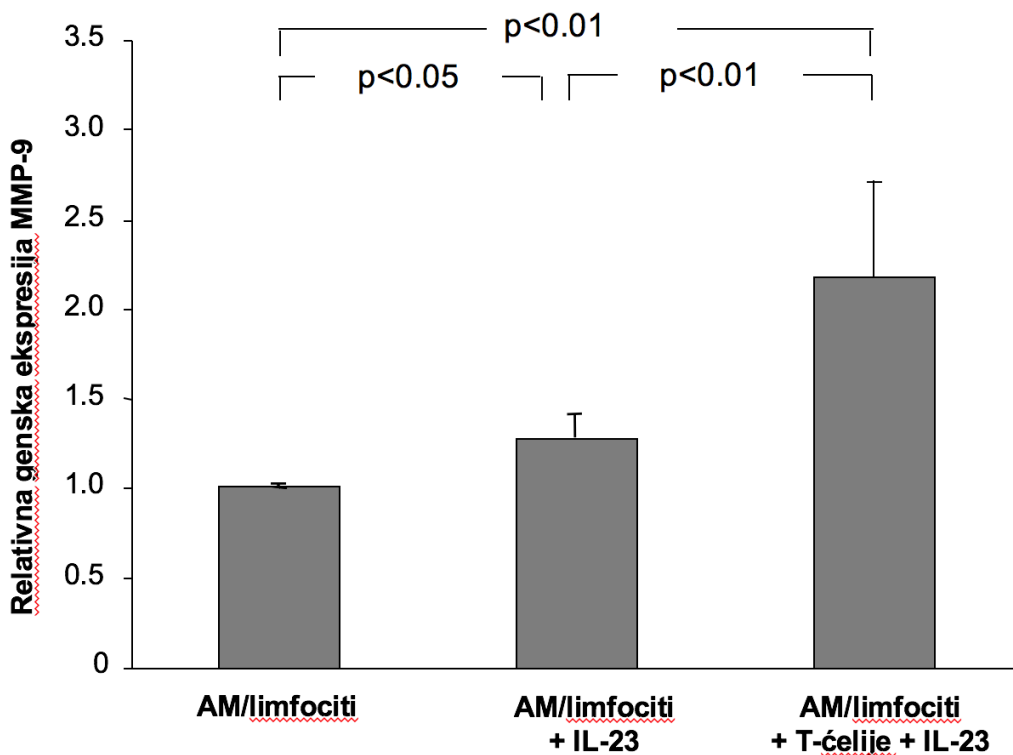
U cilju utvrđivanja uloge T-ćelija u stimulaciji MMP-9 ekspresije, analizirali smo efekat dodavanja fitohemaglutinina (PHA), lektina koji je mitogen specifičan za T-ćelije, na ko-kulture AM/limfocita. AM/limfocitne ko-kulture stimulirane sa IL-23 uz dodat PHA su pokazale pojačanu ekspresiju MMP-9 u odnosu na ko-kulture u koje su dodati sam IL-23 ilil sam PHA (n=4, p<0.05, Kruškal-Valis test, Slika 20)



Slika 20: Ko-kulture alveolarnih makrofaga/limfocita stimulirane sa PHA (20 µg/mL), a zatim izložene uticaju IL-23 (10ng/ml) pokazuju pojačanu ekspresiju MMP-9 u odnosu na ko-kulture AM-limfocita koje nisu bile izložene dejstvu PHA

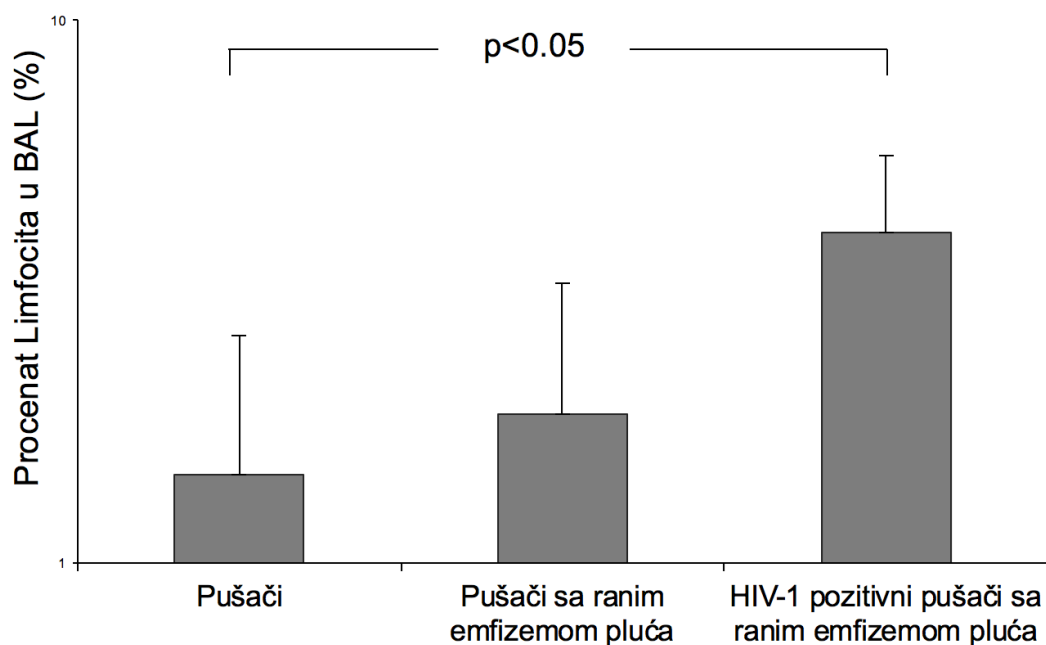
4.15 Efekat dodavanja prečišćenih T-ćelija ko-kulturama AM-limfocita stimuliranih IL-23

Na osnovu ovih podataka i činjenice da supernatanti BAL HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizmom pluća sadrže brojne citokine koji stimulišu T-ćelije (Slika 7), odlučili smo da analiziramo efekat dodavanja T-ćelija ko-kulturama AM-limfocita i njihov uticaj na ekspresiju MMP-9 nakon stimulacije IL-23 citokinom. T-ćelije smo izolovali iz tečnosti BAL putem formiranja rozeta sa ovčjim eritrocitima tretiranim neuraminidazom. U kulture AM-limfocita dobijene standardnom metodom adherencije AM, dodat je IL-23 u prisustvu ili bez prisustva prethodno prečišćenih T-ćelija u BAL tečnosti, a rezultujuća MMP-9 ekspresija je analizirana putem Taqman RT-PCR. Na osnovu rezultata više puta ponovljenih eksperimenata, došli smo do zaključka da kulture obogaćene dodatnim, prethodno prečišćenim T-ćelijama pokazuju značajno povišenu ekspresiju MMP-9 nakon stimulacije IL-23 (n=6, p<0.01, ANOVA, *Slika 21*).



Slika 21: Prečišćene T-ćelije, prethodno izolovane iz tečnosti BAL, a zatim dodate ko-kulturama AM/limfocita koje su stimulisane IL-23 citokinom (10ng-ml) dovode do pojačane ekspresije MMP-9 u odnosu na standardne ko-kulture AM/limfocita

U skladu sa ovim nalazom ide činjenica da povišeni nivoi MMP-9 u plućnoj mikrosredini korelišu sa povećanjem procenta limfocita u tečnosti BAL kod HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća u odnosu na HIV-1 negativne pušače ili pušače sa ranim emfizemom pluća (Slika 22)

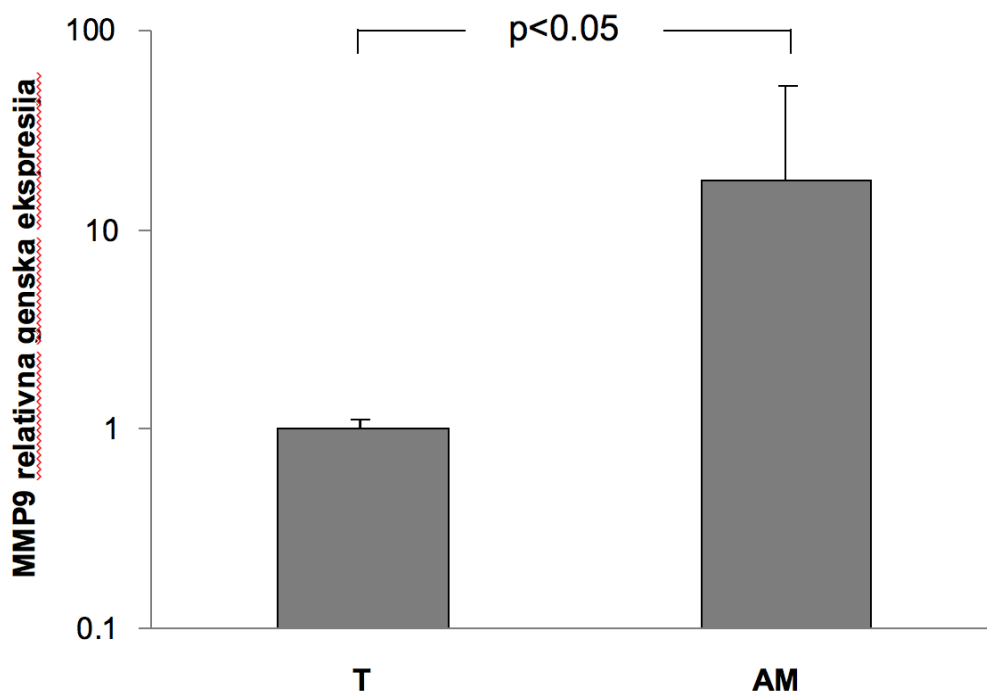


Slika 22:: Mikroskopska analiza ćelijskog sastava BAL HIV-1 negativnih pušača, HIV-1 negativnih pušača sa ranim emfizemom pluća i HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluć: procenat limfocita je povišen među H+PRE (n=12 P, 3 PRE, 4 H+PRE; $p < 0.05$, ANOVA)

4.16 Poređenje ekspresije MMP-9 u AM i T-ćelijama izolovanim iz bronhoalveolarnog lavata

S obzirom da T-ćelije iz periferne krvi produkuju MMP-9 (ref 45), uporedili smo gensku ekspresiju MMP-9 u dve vrste ćelija koje smo koristili u prethodnom eksperimentu – u AM i T-ćelijama iz BAL prečišćenim putem CD-2 magnetnim mikrokuglicama. Razlog korišćenja T-ćelija iz BAL u ovim eksperimentima je činjenica da same T-ćelije iz periferne krvi mogu biti značajno drugačijeg fenotipa u odnosu na ćelije koji su prethodno in vivo italik kohabitirale sa AM. Samim tim, u cilju kreiranja vernih uslova koji postoje u plućima, opredelili smo se za izolaciju BAL T-ćelija, proces nešto komplikovaniji u odnosu na izolovanje značajno brojnijih T-ćelija iz periferne krvi.

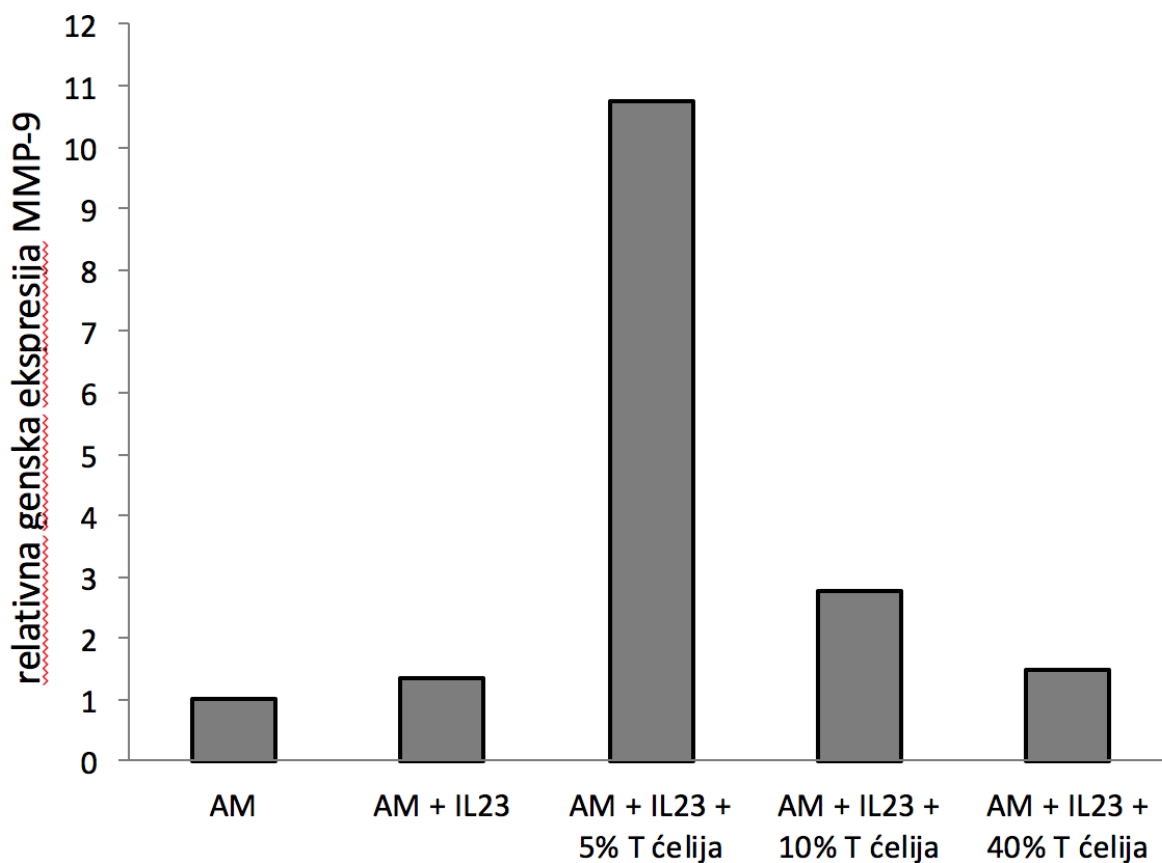
Iako i T limfociti i AM eksprimiraju MMP-9 gen, ekspresija MMP-9 je značajno veća u AM u odnosu na T-ćelije iz BAL ($p < 0.05$, Wilcoxon Signed-Rank test, Slika 22). Ovaj podatak otvara pitanje relativnog značaja MMP-9 koju sekretuju IL-23-stimulisani T limfociti. Iako je evidentno da aktivirani T limfociti mogu da sekretuju MMP-9 i doprinesu povišenju koncentracija ovog enzima u plućnoj mikrosredini, njihov doprinos totalnoj koncentraciji MMP-9 je mnogo manji u odnosu na AM koje su veće i brojčano više puta zastupljenije u plućnoj mikrosredini u odnosu na T limfocite. Zajedno sa ovde pokazanim rezultatom koji ukazuje da je apsolutna mogućnost sekrecije MMP-9 mnogo manja u T limfocitima u odnosu na AM, ovi podaci implikuju da je pojačana koncentracija sekretovanog MMP-9 pre rezultat pojačane ekspresije ovog enzima u AM nego u T-ćelijama (Slika 23).



Slika 23. Ekspresija MMP-9 u alveolarnim makrofagima (AM) je viša u odnosu na ekspresiju u T-ćelijama (T) iz tečnosti BAL ($n=11$, $p < 0.05$, Wilcoxon Signed-Rank test)

4.17 Efekat broja prisutnih T-ćelija u ko-kulturama AM-limfocita

Da bi testirali prethodno formulisanu tezu da T-ćelije, pored mogućnosti da same proizvode MMP-9, verovatno utiču na AM i njihovu ekspresiju MMP-9, efekat dodavanja T-ćelija ko-kulturama AM/limfocita je analiziran variranjem procenta dodatih T-ćelija. U slučaju da T-ćelijska produkcija MMP-9 ima najznačajniji uticaj na pojačano prisustvo MMP-9 u ovim kulturama, očekivan rezultat je porast ekspresije MMP-9 u zajedničkoj RNK uzrokovan povišenjem procenta T-ćelija u ovim ko-kulturama. Nizom sličnih eksperimenata sa različitim procentima dodatih ćelija pokazali smo da umereno povećani procenat T-ćelija u ovim ko-kulturama (5 ili 10%) utiče na pojačanu ekspresiju MMP-9 značajnije u odnosu na visoke procente dodatih T-ćelija (40%) što je demonstrirano na *Slici 24* koja prikazuje jedan, reprezentativni primer od nekolicine sličnih, ali ne istih po procentu dodatih ćelija, eksperimenata.



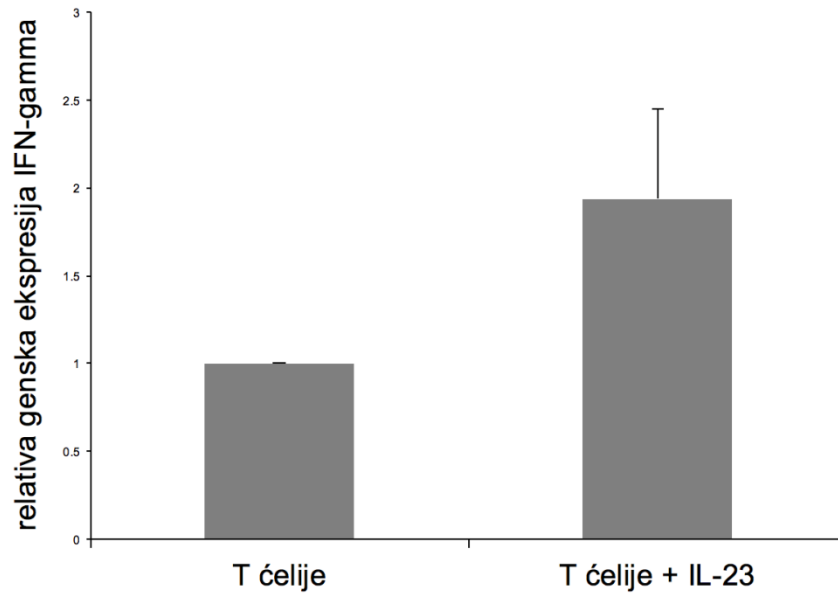
Slika 24: Efekat dodavanja T-ćelija kulturama AM stimulisanim IL-23 (10ng-ml): Najveći efekat na ekspresiju MMP-9 u ovako pripremljenim ko-kulturama imaju niži (5%) procenti dodatih T-ćelija. Dodavanjem visokog procenta T-ćelija (40%), pozitivni efekat T-ćelija na indukciju ekspresije MMP-9 se gubi. Prikazane vrednosti predstavljaju rezultate jednog reprezentativnog eksperimenta

Ovaj fenomen je moguće objasniti efektom “dilucije” ekspresije MMP-9 - činjenica da povećani broj ćelija koje, na jednoj strani indukuju ekspresiju MMP-9 u AM, ali u isto vreme same po sebi ekspimiraju MMP-9 u značajno manjoj meri, verovatno dovodi do rezultirajuće niže ekspresije MMP-9 u zajedničkoj, izolovanoj RNK. Alternativno objašnjenje ovakvih rezultata bi moglo da implicuje bifazični efekat T-ćelija na AM pre čemu više T-ćelija oslobađa različite suprimirajuće citokine ili isti citokini u

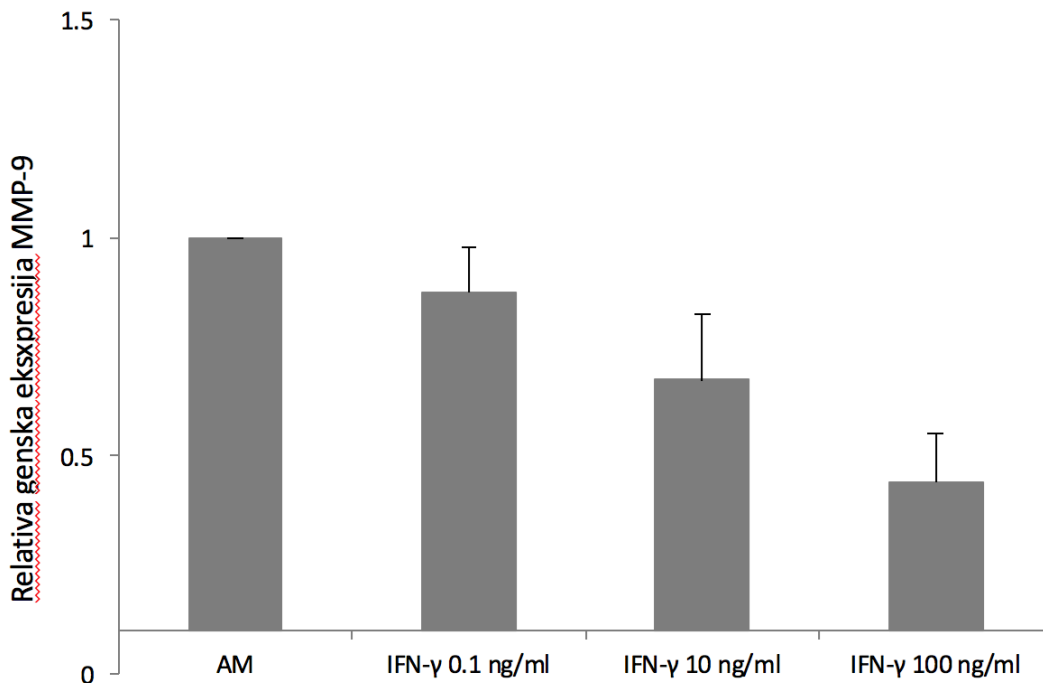
većim dozama indukuju suprimirajući efekat na AM. Takođe, ne možemo da isključimo mogućnost da druge ćelije poput NK ćelija ili neutrofila učestvuju zajedno sa T-ćelijama u indukciji pojačane ekspresije MMP-9 u AM. I pored toga, na osnovu rezultata naših eksperimenata, izvesno je da T-ćelije, iako nisu primarni izvor pojačanog prisustva MMP-9, najverovatnije igraju značajnu ulogu u indukciji sekrecije MMP-9 od strane AM. Prikazani rezultati pokazuju da citokin IL-23 zaista može da utiče na pojačano prisustvo proteolitičkog enzima MMP-9 u plućnoj mikrosredini HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom, pri čemu taj efekat IL-23 ne ostvaruje direktnim dejstvom na AM, već putem interakcije AM i T-ćelija.

4.18 Interferon-gama kao mogući posredujući citokin između T-ćelija i AM koji pojačano proizvode MMP-9

S obzirom na prisustvo IFN- γ u supernatantima BAL u istim kliničkim fenotipovima u kojima su identifikovani povišeni nivoi IL-23 (PRE, H+NS, H+PRE), procenjena je uloga ovog citokina kao potencijalnog posrednika u produkciji MMP-9 tokom interakcije T limfocita i AM. Iako T-ćelije stimulisane IL-23 mogu da pojačano eksprimiraju IFN- γ kao što je pokazano u našim *in vitro* eksperimentima (*Slika 25*), ali i opisano u publikovanoj literaturi [122, 123], IFN- γ ne indukuje pojačanu ekspresiju MMP-9 u humanim ćelijama (*Slika 26*). Nedostatak pozitivnog uticaja IFN- γ na indukciju ekspresije MMP-9 je takođe prethodno opisan u stručnoj literaturi [124-127] što, zajedno sa našim podacima, jasno ukazuje da je malo verovatno da ovaj citokin igra posredničku ulogu u fenomenu IL-23 indukovane ekspresije MMP-9 u alveolarnim makrofagima.



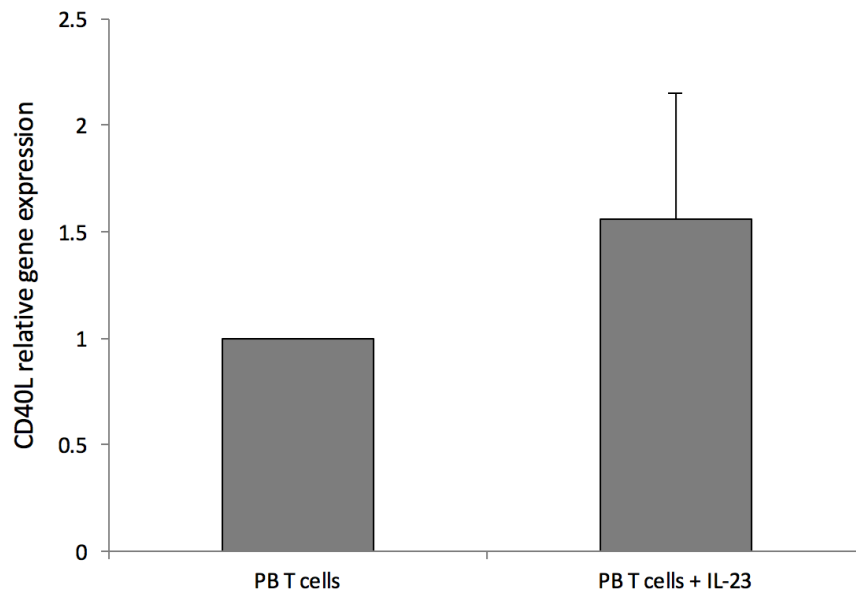
Slika 25: Efekat stimulacije T-ćelija iz perifrne krvi sa IL-23 (10ng/ml) na ekspresiju IFN- γ . Rezultat predstavlja srednje vrednosti četiri nezavisna eksperimenta i pokazuje trend ka povišenju ekspresije IFN- γ bez statističkog značaja ($p=0.8$, ANOVA).



Slika 26: Stimulacija alveolarnih makrofaga sa IFN- γ ne indukuje pojačanu ekspresiju MMP-9 ($n=5$, $p=0.9$, ANOVA)

4.19 IL-23 indukuje ekspresiju CD-40L na T-ćelijama

Dok je dobro poznata citokinima-posredovana komunikacija među ćelijama, pri kojoj AM reaguju na specifične citokine sekretovane od strane T-ćelija, takođe je opisana interakcija između ovih ćelija putem direktnog kontakta koji uključuje prepoznavanje antigena i antigen-specifičnog receptora na ćelijskoj membrani [128, 129]. Dodavanje IL-23 T-ćelijama ekstrahovanim iz periferne krvi *in vitro*, dovodi do blagog trenda ka pojačanju ekspresije CD40L, što je pokazano u našim eksperimentima na T-ćelijama izolovanim iz periferne krvi (Slika 27, $n=5$, $p=0.7$, ANOVA). Ova činjenica ukazuje na mogućnost da direktan kontakt među ćelijama igra ulogu u pokazanom efektu IL-23 na ko-kulture AM i T limfocita.



Slika 27: Stimulacija T-ćelija iz periferne krvi intereukinom IL-23 (10ng/ml) *in vitro* indukuje pojačanu ekspresiju gena liganda CD40L. Prikazane su srednje vrednosti pet nezavisnih eksperimenata. ($n=5$, $p=0.7$, ANOVA)

5. DISKUSIJA

Povećana ekspresija MMP-9 u alveolarnim makrofagima je povezana sa razvojem emfizema pluća što je pokazano i na životinjskim modelima i u humanim studijama [13, 29, 30, 34, 35]. *Yearsley i saradnici* [130] su prvi autori koji su, putem autopsije, ukazali na činjenicu da HIV-1 pušači sa emfizemom pluća imaju povišenu ekspresiju MMP-9 u tkivu pluća. Dalja istraživanja [38] su pokazala da HIV-1 pozitivni pušači sa emfizemom imaju i povećanu ekspresiju MMP-9 u alveolarnim makrofagima, kao i povećanu koncentraciju aktiviranih MMP-9 u supernatantima BAL u odnosu na HIV-1 negativne pušače sa emfizemom. Osobe inficirane virusom HIV-1 imaju povećanu koncentraciju i gensku ekspresiju inflamatornih citokina u plućima [13, 131-133]. Naše istraživanje je potvrdilo obe pretpostavke, prethodno podržane malim brojem podataka – supernatant dobijen centrifugiranjem BAL, tj tečnost koja oblaže donje disajne puteve HIV-1 pozitivnih pušača sadrži povišene koncentracije MMP-9 i povišene koncentracije različitih inflamatornih citokina, a alveolarni makrofagi imaju povišenu ekspresiju MMP-9 i određenih proinflamatornih citokina.

S obzirom da inflamatorni citokini mogu da direktno utiču na pojačanu ekspresiju MMP u alveolarnim makrofagima, logično je postaviti pitanje da li postoji direktna uzročno-posledična veza između ovih pojava. Analiza koncentracije citokina koja pokazuje njihove povišene koncentracije u plućima HIV-1 pozitivnih pušača se uklapa u prethodno objavljene nalaze drugih autora [4, 6, 112, 133-135]. Detaljno analizirajući razlike u citokinskom profilu supernatanta dobijenih centrifugiranjem BAL različitih fenotipova u odnosu na pušenje i HIV-1 status, vredna pažnje je činjenica da HIV-1 negativni pušači sa sniženim DL_{CO} imaju povišene koncentracije citokina koji karakterišu Th-17 imunski odgovor, što je takođe odlika HIV-1 pozitivnih pušača sa sniženim DL_{CO} , ali i HIV-1 pozitivnih nepušača. Nasuprot njima, HIV-1 negativni pušači i HIV-1 negativni nepušači nemaju povišene koncentracije ovih citokina u supernatantima BAL. Prisustvo proinflamatornih Th-17 citokina koji su zajednička odlika HIV-1 pozitivnih i HIV-1 negativnih pušača sa ranim

emfizemom pluća ukazuje na mogućnost da ovi citokini utiču na razvoj emfizema u ovim populacijama.

Činjenica da HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom imaju povišene nivoe citokina koji karakterišu Th-17 imunski odgovor nije u potpunosti iznenađujuća uzevši u obzir da, iako dovoljno ubedljivi podaci još uvek nisu dostupni, izvestan broj novih studija poklanja veliku pažnju značaju Th-17 ćelijskog odgovora u razvoju patoloških promena u plućima [60, 78, 136, 137]. Th-17 ćelijski odgovor je opisan ne tako davno i to nakon identifikacije citokina IL-23 i IL-17, tj njihove uloge u autoimunskim bolestima [51, 57, 138, 139]. Ovo otkriće je dovelo do revizije klasične pretpostavke da se CD4+ ćelijski imunski odgovor jednostavno deli na Th-1 i Th-2 klasu. Th-17 ćelije, koje se karakterišu prisustvom efektorskih citokina IL-17 i IL-22, a koje regulišu citokini kao što je IL-23, funkcionalno se razlikuju od Th-1 ćelija i citokina kao što su IL-12 i IFN- γ koji karakterišu Th-1 klasu ćelijskog odgovora [51]. U zavisnosti od mikrosredine, patološkog procesa koji ga indukuje i perioda u kome se javlja, Th-17 odgovor bi mogao da ima i pozitivnu i negativnu ulogu u imunskim procesima i bolestima pluća [59]. Th-17 ćelije verovatno igraju protektivnu ulogu u borbi organizma protiv određenih ekstraćelijskih bakterija i gljiva [57-60]. Istovremeno, Th-17 ćelije i citokini koje one proizvode verovatno igraju prominentnu ulogu u patogenezi inflamatornih bolesti pluća, gde je moguće da utiču na hroničnu inflamaciju i oštećenje tkiva [60, 79, 137]. Osobe obolele od COPD, čak i u slučaju adekvatne kontrole bolesti, imaju povišene nivoe Th-17 citokina koji indukuju ili, u najmanju ruku, reflektuju prisustvo hronične inflamacije [78, 140]. Miševi izloženi duvanskom dimu pokazuju pojačanu ekspresiju IL-17 [141], dok su IL-17 *knockout* miševi kojima nedostaje IL-17 zaštićeni od razvoja emfizema uprkos izlaganju duvanskom dimu [78]. Pacijenti sa stabilnim COPD imaju povišen broj IL-22 i IL-23 pozitivnih ćelija u epitelu bronhija kao i povišen procent IL-17 pozitivnih ćelija u submukozi [117]. Procenat IL-17 ćelija u bronhijalnoj submukozi je takođe povišen među bivšim pušačima obolelim od blagog do umerenog COPD u odnosu na nepušače [142]. U istoj studiji, mala ali statistički

značajna razlika u nivoima IL-17 u sputumu koreliše sa nivoima bronhoobstrukcije i pogoršanja plućne funkcije, no ne koreliše sa inflamacijom disajnih puteva [142].

Na osnovu rezultata naših eksperimenata, rani emfizem, bez obzira na HIV-1 status, koreliše sa pojačanim prisustvom Th-17 citokina i interesantna je pretpostavka da stepen hronične inflamacije, a samim tim i prisustvo simptoma, može biti povezano sa stepenom Th-17 inflamatornog odgovora u plućima. U skladu sa ovom hipotezom postoji i paralelan razvoj terapijskih strategija blokiranja efekta IL-17 antitelima koje svoje prve pozitivne rezultate beleže u treatmentu psorijaze i Kronove bolesti [143-145], dok su rane faze istraživanja njihovih efekata u terapiji COPD u toku.

Infekcija alveolarnih makrofaga HIV-1 virusom dovodi do pojačanog inflamatornog odgovora, a nizom eksperimenata koji pokazuju pojačano prisustvo Th-17 citokina u supernatantima lavata pluća *ex vivo*, kao i indukciju ekspresije i sekrecije Th-17 citokina IL-23 po infekciji AM laboratorijskim JRFL HIV-1 virusom, pokazali smo da HIV-1 može da izazove hroničnu inflamaciju u disajnim putevima i potencira Th-17 imunski odgovor u plućima pušača, na taj način verovatno doprinoseći ranom razvoju emfizema.

IL-23 je jedan od ključnih citokina koji karakterišu Th-17 imunski odgovor, i kao takav predstavlja jednu od bitnih veza između urođenog i stečenog tipa imunosti u organizmu [57, 146]. IL-23, iako nije suštinski bitan za diferencijaciju Th-17 ćelija, igra veoma važnu ulogu u održavanju efektornih uloga ovog imunskog odgovora [147]. IL-23 je mahom eksprimiran od strane aktiviranih makrofaga i dendritskih ćelija, dok se receptor za *p19* subjedinicu IL-23 (IL-23R) nalazi na ćelijskoj membrani memorijskih T-ćelija koje imaju karakteristike Th-17 odgovora [121]. IL-23 disregulacija može da dovede do nemogućnosti organizma da odgovarajuće reaguje na određene patogene u slučaju nedovoljnog prisustva ovog citokina, no isto tako, povišeno prisustvo IL-23 može da dovede do prisustva različitih autoimunskih kliničkih fenomena [68, 140]. Sve je više dokaza koji ukazuju da IL-23 igra ulogu u mnogobrojnim hroničnim plućnim oboljenjima kao što su astma, COPD, sarkoidoza,

hronične infekcije ili rak pluća [71-75, 77, 83]. Genska ekspresija IL-23 je pojačana kod pušača obolelih od COPD u odnosu na nepušače a, prema životinjskom modelu, duvanski dim indukuje ekspresiju IL-23 u plućima [148]. Povišeni nivoi IL-23 korelišu sa povišenim nivoima metaloproteinaza kao što je pokazano u eksperimentima na miševima koji nemaju gen za TLR4 [149], ili perifernoj krvi osoba sa multiplom sklerozom [150]. Činjenica da intranazalna aplikacija citokina IL-23 na mišjem modelu dovodi do pojačane produkcije MMP-9 koji dalje dovodi do destrukcije plućnog parenhima ide u prilog tezi mnogih autora da IL-23 igra značajnu ulogu u razvoju hronične obstruktivne bolesti pluća [80, 115, 151]. Na osnovu svih ovih podataka, postavili smo hipotezu da povišeni nivoi interleukina IL-23 u distalnim disajnim putevima HIV-1 pozitivnih pušača utiču na pojačanje produkcije MMP-9 u mikrosredini pluća.

Rezultati naše studije potvrđuju podatke koji ukazuju na značaj IL-23 u razvoju inflamacije pluća i pojačanog prisustva MMP-9. Nizom eksperimenata smo pokazali da alveolarni makrofagi reaguju na stimulaciju interleukinom IL-23 pojačanom ekspresijom gena za MMP-9 i pojačanom produkcijom ovog enzima MMP-9. Specifičnost ovog efekta i odbacivanje pretpostavke da kontaminacija uzoraka ili čistoća rekombinantnog citokina IL-23 utiče na pojačanu ekspresiju MMP-9 je dokazana blokirajućim efektom anti IL-23 p40 antitelom.

Jedan od nedostataka naše studije je činjenica da je efekat IL-23 na pojačano prisustvo MMP-9 u plućima HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća pokazan isključivo *in vitro*, tako da ostaje da spekuliramo da je ovaj odnos sličan *in vivo* uslovima. Takođe, iako je izvesno da i MMP-9 i IL-23 igraju ulogu u ranom razvoju emfizema u plućima HIV-1 pozitivnih pušača, adekvatno testiranje njihove uzročno posledične vezi ima niz prepreka. Primer predstavlja činjenica da *in vitro* tehnike podrazumevaju niz koraka manipulacije ćelijama koji mogu uticati na mehanizme aktivacije i funkciju ćelija. Takođe, opšte je poznato da se ćelijski odnosi i citokinski profil razlikuju u okviru iste individue nakon malih razlika u uticaju spoljašnje sredine – minimalne infekcije, aktivna antiretrovirusna terapija, stepen

kolonizacije bakterijama, broj virusnih kopija, stepen izloženosti duvanskom dimu mogu uticati na male promene u citokinskom sastavu tečnosti koja oblaže epitelijum pluća. Na kraju, vrlo mali apsolutni broj T limfocita u BAL-u značajno otežava mogućnost izvođenja eksperimenata obzirom da je neophodno da svakom eksperimentu prethodi invazivna procedura kao što je bronhoskopija pluća. Nažalost, korelacija efekta citokina ili produkcija metaloproteinaza je vrlo specifična za svako tkivo, tako da mogućnost ekstrapolacije efekata uočenih na ćelijama periferne krvi na fenomene u plućnoj sredini moraju biti uzete sa maksimalnom rezervom.

Očigledno je da postoje mnogobrojni mehanizmi koji, u uslovima hronične inflamacije, dovode do pojačanog prisustva MMP-9 u plućima. Dobro je poznato da proinflamatorni citokini kao što su IL-1 β , TNF- α ili IL-6 indukuju ekspresiju MMP-9 u makrofagima [30, 150, 152]. Na drugoj strani, nije veliki broj podataka u publikovanoj literaturi koji ukazuju na direktan odnos IL-23 i ekspresije MMP-9. Dok IL-12 indukuje infiltraciju citotoksičnim T-ćelijama, podaci ukazuju da IL-23 indukuju inflamatorne reakcije kao što je upravo pojačano lučenje MMP-9, a sistemska terapija neutrališućim IL-23p19 antitelima vodi do značajno smanjene ekspresije MMP-9 i pojačanog prisustva CD8+ limfocita u karcinogenu-izloženoj koži na mišjem modelu [115]. IL-23 utiče na pojačanu ekspresiju MMP-2 u ileumu miševa inficiranih sa *Toxoplasma gondii* [153]. Od većeg značaja za sama pluća je prethodno navedeni uticaj intranazalno aplikovanog IL-23 na mišjem modelu na pojačanu produkciju MMP-9 [80]. Činjenica da nismo uspeli da pokažemo da AM ekspimiraju IL-23R i to nizom sofisticiranih istraživačkih metoda koje uključuju DNK mikročip analizu, RNK sekvenciranje, Taqman kvantitativni RT-PCR i protočnu citometriju, je otvorila niz novih pitanja fokusiranih na pitanje: na koji način IL-23 ostvaruje svoj uticaj na ekspresiju MMP-9 u kulturama AM?

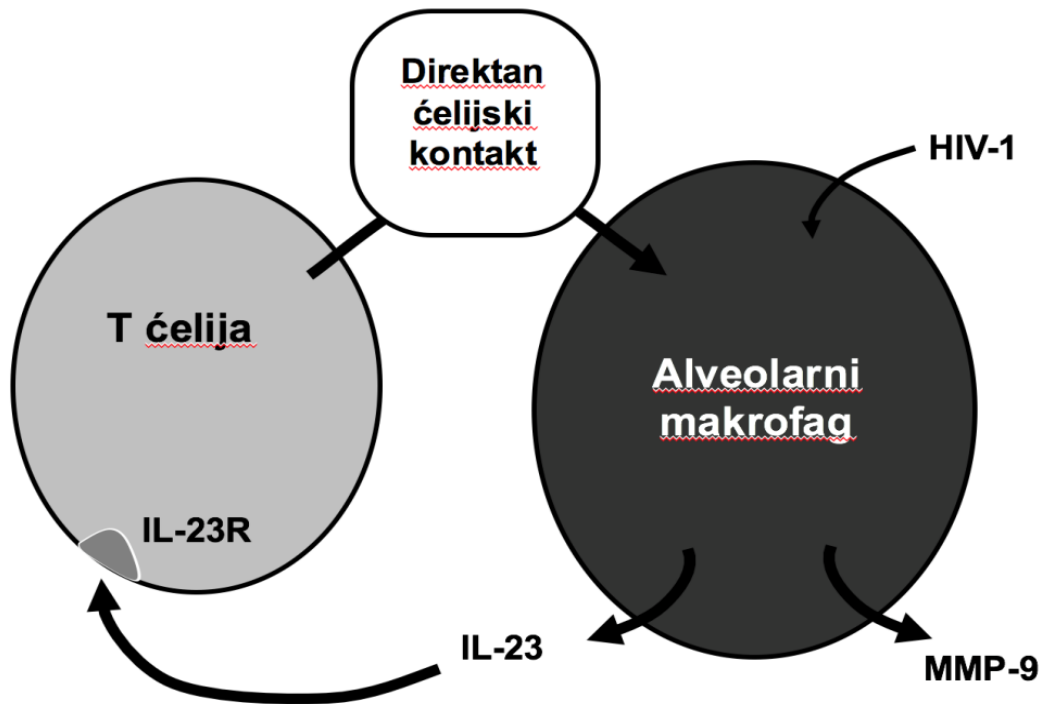
Poznato je da memorijske T-ćelije ekspimiraju IL-23R i da su kao takve, podložne direktnom modulirajućem efektu IL-23 [53, 57, 77]. Prema našem istraživanju, uticaj IL-23 na alveolarne makrofage u plućima se ostvaruje posredstvom T-ćelija.

Podaci koje smo predstavili ukazuju da, nakon stimulacije interleukinom IL-23, T ćelije inteeaguju sa AM i na taj način utiču na pojačano oslobađanje MMP-9. Postoji više mogućih mehanizama ove interakcije. Mogućnost postojanja drugog citokina, koga luče T ćelije pod uticajem IL-23 i koji ima direktno MMP-9 indukujuće dejstvo na AM smo istražili kao jedan od mogućih mehanizama koji bi objasnili obervirani fenomen. Obzirom na njegovo povišeno prisustvo u fenotipovima sa ranim emfizemom pluća i poznat proinflamatorni efekat, istražili smo mogućnost da IFN- γ igra ovakvu ulogu posredujućeg citokina. Kao što je prikazano na *Slikama 25 i 26*, obzirom da IFN- γ , čiji su receptori eksprimirani na AM, ne utiče pozitivno na ekspresiju MMP-9, malo je verovatno da ovaj citokin ima značajan uticaj na efekat IL-23. Postojanje drugog citokina, koji nije detektovan u našim eksperimentima i koji igra upravo ovu ulogu posredovanja pojačane ekspresije MMP-9 u AM nakon stimulacije T-ćelije sa IL-23 je svakako moguće, ali ostaje van domašaja našeg istraživanja.

Takođe, u nizu eksperimenata u kojima smo supernatante kultura T-ćelija koje su prethodno stimulisane sa IL-23, dodali kulturama AM, nismo uspjeli da indukujemo prethodno uočeni efekat indukcije MMP-9 (neprikazani podaci). Iako je moguće da dodavanje supernatanta T-ćelija stimulisanih sa IL-23 kulturama AM dovodi do razblaženja medijuma i, na taj način nedovoljnih koncentracija citokina u rezultujućim pomešanim kulturama koje bi dovele do željenog efekta na produkciju MMP-9, ova observacija je interesantna jer implicuje mogućnost da efekat pojačane ekspresije MMP-9 u AM nije indukovano posredno, putem intermedijarnog citokina lučenog od strane T-ćelija, već direktno, putem direktnog kontakta između T-ćelija i AM. Prethodno je opisan značaj direktnog kontakta T-ćelija sa monocitnom ćelijama za indukciju MMP-9 [31, 154, 155]. Interakcija između ovih ćelija putem direktnog kontakta koji počinje sa prepoznavanjem antigena i antigen-specifičnog receptora na ćelijskoj membrani je dobro poznata. Takođe je poznato, nakon ovog vezivanja, više površinski eksprimiranih molekula na T limfocitima i na monocitima, interaguju, i na taj način osnažuju vezu i dalje moduliraju interakciju među vezanim ćelijama [128, 129]. Nakon vezivanja CD3 kompleksa sa antigen-MHC kompleksom

na monocitima, molekuli kao što su CTLA4 (protein vezan za citotoksične T limfocite, CD152), CD40 ligand ili LFA-1 (leukocitni funkcioni antigen-1) koji su eksprimirani na T limfocitima, interaguju ovim redosledom, sa B7 proteinima (CD80 i CD86), CD40 molekulom i ICAM-1 (intracelularnim adhezionim molekulom-1) na monocitima na taj način učestvujući u inhibiciji aktivacije T-ćelija (CTLA/CD80 ili CTLA/CD86), indukciji aktivacije monocita (CD40L/CD40) ili pojačavanju veze između ovih ćelija (LFA-1/ICAM-1)[128, 155]. CD-40 je kostimulatorni protein koji se nalazi na antigen-prezentujućim ćelijama i neophodan je za njihovu aktivaciju. Vezivanje CD40L na T-ćelijama za CD40 aktivira antigen prezentujuće ćelije tako uzrokujući niz efekata koje ova aktivacija pokreće [156]. CD40L je član šire grupe citokina koje nose funkciju faktora tumor nekroze (TNF), a aktivirane CD4+ T-ćelije su predominantne ćelije koje ga eksprimiraju [157]. Dodavanje IL-23 T-ćelijama izolovanim iz periferne krvi in vitro, dovodi do pojačane ekspresije CD40L, što je pokazano u našim eksperimentima (*Slika 29*). Jedan od mogućih efekata pojačane ekspresije CD40L nakon stimulacije IL-23 citokinom je dalja aktivacija AM i pojačanje ekspresije i lučenja MMP-9 od strane AM, što bi doprinelo daljem objašnjenju pokazanog fenomena uticaja IL-23 na pojačano prisustvo MMP-9 u mikrosredini pluća HIV-1 pozitivnih pušača (*Shema 1*).

Kao što je prethodno naglašeno, značaj CD40/CD40L interakcije nakon izlaganja AM-limfocitnih ko-kultura ostaje u domenu špekulacije i izlazi van okvira ove studije. Iako tačan mehanizam indirektnog uticaja IL-23 citokina na lučenje MMP-9 od strane AM nije utvrđen, ova studija nedvosmisleno pokazuje da interleukin IL-23 i Th-17 imunski odgovor igraju značajnu ulogu u razvoju emfizema u plućima HIV-1 pozitivnih pušača, kao i da pojačano prisustvo IL-23 dovodi do pojačanog lučenja proteolitičkog enzima MMP-9 od strane alveolarnih makrofaga.



Shema 1: Mogući mehanizam uticaja IL-23 na pojačanu ekspresiju MMP-9. IL-23 ostvaruje indirektan uticaj na alveolarne makrofage i, nezavisno od izvora IL-23 koji mogu biti čak i sami alveolarni makrofagi, T limfociti su neophodni za ostvarenje ovog efekta. Memorijske T-ćelije eksprimiraju IL-23R koji je "meta" za IL-23, koji vodi do aktivacije mehanizama interakcije T-ćelija sa alveolarni makrofagima i konsekventnog pojačanog lučenja MMP-9.

6. ZAKLJUČCI

1. Supernatanti bronhoalveolarnog lavata HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća sadrže povišene koncentracije proinflamatornih citokina u odnosu na HIV-1 negativne pušače as sličnim promenama na plućima, HIV-1 pozitivne nepušače, HIV-1 negativne pušače ili HIV-1 negativne nepušače.

2. Citokinski profil pušača sa ranim emfizemom pluća, nezavisno od HIV-1 statusa, pokazuje povišene koncentracije citokina IL-23 i IL-17, i na taj način ukazuje na značaj Th-17 imunskog odgovora u razvoju hroničnog emfizema pluća.

3. IL-23 je prisutan u plućnoj mikrosredini pušača sa ranim emfizemom pluća, a njegovo prisustvo je potencirano HIV-1 infekcijom. Ovaj zaključak se bazira na rezultatima koji pokazuju povišene nivoe IL-23 u supernatantima BAL HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća, povišene nivoe ekspresije IL-23 u alveolarnom makrofagima HIV-1 pozitivnih pušača sa ranim emfizemom pluća i indukciju ekspresije IL-23 infekcijom alveolarnih makrofaga sa HIV-1 virusom u eksperimentalnim uslovima.

4. IL-23 utiče na povišenu ekspresiju i povišenje nivoa proteolitičkog enzima MMP-9 u plućima. Ovaj zaključak je rezultat eksperimenata koji su pokazali da stimulacija alveolarnih makrofaga sa IL-23 indukuje povećanu ekspresiju gena i produkciju MMP-9. Specifičnost ove interakcije dokazana je ukidanjem ovog efekta dodavanjem blokirajućeg anti IL-23 p19 antitela.

5. Efekat interleukina IL-23 na produkciju MMP9 u alveolarnim makrofagima je indirektan i zahteva posredničku ulogu T limfocita. Ovaj zaključak se bazira na rezultatima koji pokazuju da alveolarni makrofagi nemaju IL-23R, da relativno

prečišćene kulture AM sadrže određeni broj limfocita koji eksprimiraju IL-23R, da kulture čistih alveolarnih makrofaga ne pokazuju pojačanu produkciju MMP-9 nakon stimulacije sa IL-23, kao i da dodavanje prečišćenih T-ćelija kulturama alveolarnih makrofaga dovodi do pojačane ekspresije MMP-9.

U celini, može se zaključiti da Th-17 imunski odgovor igra značajnu ulogu u razvoju emfizema među HIV-1 pozitivnim pušačima. Relativno povišene koncentracije Th-17 citokina među HIV-1 pozitivnim u odnosu na HIV-1 negativne pušače mogu biti razlog pojačanog prisustva MMP-9 u mikrosredini pluća i ranijeg razvoja emfizema među HIV-1 pozitivnim pušačima. Razumevanje odnosa regulatornih T-ćelija i Th-17 ćelija i značaja njihovog adekvatnog balansa će verovatno u budućnosti omogućiti, ne samo bolju kontrolu i svrsishodniju terapiju mnogih hroničnih bolesti uključujući COPD, već i dovesti do boljeg razumevanja načina funkcionisanja i sinhronizacije mehanizama stečene i urođene imunosti uopšte.

7. SPISAK SKRAĆENICA

ACOS - *astma-COPD overlap syndrome*
AM – Alveolarni makrofagi
ANOVA – Test analize varijanse
ARV – Anti-retroviralna terapija
BAL – Bronhoalveolarni lavaž
BSA – *Bovine Serum albumin*, Albumin iz goveđeg seruma
CD – *Cluster of differentiation*
cDNK – Komplementarna DNK
CO₂ – Ugljen dioksid
COPD - Hronične obstruktivne bolesti pluća, HOBP
CT – Kompjuterizovana tomografija
DL_{CO} – Membranska difuzija, *diffusing capacity*
DNK – Deoksiribonukleinska kiselina
EAE - Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
EDTA – Etilenediaminetetraacetna kiselina
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS - *Flow-citrometrijska* analiza, protočna citometrija
FEV1 - *Forced expiratory volume in 1 sec*
FVC - *Forced vital capacity*
GM-CSF - Granulocitni-makrofagni stimulišući factor razvoja
H+NP - HIV-1 pozitivni nepušači
H+PRE - HIV-1 pozitivni pušači sa ranim emfizemom pluća
HAART - *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*
HIV - Virus humane imunodeficijencije
IFN – Interferon
IgG – Imunoglobulin G
IL-23 – Interleukin-23
IPF – Idiopatska plućna fibroza
IRB - Etički Odbor za nadgledanje kliničkog istraživanja, *Institutional Review Board*
LPS – Lipopolisaharid
MMP – Metaloproteinaza
NIH - *National Institute of Health*
NK ćelije – *Natural killer* ćelije
NP - HIV-1 negativni nepušači
PBS – *Phosphate buffered solution*, fiziološki rastvor
P - HIV-1 pozitivni nepušači
PCR – Polymerase chain reaction
PHA – Fitohemaglutinin
PRE - HIV-1 negativni pušači sa ranim emfizemom pluća
RNK – Ribonukleinska kiselina
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction*
TGF – *Tumor growth factor*
Th- *T helper cell*

TIMP - Tkiivni inhibitori Metaloproteinaza

TLC - Totalni plućni kapacitet

TNF – *Tumor necrosis fator*

UCLA – *University of California, Los Angeles*

8. LITERATURA

1. Boccarda, F., *Cardiovascular complications and atherosclerotic manifestations in the HIV-infected population: type, incidence and associated risk factors*. AIDS, 2008. **22 Suppl 3**: p. S19-26.
2. Choi, A.I., et al., *HIV-infected persons continue to lose kidney function despite successful antiretroviral therapy*. AIDS, 2009. **23**(16): p. 2143-9.
3. Crum, N.F., et al., *Comparisons of causes of death and mortality rates among HIV-infected persons: analysis of the pre-, early, and late HAART (highly active antiretroviral therapy) eras*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **41**(2): p. 194-200.
4. Deeks, S.G., *HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 141-55.
5. Hemkens, L.G. and H.C. Bucher, *HIV infection and cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2014. **35**(21): p. 1373-81.
6. Kirk, G.D., et al., *HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(1): p. 103-10.
7. Crothers, K., et al., *HIV-associated lung infections and complications in the era of combination antiretroviral therapy*. Proc Am Thorac Soc, 2011. **8**(3): p. 275-81.
8. Crothers, K., *Chronic obstructive pulmonary disease in patients who have HIV infection*. Clin Chest Med, 2007. **28**(3): p. 575-87, vi.
9. Crothers, K., et al., *Increased COPD among HIV-positive compared to HIV-negative veterans*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1326-33.
10. Diaz, P.T., T.L. Clanton, and E.R. Pacht, *Emphysema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection*. Ann Intern Med, 1992. **116**(2): p. 124-8.
11. Diaz, P.T., et al., *Increased susceptibility to pulmonary emphysema among HIV-seropositive smokers*. Ann Intern Med, 2000. **132**(5): p. 369-72.
12. Hirani, A., et al., *Prevalence of obstructive lung disease in HIV population: a cross sectional study*. Respir Med, 2011. **105**(11): p. 1655-61.

13. Macnee, W., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Chest Med, 2007. **28**(3): p. 479-513, v.
14. Vestbo, J., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(4): p. 347-65.
15. Mannino, D.M. and V.A. Kiriz, *Changing the burden of COPD mortality*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2006. **1**(3): p. 219-33.
16. Woodruff, P.G., et al., *Clinical Significance of Symptoms in Smokers with Preserved Pulmonary Function*. N Engl J Med, 2016. **374**(19): p. 1811-21.
17. Barjaktarevic, I., et al., *Diffusing capacity for carbon monoxide correlates best with tissue volume from quantitative CT scanning analysis*. Chest, 2015. **147**(6): p. 1485-93.
18. Harvey, B.G., et al., *Risk of COPD with obstruction in active smokers with normal spirometry and reduced diffusion capacity*. Eur Respir J, 2015. **46**(6): p. 1589-97.
19. Cooper, C.B. and I. Barjaktarevic, *A new algorithm for the management of COPD*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(4): p. 266-8.
20. Lopez-Campos, J.L., W. Tan, and J.B. Soriano, *Global burden of COPD*. Respirology, 2016. **21**(1): p. 14-23.
21. Gadek, J.E., et al., *Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema*. J Clin Invest, 1981. **68**(4): p. 889-98.
22. Churg, A. and J.L. Wright, *Proteases and emphysema*. Curr Opin Pulm Med, 2005. **11**(2): p. 153-9.
23. Sloan, B., et al., *Emphysema induced in vitro and in vivo in dogs by a purified elastase from homologous leukocytes*. Am Rev Respir Dis, 1981. **124**(3): p. 295-301.
24. Snider, G.L., *Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury*. Eur J Respir Dis Suppl, 1986. **146**: p. 17-35.
25. Pushpakom, R., et al., *Experimental papain-induced emphysema in dogs*. Am Rev Respir Dis, 1970. **102**(5): p. 778-89.

26. Malfait, R., F. Gorus, and C. Sevens, *Electrophoresis of serum protein to detect alpha 1-antitrypsin deficiency: five illustrative cases*. Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1397-9.
27. Wewers, M.D., et al., *Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema*. N Engl J Med, 1987. **316**(17): p. 1055-62.
28. Hunninghake, G.W. and R.G. Crystal, *Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(5): p. 833-8.
29. Finlay, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(1): p. 240-7.
30. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
31. Goetzl, E.J., M.J. Banda, and D. Leppert, *Matrix metalloproteinases in immunity*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 1-4.
32. Van Lint, P. and C. Libert, *Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1375-81.
33. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
34. Atkinson, J.J. and R.M. Senior, *Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(1): p. 12-24.
35. Chakrabarti, S. and K.D. Patel, *Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology*. Exp Lung Res, 2005. **31**(6): p. 599-621.
36. Groblewska, M., et al., *The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2012. **50**(1): p. 12-9.
37. Di Stefano, A., et al., *Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1277-85.

38. Kaner, R.J., F. Santiago, and R.G. Crystal, *Up-regulation of alveolar macrophage matrix metalloproteinases in HIV1(+) smokers with early emphysema*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 913-22.
39. Mroczko, B., M. Groblewska, and M. Barcikowska, *The role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the pathophysiology of neurodegeneration: a literature study*. J Alzheimers Dis, 2013. **37**(2): p. 273-83.
40. Russell, R.E., et al., *Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 602-9.
41. Mautino, G., et al., *Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(5): p. 583-91.
42. Chung, K.F. and I.M. Adcock, *Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction*. Eur Respir J, 2008. **31**(6): p. 1334-56.
43. Barnes, P.J., *New concepts in chronic obstructive pulmonary disease*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 113-29.
44. Saha, S. and C.E. Brightling, *Eosinophilic airway inflammation in COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2006. **1**(1): p. 39-47.
45. Fels, A.O. and Z.A. Cohn, *The alveolar macrophage*. J Appl Physiol (1985), 1986. **60**(2): p. 353-69.
46. Cosio, M.G., J. Majo, and M.G. Cosio, *Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells*. Chest, 2002. **121**(5 Suppl): p. 160S-165S.
47. Mikko, M., et al., *Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease*. Immunobiology, 2013. **218**(2): p. 225-31.
48. Plumb, J., et al., *Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD*. Eur Respir J, 2009. **34**(1): p. 89-94.

49. Smyth, L.J., et al., *CD4-regulatory cells in COPD patients*. Chest, 2007. **132**(1): p. 156-63.
50. MacNee, W., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 258-66; discussion 290-1.
51. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, *Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 349-56.
52. Mills, K.H., *Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2636-49.
53. Annunziato, F., et al., *The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation*. Int Immunol, 2008. **20**(11): p. 1361-8.
54. Cooney, L.A., et al., *Sensitivity and resistance to regulation by IL-4 during Th17 maturation*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4440-50.
55. Waite, J.C. and D. Skokos, *Th17 response and inflammatory autoimmune diseases*. Int J Inflam, 2012. **2012**: p. 819467.
56. Mucida, D. and S. Salek-Ardakani, *Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 997-1003.
57. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
58. Maddur, M.S., et al., *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 8-18.
59. McGeachy, M.J. and S.J. McSorley, *Microbial-induced Th17: superhero or supervillain?* J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3285-91.
60. Tsai, H.C., et al., *IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 267971.
61. Wilke, C.M., et al., *Th17 cells in cancer: help or hindrance?* Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 643-9.
62. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.

63. Teng, M.W., et al., *IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 719-29.
64. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
65. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
66. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1310-6.
67. Chan, J.R., et al., *IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2577-87.
68. Romani, L., et al., *IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5157-62.
69. Wiekowski, M.T., et al., *Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7563-70.
70. Happel, K.I., et al., *Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5782-8.
71. Peng, J., et al., *IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 62-71.
72. Khader, S.A., et al., *IL-23 is required for long-term control of Mycobacterium tuberculosis and B cell follicle formation in the infected lung*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5402-7.
73. Wu, Q., et al., *IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection*. Microbes Infect, 2007. **9**(1): p. 78-86.
74. Dubin, P.J. and J.K. Kolls, *IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(2): p. L519-28.

75. Baird, A.M., et al., *IL-23 is pro-proliferative, epigenetically regulated and modulated by chemotherapy in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2013. **79**(1): p. 83-90.
76. Li, J., et al., *Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor*. Carcinogenesis, 2013. **34**(3): p. 658-66.
77. Facco, M., et al., *Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder*. Thorax, 2011. **66**(2): p. 144-50.
78. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls, *TH17 cells in asthma and COPD*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 495-516.
79. Kurimoto, E., et al., *IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice*. Respir Res, 2013. **14**: p. 5.
80. Ivanov, S., et al., *Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(4): p. 442-51.
81. Caramori, G., et al., *Cytokine inhibition in the treatment of COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014. **9**: p. 397-412.
82. Larsen, J.M., et al., *Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31976.
83. Adcock, I.M., G. Caramori, and P.J. Barnes, *Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights*. Respiration, 2011. **81**(4): p. 265-84.
84. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(22): p. 2355-65.
85. Morris, A., et al., *Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and Pneumocystis colonization*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(4): p. 408-13.
86. Twigg, H.L., et al., *Lymphocytic alveolitis, bronchoalveolar lavage viral load, and outcome in human immunodeficiency virus infection*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(5 Pt 1): p. 1439-44.

87. Diaz, P.T., et al., *Regional differences in emphysema scores and BAL glutathione levels in HIV-infected individuals*. Chest, 2004. **126**(5): p. 1439-42.
88. Kanmogne, G.D., C. Primeaux, and P. Grammas, *Induction of apoptosis and endothelin-1 secretion in primary human lung endothelial cells by HIV-1 gp120 proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(4): p. 1107-15.
89. Jambo, K.C., et al., *Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(5): p. 1116-26.
90. Kedzierska, K., et al., *Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy*. J Clin Virol, 2003. **26**(2): p. 247-63.
91. Koziel, H., et al., *Reduced binding and phagocytosis of Pneumocystis carinii by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation*. J Clin Invest, 1998. **102**(7): p. 1332-44.
92. Gordon, M.A., et al., *Primary macrophages from HIV-infected adults show dysregulated cytokine responses to Salmonella, but normal internalization and killing*. AIDS, 2007. **21**(18): p. 2399-408.
93. Tachado, S.D., et al., *HIV impairs TNF-alpha release in response to Toll-like receptor 4 stimulation in human macrophages in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(6): p. 610-21.
94. Mastroianni, C.M. and G.M. Liuzzi, *Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 449-59.
95. Vazquez, N., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4479-91.
96. Louboutin, J.P., et al., *HIV-1 gp120 upregulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in a rat model of HIV encephalopathy*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(12): p. 2015-23.
97. Hartigan-O'Connor, D.J., et al., *Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(3): p. 221-7.

98. Singh, A., et al., *Cellular interplay among Th17, Th1, and Treg cells in HIV-1 subtype "C" infection*. J Med Virol, 2014. **86**(3): p. 372-84.
99. Bixler, S.L. and J.J. Mattapallil, *Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 852418.
100. Knox, K.S., et al., *Reconstitution of CD4 T cells in bronchoalveolar lavage fluid after initiation of highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9010-8.
101. Brenchley, J.M., et al., *High frequencies of polyfunctional HIV-specific T cells are associated with preservation of mucosal CD4 T cells in bronchoalveolar lavage*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 49-58.
102. Shi, Y., et al., *Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5121-9.
103. Macintyre, N., et al., *Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung*. Eur Respir J, 2005. **26**(4): p. 720-35.
104. Miller, M.R., et al., *General considerations for lung function testing*. Eur Respir J, 2005. **26**(1): p. 153-61.
105. Miller, M.R., et al., *Standardisation of spirometry*. Eur Respir J, 2005. **26**(2): p. 319-38.
106. Wanger, J., et al., *Standardisation of the measurement of lung volumes*. Eur Respir J, 2005. **26**(3): p. 511-22.
107. Gordon, C., et al., *Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(2): p. 224-32.
108. Hughes, J.M. and D.V. Bates, *Historical review: the carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and its membrane (DM) and red cell (Theta.Vc) components*. Respir Physiol Neurobiol, 2003. **138**(2-3): p. 115-42.
109. Gurney, J.W., et al., *Regional distribution of emphysema: correlation of high-resolution CT with pulmonary function tests in unselected smokers*. Radiology, 1992. **183**(2): p. 457-63.

110. Barjaktarevic, I., et al., *Inhibitory role of IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase in T cell activation*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4369-75.
111. Mikuniya, T., et al., *Proinflammatory or regulatory cytokines released from BALF macrophages of healthy smokers*. Respiration, 1999. **66**(5): p. 419-26.
112. Israel-Biet, D., et al., *Tumor necrosis factor production in HIV-seropositive subjects. Relationship with lung opportunistic infections and HIV expression in alveolar macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(2): p. 490-4.
113. Groom, J.R. and A.D. Luster, *CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 207-15.
114. Shi, Y., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 126-33.
115. Langowski, J.L., et al., *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 461-5.
116. Kaner, R.J., et al., *Adenovirus vectors block human immunodeficiency virus-1 replication in human alveolar macrophages by inhibition of the long terminal repeat*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(2): p. 234-42.
117. Di Stefano, A., et al., *T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**(2): p. 316-24.
118. Yannam, G.R., T. Gutti, and L.Y. Poluektova, *IL-23 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(1): p. 95-112.
119. Loffek, S., O. Schilling, and C.W. Franzke, *Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance*. Eur Respir J, 2011. **38**(1): p. 191-208.
120. Zhang, W., et al., *Effector CD4+ T cell expression signatures and immune-mediated disease associated genes*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38510.
121. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, *Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 221-42.

122. Buonocore, S., et al., *Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1371-5.
123. Kroenke, M.A. and B.M. Segal, *IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN-gamma driven, IL-17 independent pathway*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(5): p. 932-7.
124. Nguyen, J., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF-beta1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5487-93.
125. Ma, Z., et al., *Interferon-gamma-activated STAT-1alpha suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/p300*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 515-23.
126. Ma, Z., H. Qin, and E.N. Benveniste, *Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5150-9.
127. Murphy, S.P., et al., *Interferon gamma in successful pregnancies*. Biol Reprod, 2009. **80**(5): p. 848-59.
128. Dayer, J.M., *How T-lymphocytes are activated and become activators by cell-cell interaction*. Eur Respir J Suppl, 2003. **44**: p. 10s-15s.
129. Miltenburg, A.M., et al., *Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2655-67.
130. Yearsley, M.M., et al., *Correlation of HIV-1 detection and histology in AIDS-associated emphysema*. Diagn Mol Pathol, 2005. **14**(1): p. 48-52.
131. Buhl, R., et al., *Activation of alveolar macrophages in asymptomatic HIV-infected individuals*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 1019-28.
132. Nguyen, E.V., et al., *Proteomic landscape of bronchoalveolar lavage fluid in human immunodeficiency virus infection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(1): p. L35-42.
133. Petrache, I., et al., *HIV associated pulmonary emphysema: a review of the literature and inquiry into its mechanism*. Thorax, 2008. **63**(5): p. 463-9.

134. Agostini, C., et al., *Alveolar macrophages as a cell source of cytokine hyperproduction in HIV-related interstitial lung disease*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(5): p. 495-500.
135. Alfano, M., et al., *New players in cytokine control of HIV infection*. Curr HIV/AIDS Rep, 2008. **5**(1): p. 27-32.
136. Torrado, E. and A.M. Cooper, *IL-17 and Th17 cells in tuberculosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 455-62.
137. Traves, S.L. and L.E. Donnelly, *Th17 cells in airway diseases*. Curr Mol Med, 2008. **8**(5): p. 416-26.
138. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
139. Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin, *Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 353-61.
140. Holloway, R.A. and L.E. Donnelly, *Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Curr Opin Pulm Med, 2013. **19**(2): p. 95-102.
141. Melgert, B.N., et al., *Effects of 4 months of smoking in mice with ovalbumin-induced airway inflammation*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(12): p. 1798-808.
142. Doe, C., et al., *Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD*. Chest, 2010. **138**(5): p. 1140-7.
143. Leonardi, C., et al., *Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis*. N Engl J Med, 2012. **366**(13): p. 1190-9.
144. Benson, J.M., et al., *Therapeutic targeting of the IL-12/23 pathways: generation and characterization of ustekinumab*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(7): p. 615-24.
145. Manechotesuwan, K., et al., *Simvastatin Suppresses Airway IL-17 and Upregulates IL-10 in Patients With Stable COPD*. Chest, 2015. **148**(5): p. 1164-76.
146. Langrish, C.L., et al., *IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 96-105.
147. Zelante, T., et al., *IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2695-706.

148. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1218-22.
149. Naseemuddin, M., et al., *Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice*. Int J Cancer, 2012. **130**(4): p. 765-74.
150. Alexander, J.S., et al., *Alterations in serum MMP-8, MMP-9, IL-12p40 and IL-23 in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b*. Mult Scler, 2010. **16**(7): p. 801-9.
151. Kolls, J.K. and S.A. Khader, *The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 443-8.
152. Gordon, G.M., et al., *Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells*. J Cell Physiol, 2009. **221**(2): p. 402-11.
153. Munoz, M., et al., *Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3047-59.
154. Ferrari-Lacraz, S., et al., *Human lung tissue macrophages, but not alveolar macrophages, express matrix metalloproteinases after direct contact with activated T lymphocytes*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(4): p. 442-51.
155. Lacraz, S., et al., *Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 22027-33.
156. Malik, N., et al., *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3952-60.
157. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 85-106.

BIOGRAFIJA

Dr. Igor Barjaktarević je završio Medicinski Fakultet u Beogradu u aprilu 2002. godine sa prosekom 9.40. Tokom studija medicine, Igor je bio aktivan član Jugoslovenskog komiteta za međunarodnu saradnju studenata medicine (tadašnji YuMSIC, sadašnji IFMSA-Srbija), organizacije čiji je Igor bio predsednik 2000.-2002. godine, aktivni član omladine Jugoslovenske asocijacije za borbu protiv SIDA-e, saradnik UNICEF Srbije, ali i aktivni saradnik u naučno-istraživačkom radu Instituta za Genetiku Medicinskog Fakulteta. Nakon odsluženja vojnog roka, Igor se preselio u Vašington DC, gde je pri Džordž Vašington Univerzitetu, na Institutu za Imunologiju kao naučni saradnik radio u laboratoriji Prof dr. Stanka Vukmanovića. Magistarske studije je upisao 2003. godine, a rad na temu "Inhibitorna uloga gama-interferon inducibilne lizozomske tiol-reduktaze" koji je rađen u saradnji Univerziteta u Beogradu i Džordž Vašington Univerziteta u Vašingtonu, je uz mentorstvo profesorke dr. Marije Mostarice Stojković odbranio u Septembru 2008. godine. Igor je nostrifikovao diplomu medicinskog fakulteta u SAD u Maju 2006. godine, a zatim je započeo specijalizaciju iz interne medicine u Njujorku, u *Cabrini* Medicinskom Centru Univerziteta *Mount Sinai*; specijalizaciju je završio na Njujorškom Univerzitetu (*NYU*), a status *board*-sertifikovanog interniste je stekao u Avgustu 2009. godine. Igor je započeo usku specijalizaciju iz oblasti pulmologije i intenzivne nege (*critical care medicine*) na Cornell Univerzitetu u Njujorku gde je bio izabran za glavnog subspecijalizanta (*pulmonary chief fellow*). Status *board*-sertifikovanog pulmologa je stekao u Novembru 2012, a status *board*-sertifikovanog intenziviste je stekao u Novembru 2013. godine. Tokom subspecijalizacije, Igor je bio i prijemni lekar na Rokafeler Univerzitetu u Njujorku i lekar subspecijalizant pri *Memorial Sloan-Kettering Cancer* Centru u Njujorku. Nakon završetka subspecijalizacije, Igor je postao asistent profesor pri David Geffen Medicinskom fakultetu pri UCLA (University of California, Los Angeles) u julu 2012, a titulu docenta je dobio u Julu 2015. Igor je Direktor *Critical care* Ultrazvuka pri UCLA, a njegove oblasti kliničkog interesovanja su razvoj *point-of-care* ultrazvuka, evaluacije intravenske terapije fluidima u šoku, kritična bolest u poodmakloj insuficijencije jetre i pristup komplikovanim intubacijama. U oblasti pulmologije, Igor je fokusiran na nehirurški pristup dijagnostici karcinoma pluća i vođenje poodmakle hronične obstruktivne bolesti pluća (COPD), pri čemu Igor vodi ambulantne klinike za ove bolesti i radi procedure kao što su endobronhijalne bronhoskopske ultrazvučne biopsije ili endobronhijalne valvule za bronhoskopsku redukciju volumena pluća u emfizemu pluća. Igor je uključen u mnogobrojne naučne projekte koji uključuju COPD, karcinom pluća, plućna oboljenja u insuficijenciji jetre i cirkulatorni šok. Igor je u Julu 2016, u izboru za nastavnika godine pri katedri za internu medicinu UCLA na kojoj predaje više od 400 lekara koji su nastavni kadar UCLA, izabran za nastavnika godine od strane 140 specijalizanata, titulu koji nijedan intenzivista pulmolog pri UCLA nije poneo godinama. Doktorske studije u oblasti plućne imunologije, Igor je upisao 2009. godine, a rad na temu «Uloga interleukina IL-23 u preveremenom razvoju emfizema među HIV-1 pozitivnim pušačima» je radio na *Cornell* Univerzitetu u Njujorku u laboratoriji Dr *Ronald Crystal*, a u saradnji Cornell univerziteta i Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom Prof dr. Marije Mostarice Stojković i ko-mentorstvom Prof dr *Robert Kanera* u periodu 2009-2016. godine. Igor živi u Los Anđelesu u Kaliforniji, oženjen je sa Prof dr. Jelenom Maletković Barjaktarević koja takođe predaje na UCLA i otac je dvojce sinova, Miloša i Marka.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а ИГОР БАРИЈАКТАРЕВИЋ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УЛОГА ИНТЕРЛЕУКИНА-23 У ПРЕВРЕЋНОЈ ПАЗБИ ЈИ ЕМФИЗЕМА
ПЛУЋА МЕЂУ ХИВ1 + ПУШАЧИМА

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

Потпис докторанда

У Београду, 24/7/2016



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада


Име и презиме аутора Игор Бардакџевић

Број уписа _____

Студијски програм Ишумологија - Психологија, докторске студије

Наслов рада Улога интерактивних 2D у предметној развојној еквивалентности дигиталне и физичке медија

Ментор Марија Мострица Стојковић Хив-4 ПАИСИМ

Потписани  Игор Бардакџевић

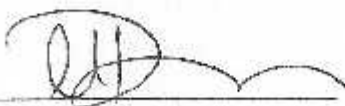
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

у Београду, 23/7/2016

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

УЛОГА ИНТЕРДЕУШИНА-23 У ПРЕВЕНЦИЈИ РАЗВОЈУ ЕМИФИЗИКАЦИЈЕ ПЛУКА ЦЕЉУ ХИВ-1 + ПУШТАЧИНИ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 23/7/2016

Потпис докторанда

