

Универзитет у Београду

Биолошки факултет

Соња С. Мојсиловић

**Утицај про- и анти-инфламацијских
фактора на продукцију протеаза
ванћелијског матрикса uPA и MMP9
мишјих макрофага**

докторска дисертација

Београд, 2016.

Универзитет у Београду

Биолошки факултет

Соња С. Мојсиловић

**Утицај про- и анти-инфламацијских
фактора на продукцију протеаза
ванћелијског матрикса uPA и MMP9
мишјих макрофага**

докторска дисертација

Београд, 2016.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Sonja S. Mojsilović

**Influence of pro- and anti-inflammatory
factors on production of extracellular matrix
proteases uPA and MMP9 in mouse
macrophages**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Комисија за одбрану докторске дисертације

Ментори:

др Хуан Франциско Сантибањез Домингез,
научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду

др Милена Катрановски,
редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду
научни саветник Института за биолошка истраживања Универзитета у Београду

Члан комисије:

др Драгана Вучевић,
виши научни сарадник, редовни професор Медицинског факултета ВМА,
Универзитета одбране

Датум одбране:

Најискреније се захваљујем др Хуану Сантибањезу, на пруженој прилици да срађујемо, на знању које ми је пренео, на подршци, за све корисне савете који су ми отворили врата за нове могућности у науци.

Велико хвала професорки др Милени Катарановски на указаном поверењу, на инсистирању на изврности и мотивацији да се не одустаје и увек иде корак даље, који су значајно допринели квалитету ове дисертације.

Захваљујем се професорки др Драгани Вучевић за све корисне савете који су уобличили ову дисертацију и сву пружену помоћ да не останем „изгубљена” у преводу.

Без надахнујућих дискусија са др Срђом Јанковићем ова дисертација не би била иста.

Захваљујем се бројним колегама са ИМИ-а на колегијалности и другарству свих ових година.

Мом Славку и нашој Мињи

Утицај про- и анти-инфламацијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишићних макрофага

Сажетак

Макрофази су централне ћелије имунског система јер поседују јединствене особине: учествују у одржавању физиолошке хомеостазе ткива и организма, процени врсте могуће претње по организам и покретању адекватног имунског одговора ангажовањем одговарајућих компоненти имунског система, али и његовом завршетку када више није неопходан, активно учествују у обнављању оштећених ткива и тако омогућавају повратак хомеостазе. Остваривање овако разноврсних улога омогућује висока прилагодљивост ових ћелија спољашњим сигнаlima. Различити подтипови макрофага имају одлучујућу улогу у различитим фазама инфламације. Класични M1 макрофази, изложени дејству про-инфламацијских цитокина, као што је интерферон γ , и/или продуктима микроорганизама, као што је липополисахарид (LPS), имају главну улогу у индукцији инфламације и елиминацији патогена, док алтернативни M2 макрофази, у одговору на стимулацију анти-инфламацијским/имунорегулаторним цитокинима IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β или глукокортикоидима, обустављају инфламацију и кључни су за обнављање ткива и зарастање рана. Током инфламације одвијају се значајне промене на нивоу протеина ванћелијског матрикса (ECM, extracellular matrix), које су строго регулисане протеазама ECM, чија се продукција остварује у дефинисаном просторно-временском контексту. Секрецијом матриксних протеаза (MMP) као што је MMP9, M1 макрофази учествују у деградацији ECM и разградњи ткива, што олакшава улазак других инфламацијских ћелија у оштећено ткиво. Истовремено се покреће каскада коагулације током које се формира привремена структура ECM од фибрина, која се касније у фази резолуције разграђује, а ECM се обнавља. Урокиназа (uPA) је серинска протеаза која разградњом плазминогена у плазмин остварује главну улогу у процесу разградње фибринске мреже. Осим тога, uPA је важан регулатор ткивне инфламације, процеса зарастања рана и ткивне регенерације. Отуда је важно расветлити молекулски механизам регулације MMP9 и uPA током промене

поларизације макрофага из M1 у M2. На основу ових података, претпостављено је да се у инфламацијским макрофазима MMP9 и uPA регулишу на различит начин. Да би се то испитало, у експериментима је коришћена мишја моноцитно-макрофагна ћелијска линија RAW 264.7 као најчешће коришћени ћелијски модел у студијама које се баве испитивањем биологије макрофага. Најпре је испитан утицај LPS на продукцију uPA од стране ових ћелија. Резултати су показали да LPS дозно зависно смањује продукцију uPA, а подстиче продукцију MMP9. Анализа LPS сигналне трансдукције указује да p38 MAPK учествује у смањењу продукције uPA. Са друге стране, присуство TGF- β снажно подстиче продукцију uPA а умањује продукцију MMP9 и на нивоу транскрипције и транслације. Резултати су даље показали да се утицај TGF- β на uPA остварује углавном кроз Smad3 и ERK1/2 MAPK сигнални пут, док би смањење продукције MMP9 могло да буде последица стимулације формирања инхибиторног NF κ B транскрипционог фактора. Такође је показано да LPS није у стању да инхибира капацитет TGF- β да индукује uPA. Анализе макрофага пореклом из костне сржи мишева су потврдиле да M1 и M2 поларизовани макрофази другачије експримирају MMP9 и uPA.

Како у већини тумора макрофаге одликује M2 фенотип, који доприноси развоју тумора, даља истраживања су била усмерена ка ефектима паклитаксела (Tax) и естрамустин фосфата (EP), анти-туморских лекова који делују на тубуларни цитоскелет, на капацитет TGF- β да индукује пролиферацију, миграцију и продукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама. Показано је да и Tax и EP инхибирају ћелијску миграцију, али је само Tax могао да у експерименталним условима смањи ћелијску пролиферацију. Уочена редукција ћелијске миграције корелира са TGF- β инхибицијом продукције uPA. Осим тога, Tax и EP су снажно инхибирали активност Smad3 коју је покренуо TGF- β . Ови подаци сугеришу да дерегулација динамике тубуларног цитоскелета снажно ремети утицај TGF- β на функције макрофага, што може да има последице и на канцерогенезу. На крају, испитан је и ефекат глукокортикоида дексаметазона (Dex) на продукцију uPA. Интригантно је да Dex снажно инхибира продукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама и да има адитивно дејство са капацитетом LPS да умањи продукцију uPA, што би могло да буде последица тога што Dex активира p38 сигнализацију. Са друге стране,

инхибиторно дејство Dex није утицало на капацитет TGF- β да стимулише продукцију uPA.

Резултати приказани у овој докторској дисертацији пружају нове податке о молекулском механизму регулације MMP9 и uPA у мишјим макрофазима, као и боље разумевање регулације протеаза ECM током M1-M2 поларизације. Имајући у виду значај макрофага у патолошким процесима, и MMP9 и uPA би могли да буду циљни молекули у терапији инфламацијских, малигних и дегенеративних обољења.

Кључне речи: макрофаги, инфламација, TGF- β , LPS, поларизација, uPA, MMP9, естрамустин фосфат (EP), паклитаксел (Tax), дексаметазон (Dex) (до 10 речи)

Научна област: биологија

Ужа научна област: имунологија

УДК број: 616-002 : 611.018.53 : 577.152.9 (043.3)

Influence of pro- and anti-inflammatory factors on production of extracellular matrix proteases uPA and MMP9 in mouse macrophages

Abstract

Macrophages are one of the major effector cells in inflammation. They are responsible for the recognition and processing of foreign materials, activation of the adaptive immune response, regulation of tissue repair/regeneration, and overall homeostasis maintenance. Multiple functions of macrophages are facilitated by their high plasticity in response to environmental or intrinsic signals. Two polarized macrophage modalities are critical in the regulation of different stages of tissue repair after injury. Classical M1 macrophages, exposed to pro-inflammatory cytokines, IFNs and microbial products, such as lipopolysaccharide (LPS), have major role in inducing inflammation and clearing of pathogens, whereas alternative M2 macrophages, in response to IL-4 and IL-13, IL-10, TGF- β or glucocorticoids, resolve inflammation and are crucial in tissue remodeling and wound healing. In addition to cellular changes, reorganization/remodeling of critical extracellular matrix (ECM) proteins also occurs in injured tissues. During this ECM reorganization, several important ECM proteinases are triggered in a space-temporal fashion through tightly regulated mechanisms. Pro-inflammatory M1 macrophages are able to secrete matrix metalloproteinases, such as MMP9, which help in degradation of the ECM in affected tissue, thus facilitating the recruitment of inflammatory cells to the site of tissue injury. Moreover, an antifibrinolytic-coagulation cascade, that activates clotting and development of a provisional ECM, is also triggered, and later replaced by normal ECM during the resolution of inflammation. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) is a serine protease that plays a major role in fibrinolytic processes, where it converts plasminogen to plasmin which further degrades coagulation components. Moreover, uPA is a key regulator of tissue inflammation and wound-healing processes and tissue regeneration, and is also secreted by macrophages.

Considering macrophage's importance in tissue repair, it is crucial to elucidate how MMP9 and uPA are involved in M1-M2 transition, as well as what are the underlying

molecular mechanisms. It was hypothesized that MMP9 and uPA are differentially regulated during inflammatory activation of macrophages. To test this hypothesis, immortalized murine macrophage cell line RAW 264.7 was used as a canonical model of immune-competent cells.

First the capacity of LPS (as an inducer of M1 state) to regulate uPA production was tested. Results showed that LPS, in a dose-dependent fashion, downregulated uPA production conversely to increased MMP9 production. The analysis of LPS-triggered signaling pathways indicated that LPS-inhibited uPA production was mediated by p38 MAPK. On the other hand, TGF- β (as an inducer of M2 state) greatly induced uPA production parallel to MMP9 downregulation at both protein and transcriptional level. Further results indicated that TGF- β -induced uPA production was mainly mediated by activation of Smad3 and ERK1/2 MAPK signaling transduction, while MMP9 downregulation may be mediated by the inhibition of basal NF κ B signaling. In addition, interaction analyses indicated that LPS was not able to inhibit the capacity of TGF- β to induce uPA production. Further analyses which included mouse bone marrow derived macrophages, confirmed differential expression of MMP9 and uPA between M1 and M2 polarized stages.

Since in most cancers macrophages residing in tumor microenvironment exhibit M2 phenotype that may maintain tumor growth and expansion, we next investigated the effect of Taxol (Tax) and Estramustine phosphate (EP), anticancer drugs affecting tubulin cytoskeleton, on the capacity of TGF- β to induce cell proliferation, migration and uPA production in RAW 264.7 cells. The results revealed that both Tax and EP inhibit cell migration, although in experimental conditions only Tax was able to decrease cell proliferation. Moreover, the reduction of cell migration was closely related with the inhibition of TGF- β -induced uPA production. Also, both Tax and EP strongly inhibited Smad3 signaling after TGF- β treatment. These data suggested that deregulation of the dynamic of tubulin cytoskeleton strongly interferes with the capacity of TGF- β to regulate mouse macrophages functionality, with putative implications in tumorigenesis.

Finally, experiments were performed to determine the effect of the glucocorticoid dexamethazone (Dex) on uPA production. Interestingly, Dex treatment strongly

inhibited uPA production in RAW 264.7 cells. Moreover, this effect was additive to the capacity of LPS to downregulate uPA expression, possibly through the activation of p38 MAPK signaling. However, Dex was unable to modify the capacity of TGF- β to stimulate uPA production.

Results presented in this thesis, provide new evidence about molecular mechanisms which regulate MMP9 and uPA production in mouse macrophages, as well as allow better understanding of ECM proteases role in M1-M2 macrophages polarization. Furthermore, in the aspect of macrophages, both MMP9 and uPA may be putative therapeutic targets in the treatment of inflammatory, malignant, and degenerative diseases.

KEY WORDS: macrophages, inflammation, TGF- β , LPS, polarization, uPA, MMP9, estramustine phosphat (EP), paclitaxel (Tax), deksametason (Dex)

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Immunology

UDC number: 616-002 : 611.018.53 : 577.152.9 (043.3)

1. УВОД	1
<u>1.1. Мононуклеарни фагоцитни систем</u>	<u>1</u>
1.1.1. Порекло макрофага	2
1.1.2. Моноцити	4
1.1.3. Ткивни макрофаги	5
1.1.4. Поларизација макрофага	6
<u>1.2. Улога макрофага у инфламацији и туморима</u>	<u>10</u>
1.2.1. Инфламација	10
1.2.2. Улога макрофага у имунском одговору и инфламацији	12
1.2.3. Туморска средина и туморски макрофаги (TAM)	14
<u>1.3. LPS, TGF-β и молекулски механизми активације макрофага</u>	<u>17</u>
1.3.1. LPS	18
1.3.2. TGF- β	20
<u>1.4. Миграција макрофага, uPA и MMP-9</u>	<u>22</u>
1.4.1. MMP-9	24
1.4.2. uPA	25
<u>1.5. Макрофагне ћелијске линије</u>	<u>29</u>
<u>1.6. Лекови који делују на микротубуле и глукокортикоиди</u>	<u>30</u>
1.6.1. Естрамустин	31
1.6.2. Паклитаксел	32
1.6.3. Дексаметазон	33
2. ЦИЉЕВИ	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
3.1. МАТЕРИЈАЛ	37
3.1.1. Медијуми	37
3.1.2. Антитела и реагенси	37
3.1.3. Ћелијске линије	40
3.1.3.1. RAW 264.7 ћелијска линија	40
3.1.3.2. L929 ћелијска линија	40
3.1.4. Мишји макрофаги	40
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН	41
3.3. МЕТОДЕ	43
<u>3.3.1. Анализа ћелијских функција</u>	<u>43</u>
3.3.1.1. Анализа пролиферације ћелија применом МТТ теста	43
3.3.1.2. Испитивање пролиферације макрофага применом CFSE	43
3.3.1.3. Поларизација макрофага (M1, M2)	44

3.3.2.4.Грисова реакција	44
3.3.2.5.Анализа миграције тестом зарастања ране	45
3.3.2.6.Анализа миграционог капацитета (Бојденова комора)	45
<u>3.3.3.Анализа експресије протеина</u>	<u>46</u>
3.3.3.1.Одређивање протеинске концентрације у узорцима	46
3.3.3.2.Изоловање једарних протеина	46
3.3.3.3.Зимографија	47
3.3.3.4.Имуноцитохемијски метод детекције протеина	48
3.3.3.5.Western blot	49
<u>3.3.4.Анализа експресије гена</u>	<u>51</u>
3.3.4.1.RT-PCR	51
3.3.4.2.Трансфекција	53
<u>3.3.5.Статистичка анализа резултата</u>	<u>55</u>
4. РЕЗУЛТАТИ	56
<u>4.1. Утицај про-инфламацијског фактора LPS на продукцију урокиназа у макрофагима</u>	<u>56</u>
4.1.1. Ефекат LPS на продукцију uPA и MMP9 у RAW 264.7 ћелијама	56
4.1.2. Ефекат инхибитора MAPK на LPS-ом индуковану продукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама	57
<u>4.2. Утицај анти-инфламацијског фактора TGF-β на продукцију uPA и MMP9 у макрофагима</u>	<u>61</u>
4.2.1. Ефекат TGF-β на продукцију uPA и MMP9 у RAW 264.7 ћелијама	61
4.2.2. Улога Smad2/3, MAPK и NFκB у остваривању ефекта TGF-β на продукцију uPA и MMP9 у RAW 264.7 ћелијама	62
<u>4.3. Ефекат LPS и TGF-β на продукцију урокиназа у RAW264.7 ћелијама</u>	<u>67</u>
<u>4.4. Утицај M1 и M2 поларизације макрофага на на продукцију uPA и MMP9 у макрофагима</u>	<u>68</u>
4.4.1.Повезаност функционалног фенотипа RAW264.7 ћелија и продукције uPA	68
4.4.2. Повезаност функционалног фенотипа мишјих примарних макрофага и продукције uPA и MMP9	69
<u>4.5. Ефекат анти-туморских лекова естрамустин фосфата и таксола на макрофаге</u>	<u>72</u>
4.5.1.Утицај естрамустин фосфата и таксола на ћелијски раст и пролиферацију RAW264.7 ћелија	72
4.5.2.Ефекат естрамустин фосфата и таксола на микротубуларну структуру RAW264.7 ћелија	74
4.5.3.Ефекат естрамустин фосфата и таксола на миграцију RAW264.7 ћелија	75
4.5.4.Утицај естрамустин фосфата и таксола на продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама	76

4.5.5. Утицај TGF- β на транслокацију молекула Smad3 у једру RAW264.7 ћелија	77
4.5.6. Утицај естрамустин фосфата и таксола на TGF- β индуковану активност Smad3 сигналног молекула у RAW264.7 ћелијама	78
4.6. Ефекат дексаметазона на макрофаге	81
4.6.1. Утицај дексаметазона на LPS-ом индуковану инхибицију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама	81
4.6.2. Утицај дексаметазона на TGF- β индуковану стимулацију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама	83
5. ДИСКУСИЈА	84
<hr/>	
5.1. Утицај и механизми деловања LPS на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама	84
5.2. Утицај и механизми деловања TGF β на продукцију uPA и MMP9 RAW264.7 ћелијама	88
5.3. Збирни утицај LPS и TGF β на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама	91
5.4. Утицај поларизације RAW264.7 ћелија на продукцију uPA и MMP-9	92
5.5. Утицај антитубулинских лекова и глукокортикоида на RAW264.7 ћелије	96
6. ЗАКЉУЧЦИ	103
<hr/>	
7. ЛИТЕРАТУРА	105
<hr/>	

1. Увод

1.1. Мононуклеарни фагоцитни систем

Фагоцитоза је једна од основних особина еукариотске ћелије и као таква представља најпримитивнији и универзални механизам одбране од страног агенса (*Cooper u Alder, 2006; Dzik JM, 2010*). Фагоцитне ћелије, као део урођеног имунског система, први је описао и систематизовао, 1882. године, Иља Мечников, руски зоолог, пионир истраживања у области имунологије (*Metchnikoff, 1892; Tauber, 2003; Gordon, 2016*). Он је серијом експеримената на бескичмењацима и кичмењацима описао улогу специјализованих фагоцитних ћелија, макрофага (МФ) и микрофага (касније преименованих у полиморфонуклеарне леукоците), у одговору организма на повреду и инфекцију, као и у одржавању интегритета ткива и хомеостази. Мечников је увидео и блиску везу између МФ присутних у различитим ткивима и сврстао све такве ћелије у макрофагни систем. У даљем току истраживања ових ћелија, МФ су сврставани са другим ћелијама, за које се својевремено сматрало да деле заједничко порекло и/или функцију, у ретикулоендотелни и касније ретикулохистиоцитни систем (*van Furth u cap., 1972*). Међутим, када су 1968. године ван Фурт и Кон показали да већина МФ популација води порекло од моноцита (Мо), уведен је појам мононуклеарног фагоцитног система, који је поред Мо и ткивних МФ обухватао и моноцитне претходнике у костној сржи (*van Furth u Cohn, 1968; van Furth u cap., 1972*). Овај појам је и данас у употреби (*Jenkins u Hume, 2014*), иако су савремена истраживања показала да многи ткивни МФ не воде порекло од Мо из костне сржи, већ директно од ембрионалних прекурсора из жуманчане кесе, као и да су способни за самообнову (*Davies u cap., 2013; Sieweke u Allen, 2013; Epelman u cap., 2014*).

Макрофаги су кључне ћелије имунског система јер поседују јединствене способности: одржавају хомеостазу, „процењују” врсту присутне претње по организм, покрећу адекватан имунски одговор ангажовањем одговарајућих компоненти имунског система, обустављају инфламацијски процес кад више није потребан, обнављају оштећена ткива и тако омогућавају поновно успостављање хомеостазе (*Gosselin u cap., 2014*). Поред тога, резидентни МФ, који су присутни

у готово свим ткивима од раних фаза ембрионалног развоја, имају важне улоге у развоју ткива и органа, регенерацији и ремоделовању ткива, одржавању метаболичке равнотеже и друге ткивно специфичне улоге (*Wynn u cap., 2013; Davies u cap., 2013*). Иако су као ентитет јединствени у остваривању наведених циљева, МФ су врло хетерогена група ћелија у погледу порекла, морфологије, фенотипских и функционалних обележја и локализације (*Gordon u Taylor, 2005*).

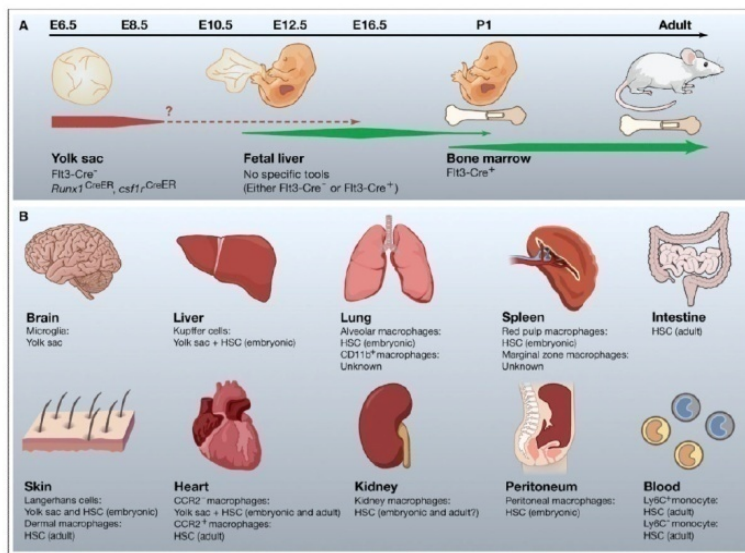
1.1.1. Порекло макрофага

Онтогенетски, хематопоеза започиње у примитивном ектодерму жуманчане кесе. У овој микросредини од мијелоидних прогенитора настају ембрионални макрофаги (еМФ), који током ембриогенезе мигрирају у друга ткива и даљом деобом и специјализацијом од њих настају ћелије мононуклеарног фагоцитног система у централном нервном систему (микроглија), јетри (Купферове ћелије), срцу и другим органима (*Davies u cap., 2013; Wynn u cap., 2013; Epelman u cap., 2014*). Хематопоеза се у даљем току развића одвија у феталној јетри где настају феталне хематопоеетске матичне ћелије од којих воде порекло макрофаги неких адултних ткива, попут Лангерхансових ћелија коже (*Hoeffel u cap., 2012*). Финално одредиште хематопоезе је ткиво костне сржи, где се матичне ћелије хематопоезе умножавају, сазревају и од њих настају све адултне ћелије хематопоеетске лозе, укључујући и ћелије мононуклеарног фагоцитног система у изворном смислу (*van Furth u cap., 1972; Wynn u cap., 2013; Jenkins u Hume, 2014*).

Макрофаги играју важну улогу у ембриогенези. Јединке које су генетски измењене да имају недостатак МФ од најранијих фаза развића, испољавају различите поремећаје развоја и смањено преживљавање пре и након рођења (*Dai u cap. 2002; Epelman u cap., 2014*). Ембриогенезу одликује развиће ткива које прати често интензивно ремоделовање кроз програмирану ћелијску смрт. Ембрионални МФ имају важну улогу у овим процесима, не само због фагоцитозе апоптотских ћелија, већ и због бројних других улога као што су синтеза цитокина, ангиогенетских фактора и фактора раста који доприносе васкуларизацији ембриона, расту и усмеравању аксона и синтези компоненти базалних мембрана

(нпр. протеоглигани, ламинин, колаген IV) (Wynn *u cap.*, 2013; Epelman *u cap.*, 2014).

У сваком ткиву однос заступљености МФ ембрионалног и адултног порекла је различит. Тако на пример, микроглија и Купферове ћелије у потпуности воде порекло од еМФ, чијом се деобом ове популације самостално обнављају (Davies *u cap.*, 2013; Epelman *u cap.*, 2014). Лангерхансове ћелије у раним стадијумима развоја воде порекло од еМФ, а у каснијим стадијумима развоја од прекурсора из феталне јетре (Hoeffel *u cap.*, 2012). Перитонеални и алвеоларни МФ су углавном пореклом од ембрионалних и феталних прекурсора МФ, а интестинални МФ имају искључиво моноцитно порекло и континуирано се обнављају из пула циркулишућих Мо (Epelman *u cap.*, 2014). Ткивни МФ различитог онтогенетског порекла коегзистирају и као заједница остварују различите функције специфичне за дато ткиво. Није поуздано утврђено да ли подела улога између ткивних макрофага у физиолошким и патолошким условима следи поделу према ембрионалном пореклу или не. Ткивни МФ се већим делом одржавају самообнављањем, али у случају израженог смањења њиховог броја, циркулишући Мо употпуњавају њихов број (Italiani *u Boraschi*, 2014; Epelman *u cap.*, 2014) (Слика 1.1).



Слика 1.1. Порекло и разноврсност макрофага (преузето из Epelman *u cap.*, 2014).

1.1.2. Моноцити

Моноцити су ћелије мононуклеарног фагоцитног система који се налазе у крви, где представљају 5% до 10% циркулишућих леукоцита, као и у костној сржи и слезини где чине резервни пул за брзу мобилизацију у случају потребе (*Jenkins u Hume, 2014; Italiani u Boraschi, 2014*). За њих се до скоро сматрало да представљају само прелазну форму у диференцијацији МФ, али су скорија истраживања показала да је њихов значај далеко већи.

Моноцити воде порекло од матичне ћелије хематопоезе и развијају се кроз низ узастопних развојних стадијума, преко заједничког мијелоидног прогенитора, гранулоцитно-макрофагног прогенитора, заједничког прогенитора за МФ и дендритичне ћелије, промоноцита, до циркулишућих Мо (*Jenkins u Hume, 2014*). Контрола Мо/МФ развоја највише зависи од фактора раста макрофагних колонија или фактора раста колонија 1 (CSF1 или M-CSF, од енгл. *Colony-Stimulating Factor 1, одн. Macrophage Colony-Stimulating Factor*), којег продукују стромалне ћелије (*Italiani u Boraschi, 2014*). Зрели МФ испољавају рецептор за овај фактор раста – CSF-1R. Везивањем CSF1 за овај рецептор на зрелим МФ смањује се његова расположивост и на тај начин се остварује негативна повратна спрега. Интерлеукин (IL-)34 је други агониста овог рецептора и заслужан је за пролиферацију резидентних МФ у епидерму и централном нервном систему у физиолошким условима (*Wang u cap., 2012*). Трећи фактор који је укључен у развој мононуклеарних фагоцита је фактор раста гранулоцитно-макрофагних колонија (CSF2 или GM-CSF, од енгл. *Colony-Stimulating Factor 2, одн. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*), који је задужен за развој и преживљавање Мо/МФ током инфламацијске реакције (*Italiani u Boraschi, 2014; Jenkins u Hume, 2014*).

Моноцити нису хомогена популација. Они се разликују по функционалним и фенотипским обележјима (*Italiani u Boraschi, 2014; Jenkins u Hume, 2014*). На основу испољености CD14, помоћног рецептора за липополисахарид (LPS) Грам-негативних бактерија, и CD16, рецептора за константни регион имуноглобулина Г (FcγRIII), моноцити човека се сврставају у једну од три функционалне подгрупе: класични Мо, који представљају 90% циркулишућих моноцита и снажно

испољавају CD14 (CD14^{јако+}), али не и CD16 (CD16⁻); интермедијални Мо, који су CD14^{јако+}, али испољавају и CD16; и неklasични Мо, који су CD16^{јако+}, али CD14^{слабо+} (Ziegler-Heitbrock *u cap.*, 2010). У мишјем систему су на сличан начин Мо подељени у две подгрупе на основу степена испољености Ly6C молекула, мембранског гликопротеина који је укључен у процес мијелопоезе (Reibechini *u cap.*, 2009): „инфламацијски“ Ly6C^{јако+} Мо и „резидентни“ или „патролирајући“ Ly6C^{слабо+} Мо (Geissmann *u cap.*, 2003; Italiani *u Boraschi*, 2014). Хумани класични и интермедијерни Мо, као и мишји Ly6C^{јако+} Мо учествују у инфламацији, снажно испољавају хемокински рецептор CCR2 који је битан за њихову мобилизацију из костне сржи и прелазак из крви у ткиво у запаљењу где се диференцирају у инфламацијске МФ (Shi *u Pamer*, 2011; Wynn *u cap.*, 2013; Jenkins *u Hume*, 2014). У физиолошким условима, ови моноцити могу бити прекурсори и резидентних МФ у неким ткивима, пре свега ткиву црева (Italiani *u Boraschi*, 2014; Epelman *u cap.*, 2014). С друге стране, „неklasични“ Мо човека и мишји Ly6C^{слабо+} Мо не испољавају CCR2 већ CX3CR1 хемокински рецептор, и имају улогу у „патролирању“ васкуларним ендотелом, где реагују на оштећења ендотелне површине, уклањају оштећене ендотелне ћелије и продукују факторе са функцијом обнављања оштећеног ендотела (Auffray *u cap.*, 2007). Због тога се сматрају резидентним макрофагима крвних судова. Они се такође могу привући у ткива у каснијим фазама инфламације, где имају улогу репарације оштећеног ткива (Nahrendorf *u cap.*, 2007). Нека истраживања упућују на то да су Ly6C^{јако+} Мо прекурсори Ly6C^{слабо+} Мо, одн. да након инфилтрације ткива у инфламацији и учествовања у њеним почетним фазама, у каснијим фазама инфламацијског одговора Ly6C^{јако+} Мо попримају функционалне и фенотипске одлике Ly6C^{слабо+} Мо и учествују у обнављању ткива (Arnold *u cap.*, 2007; Crane *u cap.*, 2014).

1.1.3. Ткивни макрофаги

Као што је претходно истакнуто, МФ су присутни у готово сваком ткиву, где у физиолошким условима представљају 10% до 15% укупне ћелијске популације (Italiani *u Boraschi*, 2014). Развој и одржавање резидентних МФ контролише околно ткиво секрецијом одговарајућих фактора (Stout *u Suttles*, 2004;

Davies u cap., 2013; Epelman u cap., 2014). Како органи имају различите функције у организму, тако се и биологија МФ према њима адаптира. Тако, у организму постоје МФ различитих морфолошких, фенотипских и функционалних одлика који се у разним ткивима називају различитим именима (*Gordon u Taylor, 2005*). Алвеоларни МФ у плућима имају функцију чишћења алвеола од микроорганизама и других честица и регулишу одржавање сурфактанта. У костима, остеокласти учествују у ресорпцији и ремоделовању кости током раста и развоја и метаболизму калцијума. Макрофази црвене пулпе слезине и Купферове ћелије у јетри елиминишу истрошене еритроците и регулишу рециклирање гвожђа. У тимусу и белој пулпи слезине, МФ имају важну улогу у уклањању апоптотичних лимфоцита. У мрком и белом масном ткиву, МФ регулишу активност адипоцита и утичу на термогенезу и осетљивост на инсулин. (*Davies u cap., 2013; Wynn u cap., 2013; Lavin u Merad, 2013*). Осим тога, у истом органу се може налазити више различитих врста МФ који имају различите функције зависно од њихове анатомске позиције. На пример, у кости, поред остеокласта који се налазе уз коштану ткиво, постоје и МФ у костној сржи који учествују у развоју еритроцита тиме што формирају нишу у којој се одвија еритропоеза и фагоцитишу једра истиснута из прогенитора еритроцита (*Wynn u cap., 2013*). У слезини миша су присутне четири популације: МФ беле пулпе, МФ црвене пулпе, металофилни МФ и МФ маргиналне зоне (*Davies u cap., 2013*). У перитонеуму миша су описане две популације МФ: велики перитонеални МФ, који одржавају хомеостазу и одговорни су за резолуцију инфламације, и мали перитонеални МФ, који су активни у почетној фази инфламације (*Cassado u cap., 2015*).

1.1.4. Поларизација макрофага

Нејтан је са сарадницима 1983. године показао да интерферон гама (IFN γ) који продукују Т лимфоцити активира МФ, тј. стимулише ослобађање реактивних кисеоничких врста (попут водоник пероксида) који уништавају унутарћелијске патогене (*Nathan u cap., 1983*). То је био први секреторни производ Т-лимфоцита чија је структура била позната, а који је снажно активирао оксидативни метаболизам и антимикуробну активност МФ човека. Стимулација МФ помоћу

IFN- γ и све промене у функцији МФ које је прате (повећана продукција кисеоничких и азотних реактивних врста и проинфламацијских цитокина) је постала позната као класичан пут активације МФ (*Martinez u Gordon, 2014*). Каснија истраживања су показала да поред IFN- γ и други проинфламацијски фактори на овај начин активирају МФ, укључујући липополисахарид Грам-негативних бактерија (LPS), фактор некрозе тумора алфа (TNF α , од енгл. *Tumor Necrosis Factor α*), GM-CSF, IL-1 β и IL-6 (*Gordon u Taylor, 2005; Martinez u Gordon, 2014; Italiani u Boraschi, 2014*). Овај тип МФ учествује у покретању инфламацијске реакције и Th 1 типа адаптивног имунског одговора. Има изражене проинфламацијске, микробицидне и друге аспекте активности који воде деструкцији микророганизма, продукујући велике количине реактивних кисеоничких врста (ROS, од енгл., *Reactive Oxygen Species*) и азотног монооксида (NO), проинфламацијских медијатора и протеолитичких ензима. Због тога, осим у одбрани од патогена, има значајну улогу у деструкцији ткива у хроничним инфламацијским и аутоимунским болестима (*Cassetta u cap., 2011; Wynn u cap., 2013*).

Штајн и сарадници су 1992. године стимулацијом МФ помоћу IL-4 описали супротан ефекат овог цитокина на МФ у поређењу са IFN- γ (*Stein u cap., 1992*). Стимулација МФ помоћу IL-4 и IL-13, као и функционалне промене МФ које је прате (смањена продукција проинфламацијских цитокина, повећана експресија имуносупресивних медијатора, рецептора за препознавање молекуларних образаца и матриксних протеина) је постала позната као алтернативан пут активације МФ (*Stein u cap., 1992; Doyle u cap., 1994; Martinez u Gordon, 2014*). Овакви МФ, поред учешћа у имунском одговору на паразите и у алергији, имају важну улогу у резолуцији инфламације, зарастању рана и ремоделовању ткива, као и у имуносупресији и имунолошкој толеранцији (*Cassetta u cap., 2011; Röszer, 2015*).

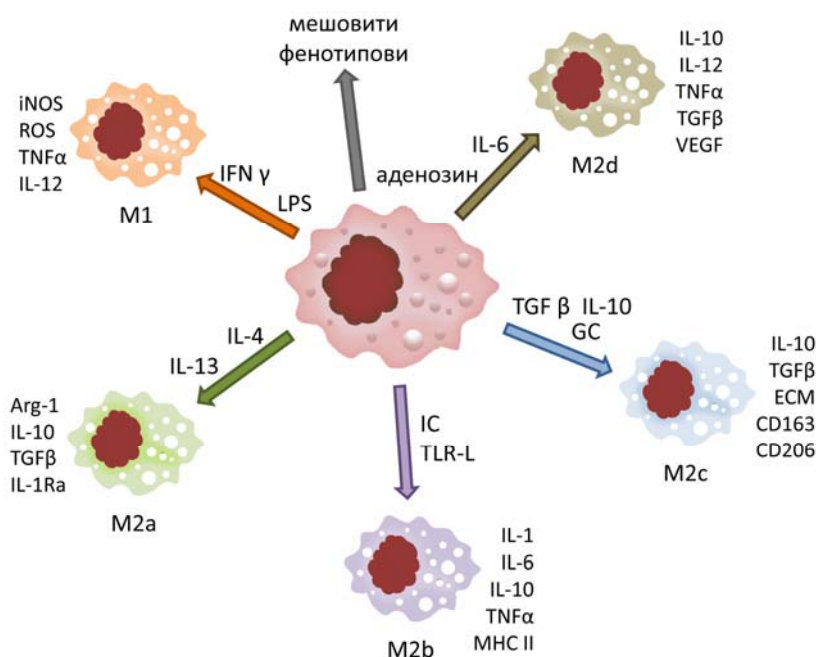
Према аналогiji са концептом који су 1986. године увели Мосман и сарадници, о подели помоћничких Т лимфоцита на два подтипа – Th1 и Th2 (*Mosmann u cap., 1986*), Милс и сарадници су предложили поделу МФ на два функционална фенотипа – M1 и M2 (*Mills u cap., 2000*). Према њиховом моделу, једна од кључних разлика између ова два функционална фенотипа се огледа у

правцу у ком је усмерен метаболизам аргинина. У М1 ћелијама је испољена индуцибилна NO синтаза (iNOS, од енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase*), те је метаболизам аргинина усмерен у правцу NO и цитрулина, док је у М2 ћелијама експримирана аргиназа-1, па је метаболизам аргинина усмерен ка орнитину и уреи. NO је ефекторски молекул који делује микробицидно и инхибира ћелијску деобу, те М1 МФ имају доминантну улогу у раним фазама инфламације и елиминацији патогена или трансформисаних ћелија домаћина, док је орнитин неопходан за процес обнављања јер је прекурсор полиамина неопходних за ћелијску деобу и колагена неопходног за изградњу венћелијског матрикса (ECM, од енгл. *Extracellular Matrix*), тако да је биолошка улога М2 МФ посебно изражена у процесима обнављања ткива током хомеостазе или резолуцији инфламације (Mills *u cap.*, 2000; Mills *u Lay*, 2014).

Каснија истраживања су показала да разни други фактори, који не спадају стриктно у Th1 или Th2 медијаторе, попут продуката регулаторних Т лимфоцита, IL-10 и трансформишућег фактора раста бета (TGF- β , од енгл. *Transforming Growth Factor β*), или имунских комплекса, глукокортикоида и др., такође доводе до алтернативних видова активације МФ. (Martinez *u Gordon*, 2014; Röszer, 2015). То је указало на недостатке ове строге дихотомије, па су уведене подкласе М2 МФ: М2а – индукован IL-4 или IL-13, М2b – индукован имунским комплексима у комбинацији са лигандима за TLR и IL-1 рецепторе; М2c – индукован IL-10, TGF β или глукокортикоидима; М2d – индукован IL-6 и аденозином и друге (Слика 1.2.) (Mantovani *u cap.* 2004; Röszer, 2015). Како би се избегла конфузија у номенклатури ових функционалних фенотипова индукованих различитим факторима и њиховим комбинацијама, неформална међународна група група стручњака у области биологије МФ донела је 2014. године предлог да се у сам назив подтипа МФ инкорпорира фактор који је довео до активације: нпр. М(IL-4), М(IFN γ), М(LPS), М(IL-10), М(LPS+IFN γ) и томе сл. (Murray *u cap.*, 2014).

Недостатак досадашњих система класификације МФ је што се превише ослања на појединачне *in vitro* активационе стимулусе, не узимајући довољно у обзир комплексну микросредину у којој се МФ налазе у ткивима, као ни њихову биолошку функцију *in vivo* (R szer, 2015; Martinez *u Gordon*, 2014; Sica *u Mantovani*, 2012). Свака ткивна микросредина обилује својим специфичностима

којима се имунски одговор прилагођава, па се у њима најчешће налазе истовремено и M1 и M2 ћелије и читав низ њихових прелазних форми (*Mills u Lay, 2014; Martinez u Gordon, 2014*). Зато неки аутори сматрају да оваква динамична комплексност стимулуса захтева да се биполарна M1/M2 парадигма преиспита и уведе нов систем који би узео у обзир мноштво елемената, како локалних, тако и системских, као и карактеристике њихових ефекторских функција, како би обухватио пун функционални опсег активираних МФ (*Martinez u Gordon, 2014; Röszer, 2015*). У исто време, други аутори сматрају да карактеризација МФ даље од M1/M2 функционалног фенотипа нема смисла, јер само они манифестују реално различите биолошке функције *in vivo*, а све друго представља МФ затечене у промени фенотипа или је резултат изолованих *in vitro* стимулација (*Mills, 2015*). Ипак већина аутора се слаже да постојећа M1/M2 парадигма има своје место у *in vitro* истраживањима, јер M1 и M2 МФ имају јасно подељене и антагонистичке ефекте, те да се као такви налазе на крајевима спектра активационих стања МФ и представљају модел систем за испитивања функционалне поларизације МФ (*Murray u cap., 2014*).



Слика 1.2. Схематски приказ поларизације МФ. Подела функционалних фенотипова макрофага на основу различитих стимулуса: TLR лиганата (TLR-L, LPS), цитокина, глюкокортикоида (GC), имуних комплекса (IC) и др.

1.2. Улога макрофага у инфламацији и туморима

1.2.1. Инфламација

Инфламација (запаљење) је реакција васкуларизованог ткива на инфекцију или оштећење која доводи ћелије и молекуле задужене за одбрану домаћина на место збивања, у циљу уклањања штетног агенса (*Kumar u sar., 2015*). Суштински, инфламација представља механизам адаптације на услове ткивног стреса, одн. поремећеног функционисања ткива (контрола ткивне хомеостазе). У зависности од природе и степена поремећаја, инфламацијски одговор може бити минималан и укључивати само резидентне ћелије (МФ и маст ћелије) или, у случају инфекције и ткивног оштећења, покренути класичан инфламацијски одговор који укључује ангажовање додатних инфламацијских ћелија и протеина путем крви. Који год да је узрок инфламације, њена улога је да одстрани или изолује извор поремећаја, да омогући адаптацију на нове услове и, најзад, да поврати функционалност и хомеостазу ткива. Уколико је поремећај пролазног карактера, успешан акутни инфламацијски одговор враћа систем на пређашње стање. Уколико се, међутим, такви услови одржавају дуже време, одн. постоји континуирана стимулација, ако је одговор био превише благ и недовољан да уклони агенс који је покренуо инфламацију или је пак одговор био превише интензиван и довео до великог оштећења (те је успостављен „зачарани круг“ где продукти оштећеног ткива изнова покрећу инфламацијски одговор), онда текуће инфламацијско стање прилагођава систем померајући опсег прихватљивих вредности на нови ниво и инфламација поприма хроничан ток (*Nathan u Ding, 2010; Medzhitov, 2008*). У патогенези многих болести инфламација игра кључну улогу, било као главни покретач или фактор који одржава и појачава патофизиолошки процес: неке инфективне болести (сепса, туберкулоза, хронични хепатитис), алергијске реакције, астма, аутоимунске и хроничне инфламацијске болести (реуматоидни артритис, инфламацијска болест црева, мултипла склероза), али и многе болести за које се сматрало да су искључиво или превасходно последица метаболичких, дегенеративних или генетичких поремећаја, попут

дијабетеса типа 2, гојазности, атеросклерозе, неуродегенеративних болести и канцера (*Kumar u cap., 2015; Nathan, 2008; Mantovani u cap., 2008*).

Први корак у започињању инфламацијске реакције је сигнализација о присуству штетног агенса и оштећењу ткива. То се постиже везивањем егзогених и/или ендогених индуктора инфламације за специфичне рецепторе или сензоре (*Medzhitov, 2008*). Егзогене индукторе представљају компоненте микроорганизама (молекуларни обрасци патогена – PAMP, од енгл. *Pathogen Associated Molecular Patterns*), алергени, иританти, токсичне супстанце или страна тела. Ендогени индуктори су мање испитани, а могу бити разноврсни. Они се још збирно називају молекуларним обрасцима повезаним са оштећењем (DAMP, од енгл. *Damage Associated Molecular Patterns*) и обично представљају продукте који настају оштећењем ћелија или разградњом ЕСМ или молекули који се услед оштећења природне баријере нађу на местима где се у здравом ткиву не налазе. На пример, аденозин трифосфат (АТФ), мокраћна киселина, K^+ јони и HMGB1 (од енгл. *High-Mobility Group Box 1*) се нормално налазе унутар ћелије, а након оштећења ћелијске мембране ови молекули се могу наћи у међућелијском простору где су доступни детекцији од стране одговарајућих рецептора на и унутар „стражарских ћелија“ (од енгл. *Sentinel Cells*) на месту продора страног агенса, одн. оштећења ткива, укључујући ткивне МФ, дендритичне ћелије, маст ћелије, ендотелне ћелије, епителне ћелије, мезенхимске ћелије и неуроне. (*Medzhitov, 2008*).

Било да потичу од егзогених или ендогених индуктора, сигнале оштећења детектују неки од истих рецептора молекуларних образаца (PRR, од енгл. *Pattern Recognition Receptors*), као што су рецептори слични Toll молекулу винске мушице (TLR, од енгл. *Toll-like receptor*), рецептори слични NOD (од енгл. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) молекулу (NLR), рецептори слични RIG-I (од енгл. *Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) хеликази (RLR) и лектински рецептори Ц-типа (*Medzhitov, 2008; Takeuchi u Akira, 2010*). По везивању својих лиганата, они покрећу сигналну каскаду која доводи до продукције бројних инфламацијских медијатора.

Главна улога иницијалне фазе инфламације је довођење ћелија и протеина задужених за одбрану организма на место инфламације, односно, стварање

ексудата. Стога инфламацијски медијатори укључени у ову фазу имају вазоактивно и хемоатрактантно дејство, попут хистамина, брадикинина, фрагмената компоненти комплемента (C3a, C4a, C5a), простагландина, леукотријена, цитокина (IL-1, IL-6, TNF- α) и хемокина, или олакшавају пролаз леукоцитима кроз базалну мембрану и ЕСМ, попут еластаза, катепсина, матриксних металопроотеиназа и других протеолитичких ензима (*Kumar u cap., 2015; Medzhitov, 2008*).

По уклањању штетног агенса инфламацијска реакција се стишава и долази до резолуције (разрешења) инфламације и репарације (поправке) ткива и, у идеалним условима, регенерације и довођења ткива у првобитно стање. Резолуција инфламације није пасиван процес који следи пошто се истроше фактори који су покренули инфламацију, већ је то активан процес који се покреће већ са иницијацијом запаљења. Овај процес захтева комплексну и синхронизовану акцију различитих ћелијских, унутарћелијских (сигнални молекули) и солубилних (ванћелијских) елемената, попут M2 МФ, регулаторних Т лимфоцита (Treg), цитокина (IL-10, TGF- β), инхибитора протеаза, продуката метаболизма арахидонске киселине са регулаторним ефектом (липоксини, резолвини, протектини), аденозина, ацетилхолина и др. (*Nathan u Ding, 2010*).

1.2.2. Улога макрофага у имунском одговору и инфламацији

Мононуклеарни фагоцитни систем има важно место у свим фазама процеса инфламације. МФ испољавају велики број рецептора, попут рецептора TLR, рецептора чистача (*енгл. Scavenger Receptors*), лектинских рецептора Ц-типа (манозни рецептор, Dectin-1), затим рецептора за константне фрагменте имуноглобулина (FcR), компоненте комплемента, солубилне лектине и друге опсонине, као и рецепторе за цитокине, хемокине, факторе раста и многе друге медијаторе (*Abbas u cap., 2015*). Преко ових рецептора, МФ узоркују своју околинду, препознају патогене и оштећене ћелије и примају сигнале помоћу којих прате и процењују стање у ткиву, како би по потреби реаговали покретањем инфламације, одн. остварили своју улогу у одржавању ткивне хомеостазе (*Medzhitov, 2008*).

Фагоцитоза је свакако једна од најистакнутијих одлика МФ (по којој су заправо и откривени). Процесом фагоцитозе, МФ увлаче честице веће од $0,5 \mu\text{m}$ у ћелију процесом који захтева енергију и учешће цитоскелета, формирајући фагозоми који се затим спајају са примарним лизозомима у фаголизозоме или секундарне лизозоме где се ове честице протеолитички разграђују (*Abbas u cap., 2015*).

МФ су антиген-презентујуће ћелије, што значи да пептиде добијене разградњом честица у фаголизозому презентују помоћничким Т-лимфоцитима у склопу молекула главног комплекса ткивне подударности II класе (МНС-II, од енгл. *Major Histocompatibility Complex, class II*) (*Abbas u cap., 2015*). Они такође испољавају костимулатрне молекуле и луче цитокине и друге медијаторе којима усмеравају имунски одговор у одређеном правцу у складу са процењеним стањем у ткиву (*Leu, 2014*). На тај начин МФ активно учествују и у стеченом (адаптивном) имунском одговору. Скорија истраживања су указала на присуство такозваних ткивних Мо, $\text{Ly6C}^{\text{jako}^+}$ фенотипа, који улазе у ткива у физиолошким условима и ту, без даље диференцијације, сакупљају антигене, експримирају МНС-II молекуле и рециркулишу у лимфне чворове, где презентују антигене Т лимфоцитима (*Jakubzick u cap., 2013*).

У инфламацијским условима, $\text{Ly6C}^{\text{jako}^+}$ Мо у оштећено ткиво привлаче резидентни ткивни МФ или МФ настали од претходно регрутованих инфламацијских Мо (*Randolph, 2013*). Током ове миграције $\text{Ly6C}^{\text{jako}^+}$ Мо се диференцирају у МФ (*Jakubzick et al., 2013, Wynn u cap., 2013*). Мобилизација Мо и улазак у ткиво у инфламацији су процеси контролисани временски уређеним испољавањем хемокина, хемокинских рецептора, адхезивних молекула и протеолитичких ензима (*Shi u Pamer, 2014; Reichel u cap., 2012*). Мо улазе у ткиво процесом екстравазације, који подразумева сложу интеракцију са ендотелним ћелијама крвних судова и има неколико фаза: хватање, котрљање, заустављање и адхезију за ендотел, пузање по луминалној површини и трансендотелну миграцију (*Shi u Pamer, 2014; Reichel u cap., 2012*).

Развојни однос између различитих Мо и МФ популација још није до краја утврђен, али се сматра да се класични Мо, када се привуку на место инфламације,

диференцирају у М1 МФ, док се неklasични Мо диференцирају у М2 МФ (*Italiani u cap., 2014*). У инфламацији, М1 МФ пореклом од инфламацијских Мо, углавном представљају краткоживеће убилачке ћелије које подлежу сопственим токсичним продукцима. Међутим, сматра се да МФ који преживе инфламацијски одговор постају резидентни ткивни МФ М2 типа и тако доприносе обнови пула ткивних МФ након инфламације (*Italiani u cap., 2014*).

О значају поларизације МФ у физиолошким и патолошким условима, па самим тим и великом потенцијалном клиничком значају бољег разумевања регулације ове поларизације, сведочи и чињеница да екстремна М1 поларизација лежи у основи хемофагоцитне лимфохистиоцитозе, синдрома који се одликује неконтролисаној продукцијом проинфламацијских цитокина; с друге стране, преминација М2 фенотипа је, према све већем броју резултата истраживања, део патофизиолошког супстрата многих хроничних запаљенских и аутоимунских болести (*Rich u cap., 2013; Wynn u cap., 2013; Sica u Mantovani, 2012*).

1.2.3. Туморска средина и туморски макрофаги (ТАМ)

Улогу инфламације у развићу тумора први је описао Рудолф Вирхов 1863. године (*Virchow, 1863*). Он је уочио инфилтрацију инфламацијских ћелија у ткиво тумора и према томе поставио хипотезу да активна инфламација игра улогу у настанку неопластичних процеса. Тек последњих деценија, ова хипотеза је подржана бројним експерименталним доказима (*Landskron u cap., 2014; Grivenikov u cap., 2010; Mantovani u cap., 2008*).

Соматске ћелије су под сталним ризиком од туморске трансформације тако да су организми у склопу имунског система развили механизме имунског надзора. Ови механизми обухватају: контролу инфекције изазване онкогеним патогенима, обустављање локалне инфламације са циљем спречавања успостављања хроничне инфламације која погодује формирању туморогене микросредине, и елиминацију већ трансформисаних ћелија (*Chimal-Ramirez u cap., 2013*).

Интеракција ћелија имунског система и тумора је динамичан процес у коме је описано пет фаза: имунски надзор, имунска селекција, избегавање

имунитета, „онко-тренинг” и „онко-промоција” (*Chimal-Ramirez u cap., 2013*). У првој фази имунски систем успешно елиминише трансформисане ћелије. У случају неуспеха прве фазе, следи друга фаза у којој се туморске и имунске ћелије и имунске ћелије надмећу у својим активностима. Туморске ћелије се убрзано деле, расте њихов мутагени потенцијал и увећава им се капацитет самообнове и преживљавања. Са друге стране, имунске ћелије покушавају да постигну да елиминишу све трансформисане ћелије. Истовремено, ROS, NO, IFN- γ , TNF- α , IL-6 и други проинфламацијски медијатори које ослобађају M1 МФ доприносе континуираној мутацији и еволуцији трансформисаних ћелија (*Grivenikov u cap., 2010; Mantovani u cap., 2008*). Временом, ова трка мутирања и селекције доводи до развића механизма избегавања имунског система, чиме се равнотежа губи, и преовладава раст тумора. Туморски клонови настали у оваквој интеракцији са имунским системом, користе особине имунског система да преобликује микросредину тумора у своју корист усмеравањем активности имунских ћелија од анти-туморске ка про-туморској. Овај процес се означава као „онко-тренинг”. Једна од функција имунских ћелија над којом туморске ћелије преузимају контролу је капацитет стимулације имунских регулаторних механизма, чиме искључују фагоцитозу и цитотоксичност, а подстичу механизме ремоделовања ткива. Заједно, ови процеси резултују „онко-промотивном” фазом у којој доминира раст тумора, инвазија и метастазирање (*Chimal-Ramirez u cap., 2013*).

Макрофази у туморском ткиву се називају МФ повезани са тумором или тумор-асоцирани МФ (ТАМ, од енгл. *Tumor-Associated Macrophages*). Висока бројност ТАМ у туморима обично корелира са лошом прогнозом (*Murdoch u cap., 2008*). По транскрипционом профилу ТАМ су најсличнији еМФ (*Lahmar u cap., 2016; Wynn u cap., 2013*). Највећи број ТАМ има M2 функционални фенотип, те они својим функцијама подстичу раст и развој тумора – ангиогенеза, инвазија, метастазирање (*Wynn u cap., 2013; Cassetta u cap., 2011*). У моделима карцинома дојке је показано да МФ попримају овакав функционални фенотип у одговору на M2 активаторе, попут M-CSF, IL-4 и IL-13, са којима долазе у контакт у туморској микросредини (*Wynn u cap., 2013*). Ови ТАМ затим луче епидермални фактор раста (EGF, од енгл. *Epidermal Growth Factor*) и успостављају паракрину повратну спрегу са околним малигним ћелијама: EGF стимулише деобу малигних ћелија, а

тима расте количина секретованог M-CSF чиме се наставља привлачење Мо и тима увећава број МФ у тумору.

Имуносупресивна микросредина тумора, којој доприносе ТАМ, онемогућавају М1 МФ, НК и цитотоксичне Т ћелије да супримирају раст трансформисаних ћелија. Смањеном експресијом М1-поларишућих цитокина, IFN- γ и IL-12, ТАМ смањују број М1 МФ, својим ниским нивоом експресије МНС-II умањују могућност презентације туморских антигена, док секрецијом анти-инфламацијских цитокина, IL-10 и TGF- β , инхибирају пролиферацију Т лимфоцита и индукују диференцијацију Treg (*Chimal-Ramirez u cap., 2013; Grivenikov u cap., 2010*).

М2 ТАМ подстичу: хроничну инфламацију експресијом COX-2, ангиогенезу секрецијом VEGF, ангиопоетина 1 и 2, GM-CSF и EGF, и инвазију туморских ћелија секрецијом протеаза MMP-1, -2, -9, катепсина, uPA и др. (*Wynn u cap., 2013*). Свака од ових функција је есенцијална за преживљавање и раст тумора, док су ангиогенеза и разградња ЕСМ кључни за метастазирање. Стварање нових крвних судова омогућава раст туморског ткива и отвара пут дисеминацији. Разградња ЕСМ олакшава ширење тумора у околно ткиво, пенетрацију нових крвних судова и миграцију метастатских ћелија кроз ткиво. У инвазивним туморима ТАМ су превасходно лоциране у областима разградње базалне мембране и увећане секреције протеаза. Приликом интензивне инвазије тумора, ТАМ и карциномске ћелије заједно мигрирају из примарног тумора (*Pixley u cap., 2012*).

Међутим, ТАМ задржавају пластичност која им дозвољава прелазак из М2 у М1 функционални фенотип и обрнуто, зависно од услова микросредине у којој се налазе (*Нao u cap., 2012*). Отуда тумори инфилтрирани превасходно М1 МФ, продукујући NO који инхибира ћелијску деобу, изазивају снажнији имунски одговор који успорава њихово напредовање у поређењу са М2 МФ, који продукују орнитин који стимулише раст тумора (*Chimal-Ramirez u cap., 2013*).

1.3. LPS, TGF- β и молекулски механизми активације макрофага

МФ спадају међу транскрипционо најактивније ћелије, способне да брзо и драматично промене транскрипциони профил и тако се прилагоде изненадним променама микросредине проузрокованим инфекцијама или повредама. Упркос њиховој фенотипској и функционалној разноврсности, међу њима постоји суштинска сличност. Изгледа да се специјализација њихових подтипова остварује експресијом или репресијом одређене комбинације релативно малог скупа гена (*Lawrence u Natali, 2011*). Транскрипциони фактор PU.1 има одлучујућу улогу у успостављању основног плана генске експресије у МФ. Мишеви PU.1^{-/-} немају МФ (*McKercher u cap., 1996*). С друге стране, главни транскрипциони фактор који врши брзе промене генске експресије у зависности од сигнала које је примила ћелија је NF κ B (*од енгл. Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*). Ова два фактора су узајамно зависна у својој функцији (*Gosselin u Glass, 2014*).

NF κ B је фамилија транскрипционих фактора који могу да буду састављени од хомо- или хетеродимера пет различитих субјединица: Nfkb1/p-50, Nfkb2/p52, RelA (p65), c-Rel и RelB. Свих пет субјединица има конзервирани N-терминални домен који је одговоран за димеризацију, транслокацију у једро, везивање за ДНК и интеракцију са инхибиторима. Међутим, трансактивирајући домен немају p50 и p52. Они се, такође, једини не синтетишу у зрелој форми, већ у виду прекурсора p105 односно p100 (*Wan u Lenardo, 2009*). Инхибитора NF κ B (I κ B) има осам: Nfkb1/p105, Nfkb2/p100, I κ B α - ζ , I κ BNS и Bcl-3. I κ B α и I κ B ϵ инхибирају димере тако што их задржавају у цитоплазми. Остали чланови ове инхибиторне фамилије су заправо кофактори који позитивно и негативно утичу на NF κ B димере (*Xiao u Fu, 2011*). Најчешћи састав NF κ B транскрипционих фактора је p65/p50. Инхибитори I κ B α , I κ B β и I κ B ϵ задржавају p65/p50 димер у цитоплазми у неактивном стању (*Basak, 2008*). Бројни стимулуси, као што су инфламациони цитокини, митогени или LPS, могу да покрену канонски пут активације NF κ B. При том I κ B киназе (IKK) обележавају I κ B инхибиторе за деградацију, након чега

се слободни p65/p50 димер премешта у једро и регулише генску експресију (Perkins, 2007).

NFκB стимулише експресију про-инфламацијских гена, укључујући циклооксигеназу 2 (COX-2, од енгл. *Cyclooxygenase 2*), IL-10 и iNOS; затим проангиогених гена, попут фактора раста васкуларног ендотела (VEGF, од енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*); и гена за металопроотеиназе матрикса (MMP, од енгл. *Matrix Metaloproteinases*). То је најважнији транскрипциони фактор који усмерава МФ ка М1 функционалном фенотипу. Међутим, у бројим патолошким стањима, показан је његов утицај на пластичност МФ и могућност да их усмери било ка М1 било ка М2. На пример, током ране фазе туморогенезе, NFκB усмерава МФ ка М1 фенотипу туморских МФ (ТАМ, од енгл. *Tumor-Associated Macrophages*), што је важно за иницирање инфламације у тумору, док у касним фазама развића тумора, када се поларизација МФ преусмерава ка М2 ТАМ, значајно опада његова активност и постаје изражен имуносупресиван капацитет ових МФ (Wang и сар., 2014).

1.3.1. LPS

Липополисахарид (LPS, ендотоксин) је главни конституент спољашње мембране Грам негативних бактерија. Приликом ћелијске деобе или смрти ових бактерија у инфицираном организму, LPS се ослобађа и везује за LPS-везујуће протеине или солубилне форме LPS-рецептора, који транспортују LPS до површине ћелија као што су фагоцити, лимфоцити и фибробласти. Минимална концентрација ендотоксина коју детектују ћелије износи 1-10 pg/ml (Kabanov и Prokhorenko, 2011). LPS је моћан активатор различитих компоненти урођеног имунског система и покретач инфламацијског одговора.

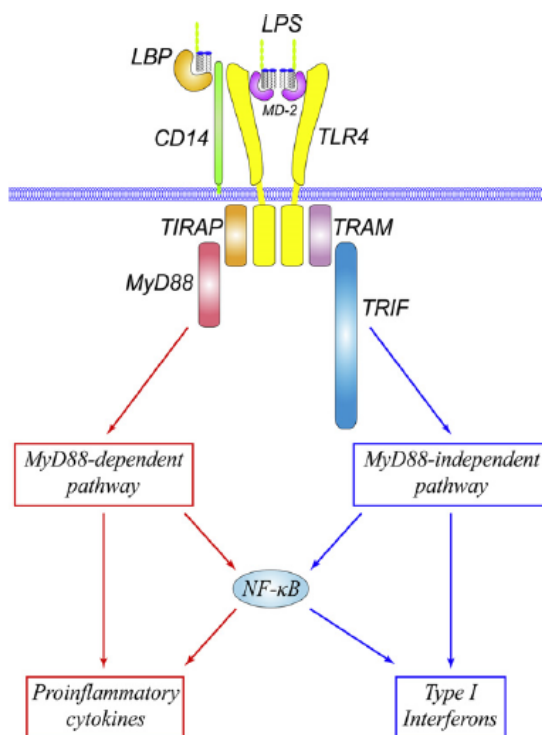
У ћелијама мононуклеарног фагоцитног система LPS активира комплексну унутарћелијску сигнализацију, доводећи те ћелије у проинфламацијско стање у којем долази до повећане секреције различитих цитокина, хемокина и других инфламацијских медијатора, попут IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα, iNOS, COX-2 (Dos Santos и сар., 2007). Сам или у комбинацији са другим инфламацијским факторима, као што је IFN-γ, LPS учествује у активацији макрофага класичним

путем и усмерава их ка проинфламцијском (M1) фенотипу. Да би остварио своје ефекте, LPS се прво везује за одговарајуће рецепторе, од којих су најпознатији LBP (од енгл. *LPS-Binding Protein*) и CD14, а затим се тај комплекс везује за комплекс TLR4 и MD-2 на ћелијској мембрани. Сигнал се даље преноси или путем адапторних протеина MyD88 (од енгл. *Myeloid Differentiation Factor 88*) и TIRAP (од енгл. *Toll-IL-1-Receptor-Domain-Containing Adaptor Protein*), или путем TRIF (од енгл. *Toll-IL-1-Receptor-Domain-Containing Adapter Inducing IFN β*) и TRAM (од енгл. *TRIF-Related Adaptor Molecule*) адапторних молекула (MyD88-независни пут) (Слика 1.3.). Оба ова пута воде активацији нисходних сигналних каскада, укључујући IKK и MAPK, који на крају доводе до активације транскрипционих фактора NF κ B, AP-1 (од енгл. *Activator Protein 1*), IRF3 (од енгл. *Interferon-Regulatory Factor*) и IRF5 (Lu и сар., 2008).

LPS секвенцијално регулише генску експресију група гена који кодирају одређене функционалне програме. Прво се активирају гени које регулишу транскрипциони фактори I категорије, који су конститутивно експримирани у ћелији, попут NF κ B или IRF (гени раног одговора). Ту спадају неки од класичних проинфламацијских цитокина, попут TNF α , IL-1 β , IFN β , као и транскрипциони фактори II категорије, попут C/EBP δ (од енгл. *CCAAT/Enhancer-Binding Protein- δ*), који делују аутокринно на индукцију гена каснијег одговора (Medzhitov и Horng, 2009; Hume, 2012). Поред проинфламацијских гена, LPS индукује и експресију неких инхибиторних фактора, чиме се остварује негативна повратна спрега која умањује могућност испољавања претеране инфламацијске реакције.

Још један адаптивни механизам контроле, пре свега хроничне инфламацијске реакције, који је карактеристичан за LPS, јесте прогресивно смањење експресије проинфламацијских гена као одговор на дуготрајну или поновљену стимулацију путем LPS. Овај феномен се назива толеранција на ендотоксин и представља комплексан процес који још увек није до краја познат (Biswas и Lopez-Collazo, 2009). Толеранција на ендотоксин не обухвата све гене подједнако. Гени који су укључени у одбрану од патогена (нпр. препознавање патогена, фагоцитоза), као и анти-инфламацијски гени (нпр. IL-10, TGF β), нису супримирани. На тај начин, организам је развио систем који смањује ризик

претеране инфламацијске реакције, док истовремено одржава активним механизме борбе против патогена.



Слика 1.3. Схематски приказ LPS сигнализације преко TLR4 (преузето из *Lu u cap.*, 2008).

1.3.2. TGF-β

Трансформишући фактор раста бета (TGF-β, од енгл. *Transforming Growth Factor β*) се синтетише у виду прекурсорског комплекса и секретује из ћелија у неактивној форми као комплекс пептида асоцираног са латенцом (LAP, од енгл. *Latency-Associated Peptide*), који представља N-терминални регион прекурсорског протеина, и зрелог TGF-β (C-терминални део прекурсорског протеина). Њихова нековалентна веза, спречава преурањену активацију TGF-β. Овај комплекс одмах након секреције интерагује са ECM и ту остаје везан. Веза LAP и TGF-β се може прекинути променом температуре и рН, излагањем ROS, дејством протеиназа и сл. (*Santibanez u cap.*, 2011; *Morikawa u cap.*, 2016).

TGF-β се на ћелијама везује за ALK5 (TGFBR1) и TGFBR2, серин/треонин-киназне рецепторе типа I и II (TBRI (или од енгл. *Activin Like Receptor Kinase*,

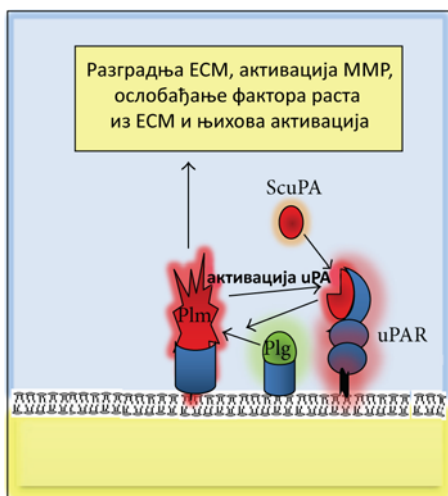
ALK) и TBR1). Везивањем цитокина, рецептори се активирају и спајају у хетеродимерни функционални рецептор. у циљним TGF β ћелијама активира неколико сигналних путева, углавном зависних од транскрипционих фактора, као што су Smad-зависни [*протеин је хомолог протеина Drosophila MAD (Mothers Against Decapentaplegic) и протеина C. elegans SMA (Small Body Size), те је његово име спој ова два имена*] (Smad2 и Smad3), али и Smad-независни путеви (ERK1,2, p38 и JNK1,2 MAPK), као и транскрипциони фактор NF κ B (Слика 1.4.).

TGF- β је плејоморфни цитокин који учествује у регулацији бројних физиолошких процеса, укључујући ембриогенезу, диференцијацију адултних матичних ћелија и имунски одговор (*Morikawa и сар., 2016*).

Иако TGF- β првенствено важи за имуносупресивни цитокин, његови ефекти су плејотропни у зависности од контекста у ком делује. Он има кључну улогу у лимфоцитној хомеостазу. Мишеви којима недостаје ген за TGF- β умиру до месец дана након рођења услед обилне лимфоцитне инфилтрације срца, плућа и других ткива и продукције ауто-антитела (*Shull и сар., 1992*). TGF- β супримира пролиферацију Т лимфоцита, и њихову диференцијацију у Th1 и Th2 правцу. С друге стране, овај цитокин индукује диференцијацију и преживљавање имуносупресивних Treg (*Chen и сар. 2003; Liu и сар. 2008*), док у комбинацији са IL-6 или IL-21 ндукује диференцијацију проинфламацијских Th17 лимфоцита (*Veldhoen и сар. 2006; Korn и сар. 2007*). Има кључну улогу у имунском систему слезнице, где га продукују Tr1 лимфоцити, стимулише Б лимфоците да продукују имуноглобулине класе IgA (*Konkel и Chen, 2011*). Има важну улогу у одржавању хомеостазе МФ (*Gosselin и Glass, 2014*). Усмерава МФ у правцу „деактивираног“ M2c функционалног фенотипа, без обзира на актуелни функционални статус ових ћелија у том моменту. У фази резолуције инфламације утиче на опоравак ткива и зарастање ране стимулацијом синтезе колагена, фибронектина и протеаза ЕСМ, као и ангиогенетских фактора од стране МФ и фибробласта, али доприноси и фибрози ткива (*Santibanez и сар., 2011; Morikawa и сар., 2016*).

Сходно наведеним физиолошким улогама, промене у TGF- β сигнализацији доприносе манифестацијама разноврсних патолошких стања као што су тумори, кардиоваскуларна обољења, фиброза и наследне аномалије (*Morikawa и сар.,*

2016). Интересантно је да TGF- β има две супростављене улоге у туморима зависно од фазе њиховог развоја. У раном периоду развоја карцинома и других тумора, TGF β испољава антитуморски ефекат: снажно инхибира ћелијску деобу и продукцију паракриних митогених фактора у стромалним ћелијама, одржава геномску стабилност, стимулише проинфламацијски одговор имунског система. Међутим, у касним фазама развића делује протуморски: стимулише анти-инфламацијски одговор имунског система и тиме раст и метастазирање тумора (Meulmeester и Ten Dijke, 20011; Santibanez и сар., 2011).



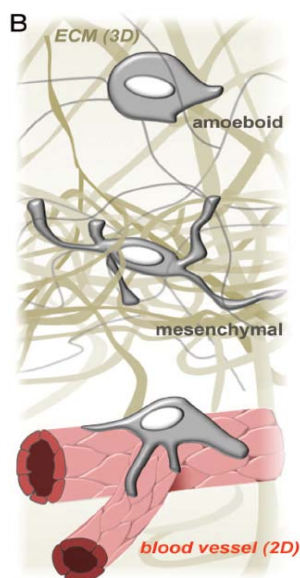
Слика 1.4. Схематски приказ TGF- β сигнализације (адаптирано према Santibanez, 2011).

1.4. Миграција макрофага, uPA и MMP-9

Да би остварио било коју од својих функција у инфламацији Мо/МФ мора да се активира и мигрира до места на коме је потребан. Будући да њихова брзина не прелази 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ *in vitro*, МФ су спорији од осталих леукоцита, али ипак *in vivo* довољно брзо реагују на одговарајуће хемокинске градијенте и у тим условима су у стању да пређу велике раздаљине. Миграција у ткиву је сложен процес који укључује: промене актинске структуре у Мо/МФ тиме и облика ћелије, интеракцију са ендотелним ћелијама крвних судова, трансендотелну миграцију у ткиво, као и разградњу ЕСМ до стизања на место инфламације (Wiesner и сар., 2014).

Пре него што почну да се крећу, у МФ долази до поларизације и издуживања цитоскелетних протеина. Уколико се издуживање онемогући, тј. динамичност цитоскелета, могло би да ограничи покретљивост ових ћелија. Покретљивост МФ је омогућена експресијом адекватних адхезивних и цитоскелетних протеина, а остварује се ослањањем на подозоме (Слика 1.5). Међу адхезивне молекуле неопходне за екстравазацију и трансендотелну миграцију спадају: гликопротеински лиганд-1 за П-селектин (PSGL-1, од енгл. *P-selectin Glycoprotein Ligand-1*) у фази котрљајуће адхезије, интегрини у фази адхезије и адхезивни молекул тромбоцита за ендотелне ћелије (PECAM-1, од енгл. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) у фази трансмиграције.

На адекватан стимулус, МФ разграђују ECM и тиме ослобађају пут за своје кретање у ткиву (*Pixley u cap., 2012*). Ове ћелије су и главни извор протеолитичких ензима који учествују у реорганизацији ECM, као што су: катепсини, хијалуронидазе, хепараназе, еластазе, а превасходно урокиназни тип активатора плазминогена (uPA) и матриксне металопроотеиназе (MMP), укључујући MMP9 (*Liguori u cap., 2011*).



Слика 1.5. Модели МФ миграције.

МФ мигрирају по дводимензионалним (2D) структурама као што је једнослојни ендотел крвних судова и кроз тродимензионалне (3D) структуре као што су ECM међућелијског простора или базална мембрана. При том примењују барем два основна, а различита модела кретања: амебоидну и мезенхималну миграцију. Амебоидну миграцију одликују: сферичан облик ћелије са малим бројем наставка, актинско-миозинска контракција, адхезија независна од интегрина и одсуство протеолитичке активности. Мезенхимну миграцију одликују: издужен облик ћелије са дугачким наставцима, неопходност адхезије за ECM и протеолитичка разградња компоненти ECM.

(Преузето из *Wiesner u cap., 2014.*)

1.4.1. MMP-9

Матриксне металопротеиназе (ММП) чини фамилија од преко 20 Zn-зависних ендопептидаза, солубилних или мембранских. Активност ових ензима се регулише на више нивоа укључујући епигенетски, транскрипциони (деловањем AP-1 и NFκB), постраслациони и, након синтезе и продукције, у интеракцији са инхибиторима (*Page-McCaw, 2007*). Синтетишу се у форми зимогена, тј. као про-ММП, а секретују у комплексу са својим инхибиторима. Првобитно је показано да могу да разграде скоро све компоненте ЕСМ. Данас се зна да имају утицај и на ванћелијске, перичелуларне и унутарћелијске протеине и сигналне путеве, који остварују активацијом или инактивацијом других протеаза, инхибитора протеаза, фактора раста, цитокина, хемокина, површинских рецептора и унутарћелијских протеина (*Farina u cap., 2014*)

ММП-9 је важан за МФ јер учествује у различитим аспектима њихове активности, почевши од екстравазације и трансендотелне миграције. Продукцију MMP9 индукују бројни проинфламацијски цитокини, док анти-инфламацијски цитокини стимулишу продукцију њихових инхибитора. Специфичан инхибитор MMP9 је ткивни инхибитор металопротеиназе 1 TIMP-1 (*од енгл. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1*). У различитим ћелијама различити MAPK сигнали индукују експресију MMP9 (*Farina u cap., 2014*).

Открићем да присуство MMP-9 (желатиназа Б) корелира са метастазирањем малигних ћелија, порасло је интересовање за њихове улоге у физиолошком и патолошком стању (*Farina u cap., 2014*). Првобитно детектовани супстрати MMP-9 су желатин, колаген, еластин и ламинин. Њихова разградња има има значај у ремоделовању ткива (*Lee u cap., 2009*). На пример, разградња ламинина отвара базалне мембране, ремети структуру ткива и индукује апоптозу (*Farina u cap., 2014*). Списак супстрата MMP-9 се захваљујући савременим техникама значајно проширила. Међу њима су нпр. кристалин, тубулин и актин, али се поставља питање који су међу њима заиста биолошки релевантни (*Vandooren u cap., 2013*). Испитивања биолошке улоге MMP-9 су посебно значајна у области инфламације и тумора (*López-Otín u cap., 2009; Krstic u Santibanez, 2014*).

За правилан ток имунског одговора неопходна је прецизна регулација активности металопротеиназа, као и њихових инхибитора. У случају њене дерегулације може да дође до поремећаја физиолошког тока имунског одговора, као и настанка патолошких стања. На пример, у туморима је однос између зимогена и активних ензима, са једне стране, и њихових инхибитора, са друге, поремећен је у смеру повишене ензимске активности. MMP-9 има утицаја у свим фазама настанка и развоја тумора: од иницијације и ране прогресије, кроз деградацију матрикса и ангиогенезу, до инвазије и покретљивости, дисеминације и утврђивања метастаза, а може бити од користи и у дијагностици (*Krstic и Santibanez, 2014*).

Познато је да LPS у МФ стимулише експресију MMP9 (*Woo и сар. 2004; Hald и сар., 2012*). Такође је показано да TGF- β регулише MMP9 у МФ (*Xie и сар., 1994; Jeon и сар., 2007*), али је недовољно познат сигнални пут којим се то остварује у овим ћелијама.

1.4.2. uPA

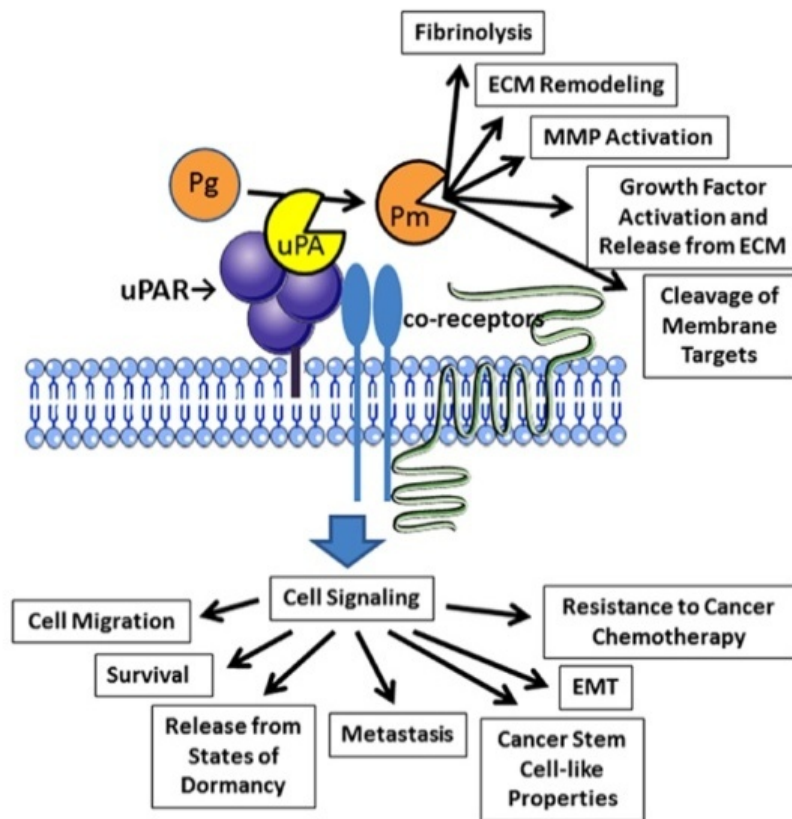
Урокиназа, или урокиназни тип активатора плазминогена (uPA, од енгл. *Urokinase Type Plasminogen Activator*), је протеолитички гликопротеин. Једна од најпознатијих улога му је превођење неактивног плазминогена у плазмин, серинску протеазу која разграђује фибрин и друге компоненте ЕСМ. Урокиназни систем, поред uPA и његовог супстрата, плазминогена, укључује и урокиназни рецептор, uPAR (од енгл. *Urokinase Type Plasminogen Activator Receptor*), као и инхибиторе, PAI-1 и PAI-2 (од енгл. *Plasminogen Activator Inhibitor-1*). Молекул uPA има три функционално независна дела: аминок-терминални домен којим интерагује са uPAR, „kringle” домен укључен у интрацелуларну сигнализацију и индукцију ћелијске адхезије и миграције, и каталитички домен на С-терминалном крају (*Santibanez, 2013*).

Овај ензим се лучи у неактивној форми, а активира се везивањем за uPAR. Комплекс uPA/uPAR интензивно продукује плазмин, који остаје на ћелијској мембрани и ту учествује у активацији зимогена урокиназе (*Ellis, 1996*). Ова позитивна повратна спрега може да произведе велику количину активног

плазмина и uPA на површини ћелије (*Gonias u Hu, 2015*). Овим се остварује предуслов за интензивну перичелуларну протеолизу ЕСМ.

Експресија uPA у Мо расте током њихове диференцијације у МФ и, у поређењу са осталим леукоцитима, у МФ достиже највише вредности (*Fleetwood u cap., 2014*). TGF- β регулише експресију uPA у многим ћелијама (*Santibanez, 2013*). У здравим ћелијама експресија uPAR је ограничена. Увећава се у појединим околностима: током усађивања ембриона у ендометријум и формирања плаценте, као и током процеса инфламације; у диференцијацији и активацији леукоцита, ендотелним ћелијама, ћелијама глатке мускулатуре, и мигрирајућим кератиноцитима (*Gonias u Hu, 2015; Mazar, 2008; Smith u Marshall, 2010; Noh u cap., 2013*). У *in vitro* експериментима са ћелијским линијама гајеним на витронектину, показано је да експресија uPAR изазива морфолошке промене, тачније формирање изразито дугих наставака као што је показано у НЕК-293 ћелијама бубрега трансфектованим uPAR векторима (*Jo u cap., 2009*).

Урокиназа и њен рецептор су и сигнални молекули. uPA учествује у венћелијској сигнализацији активирањем плазмина који има бројне лиганде у међућелијском простору као што су металопроотеиназе и фактори раста, које плазмин (као и MMP) ослобађа из латентног стања разградњом везе коју имају са протеинима ЕСМ. У унутарћелијској сигнализацији учествује кроз интеракцију са својим рецептором. uPAR нема трансмембрански домен, али остваривањем физичке везе са интегринима учествује у састављању сигналних комплекса и дефинисању интрацелуларних сигнала који регулишу процесе ћелијске адхезије, миграције и пролиферације (*Koshelnick u cap., 1997; Nguyen u cap., 2000; Gonias u Hu, 2015*) (Слика 1.6.).



Слика 1.6. Улоге uPA система (преузето из *Gonias u Hu, 2015*).

uPAR има посебно место везивања за витронектин. Истовремено везивање витронектина за интегрин и uPAR значајно је за адхезију различитих типова ћелија (*Noh u cap., 2013*). Процес интензивира везивање uPA за uPAR. Формирање овог комплекса активира унутарћелијску сигнализацију која покреће формирање ћелијских наставака којима се остварује миграција, подозома. У дводимензионалном кретању, као што је кретање МФ по базалној мембрани или ендотелним ћелијама, МФ формирају тачкасте подозоме са комплексном протеинском структуром богатом актином. PAI-1, осим што је специфичан инхибитор урокиназе, везује се за витронектин на месту које се преклапа са местима везивања uPAR и интегрин. Компетиција PAI-1 за витронектин уклања витронектин из комплекса, чиме слаби адхезија ћелије за подлогу и она постаје слободна да се покрене (*Wiesner u cap., 2014*).

У тродимензионалном кретању МФ кроз матрикс, адхезија и протеолитичка разградња ЕСМ су нераздвајни процеси и обе ове функције извршавају подозоми. За покретање ћелија, неопходно је прекидање међућелијских веза, као и веза са матриксом, што се постиже перичелуларном разградњом ЕСМ која се одржава захваљујући позитивној повратној спречи узајамног дејства uPA и плазмина на површини ћелије. Усмерено кретање тродимензионалних подозома омогућава концентрисање uPA/uPAR комплекса на његовом водећем делу (*Santibanez, 2013; Wiesner u cap., 2014*). Овакво кретање је неопходно МФ током нпр. инфламације.

Током инфламације, повећана пропустљивост крвних судова омогућава екстравазацију протеина плазме, укључујући фибриноген и друге протеине система хемостазе (коагулацијске и фибринолитичке протеазе) који се активирају и доводе до накупљања нерастворљивог фибрина који служи као потка по којој расту и мигрирају инфламацијске и стромалне ћелије (*Schuliga, 2015*). Разградњом фибрина, као и активацијом инфламацијских и стромалних ћелија, плазмин игра важну улогу у фази резолуције инфламације и ремоделовању ткива. Приликом кретања кроз ткивни матрикс, uPA појачава адхезију МФ за ЕСМ у фази резолуције и тиме продужава време задржавања ћелије, током којег има могућност да активацијом плазминогена, директно или индиректно разгради компоненте ЕСМ и тако омогући кретање МФ кроз ткиво и остваривање улоге у обнављању ткива (*Fleetwood u cap., 2014*).

Накупљање фибрина у ткиву је одлика многих инфламацијских болести и тумора (*Schuliga, 2015*). Малигне ћелије са високим миграторним капацитетом одликује висока експресија uPAR, често и амплификација његовог гена. Висока експресија uPAR у многим туморима је уско везана за лошу прогнозу, без обзира да ли је испољена у малигним или стромалним ћелијама (*Duffy, 2002*).

Иако је познато да TGF- β регулише експресију uPA у МФ (*Falcone u cap., 1993; Falcone u cap., 1995; Hildenbrand u cap., 1998*), недовољно је познат сигнални пут којим се то остварује. Такође, утицај LPS-ом стимулисане МФ на uPA је нејасан, јер су објављени резултати који показују како стимулаторни, тако и инхибиторни ефекат на његову експресију (*Hald u cap., 2012*).

1.5. Макрофагне ћелијске линије

У истраживањима МФ често се користе ћелијске линије као *in vitro* модели за испитивање ефеката различитих супстанци и лекова на њихову функцију, поларизацију и генску експресију. Неки од најзначајнијих Мо/МФ ћелијских линија су THP1 и U937 пореклом од човека (*Auwerx, 1991; Passmore u cap., 2001*), док су међу мишјим Мо/МФ ћелијским линијама највише у употреби RAW 264.7, IC-21 и J744A.1 (*Crawford u cap., 1990; Hartley u cap., 2008; Rama u cap., 2011*).

1.5.1. RAW 264.7 ћелијска линија

RAW 264.7 је Мо/МФ ћелијска линија, изолована 1978. године из асцита тумора индукованог инфекцијом мишева соја BALB/c Абелсоновим вирусом леукемије мишева (A-MuLV) и Молонијевим вирусом леукемије мишева (Mo-MuLV) као помоћним вирусом (*Raschke u cap., 1978*).

RAW 264.7 је најчешће коришћена ћелијска линија у медицинским истраживањима. Због једноставног умножавања и одржавања, високе ефикасности ДНК трансфекције, осетљивости на РНК интерференцу, поседовања рецептора за многе релевантне лиганде, Алијанса за ћелијску сигнализацију ју је одабрала да буде главни експериментални систем за сложену студију сигналних путева (*Hartley u cap., 2008*).

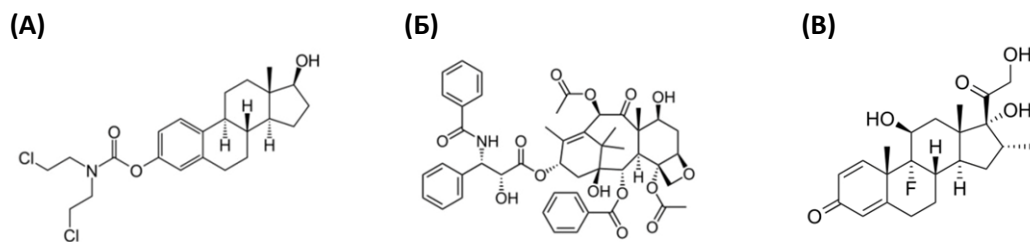
Коришћењем одговарајућих цитокина ове ћелије могу да усмере ка M1 или M2 функционалном фенотипу. Експериментални подаци потврђују да је RAW 264.7 одговарајући модел за испитивање биологије МФ и TAM *in vitro* и *in vivo*. Кондициони медијум ових ћелија индукује ћелијску миграцију, инвазију и метастазу ћелијске линије рака дебелог црева CT26 *in vitro* и *in vivo* (*Green u cap., 2009*). Такође, M2 функционални фенотип RAW 264.7 ћелија је био довољан да подстакне раст и метастазирање примарног Левисовог карцинома плућа у мишевима (*Zhang u cap., 2009*).

1.6. Лекови који делују на микротубуле и глукокортикоиди

Микротубуле су компоненте цитоскелета важне за одржавање ћелијског облика, поларизацију и миграцију ћелија, ћелијски транспорт вакуола, формирање митотских влакана, ћелијску деобу и сигнализацију (*de Forges u cap., 2012*). Имају структуру шупљих цеви састављених од протофиламената формианих од хетеродимерних $\alpha\beta$ -тубулинских јединца. Полимеризација микротубула почиње од органела које се зову центрозоми и делују као нуклеарни центри и организатори микротубуларног цитоскелета. Ту се налази минус крај, док плус крај поларизоване структуре микротубула расте ка периферији ћелије. Плус крајеви су врло динамични: пролазе кроз фазе раста, мировања и скраћивања. Ови процеси се означавају као динамичка нестабилност.

У терапији канцера се користе лекови који ометају овај динамичан процес у циљу заустављања раста туморских ћелија. Међутим, механизам њиховог деловања није у потпуности познат, и новија истраживања указују на додатне аспекте њиховог антитуморског, али и антиинфламаторног деловања (*Javeed u cap., 2009; Zhang u cap., 2014*). Антимикротубулински агенси, попут таксоида и естрамустина, спадају међу успешније хемиотерапеутике, који се већ деценијама користе у клиничкој пракси, као индивидуална или комбинована терапија, у лечењу више врста тумора (*Speicher u cap., 1992; Crown u cap., 2004; Dahmani u cap., 2010; Ravery u cap., 2011*).

С друге стране, са све већим препознавањем значаја инфламацијске микросредине у патогенези тумора, неки од добро познатих анти-инфламацијских лекова, попут глукокортикоида, такође проналазе нове модалитете примене у антитуморској терапији (*Koutsilieris u cap., 2006; Kassi u Moutsatsou, 2011*).



Слика 1.7. Хемијска структура естрамустина (А) и паклитаксела (Б) и дексаметазона (В).

1.6.1. Естрамустин

Естрамустин (ЕМ) је конјугат азотног иперита и естрадиол-17 β -фосфата (слика 1.7. А) и користи се као хемиотерапеутик, сам или у комбинацији са другим агенсима, код више врста тумора, а пре свега за лечење узнапредовалог карцинома простате отпорног на хормонску терапију, као и карцинома дојке (Dahmani *u cap.*, 2010; Ravery *u cap.*, 2011). У облику фосфата (EP) се примењује пероралним путем, пошто је у тој форми растворљивији, мада неактиван. Активира се дефосфорилацијом убрзо након апсорпције. Иако је иницијално осмишљен као алкилирајући агенс који својом естрадиолном компонентом циљано усмерава азотни иперит ка ћелијама карцинома дојке, испоставило се да је његов механизам деловања потпуно другачији. Естрамустин омета полимеризацију микротубула, као и ћелијске функције посредоване микротубуларним протеинима (MAP, од енгл. *Microtubule-Associated Proteines*). Нековалентним везивањем за MAP, ЕМ спречава полимеризацију микротубула или доводи до њихове деполимеризације. Поред тога, ЕМ супримира динамичку нестабилност појединачних микротубула које нису везане за MAP, доводећи до њихове кинетичке стабилизације, што такође омета нормалну функцију цитоскелета доводећи до абнормалности деобног вретена и застоја у митози. У вишим концентрацијама ЕМ омета интеракцију микротубула са кинетофорама, активирајући на тај начин контролну тачку деобног вретена што доводи до апоптозе ћелије (Mohan *u Panda*, 2008). Подаци о дејству на макрофаге су оскудни и углавном се односе на њихову смањену фагоцитну способност (Bjermer *u cap.*, 1988).

1.6.2. Паклитаксел

Паклитаксел (*Taxol*, *Tax*) је антитуморски лек који се користи, самостално или у комбинацији са другим антитуморским агенсима, у терапији више тумора, попут карцинома дојке, јајника, простате (*Speicher u cap., 1992; Crown u cap., 2004*). Припада групи таксоида (заједно са доцетакселом), алкалоида из биљке *Taxus brevifolia* (кратколисна тиса). Има комплексну дитерпенску структуру са таксенским прстеном са четворочланим оксетанским прстеном и естарским бочним ланцем на позицији C13 (**Слика 1.7. Б**). Главни механизам дејства паклитаксела је блокада пролиферације ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса стабилизујући микротубуле, чинећи на тај начин цитоскелет превише ригидним и нединамичним, што онемогућава нормалну митозу (*Horwitz, 1994; Eisenhauer u Vermorken, 1998*). Међутим, фармаколошки ефекти *Tax* варирају у зависности од ћелијске линије на којој су његови ефекти истраживани, релативне количине различитих изотипова β -тубулина, дозе и терапијског протокола (*Polioudaki u cap., 2009*). У наномоларним концентрацијама, *Tax* доводи до застоја у митози, до промене у организацији једарне мембране и нуклео-цитоплазматског транспорта кроз комплекс нуклеарних пора и коначно доводи до апоптозе. У микромоларним концентрацијама, поред застоја у митози и оштећења једарне мембране, *Tax* доводи до полимеризације микротубула и повећања њихове масе. Невезано за утицај на цитоскелет, показано је да *Tax* стимулише синтезу и секрецију цитокина и индукује експресију више гена везаних за инфламацијски одговор, ћелијску пролиферацију, апоптозу и анти-туморско деловање (*Bogdan u Ding, 1992; Moos u Fitzpatrick, 1998*). Има индикација да овај лек утиче на функционални фенотип макрофага, стимулишући M1 функционалну трансформацију, миграцију и продукцију NO (*Liu u cap., 2010; Zhang u cap., 2014*).

Имајући у виду улогу цитоскелета и мреже микротубула у ћелијској архитектури, а посебно функцију микротубуларних протеина у транспорту и секрецији протеина, од интереса је испитати ефекте анти-микротубуларних лекова на секрецију протеаза ванћелијског матрикса, као и инвазивни и миграторни потенцијал третираних макрофага.

1.6.3. Дексаметазон

Дексаметазон (Dex) је лек стероидне структуре и припада групи глукостероида (ГК) (Слика 1.7. В). Захваљујући својој липофилној структури и ниској молекулској маси, ГК са лакоћом дифундују кроз ћелијску мембрану и везују се за глукостероидне рецепторе у цитосолу (ГКР). Ови рецептори се у цитоплазми налазе у својој неактивној форми у комплексу са бројним протеинима: шаперонима, као и неким од киназа, попут Src киназе. Везивањем ГК за свој рецептор, сви ови пратећи молекули се ослобађају, омогућавајући транслокацију комплекса ГК/ГКР у једро где ГК директно, позитивно или негативно, модулише транскрипцију циљних гена везујући се за специфичне промоторне елементе – тзв. GRE (од енгл. *Glucocorticoid Response Elements*). Овај комплекс ГК/ГКР такође може да антагонизује активност других транскрипционих фактора, укључујући NFκB, AP-1 и NFAT (од енгл. *Nuclear Factor of Activated T-Cells*), директно, путем везивања за сам фактор, или индиректно, путем конкуренције за нуклеарне коактиваторе или индукцијом транскрипције и синтезе инхибитора (нпр. IκB) транскрипционих фактора. Поред ових активности на геномском нивоу, ГК имају и непосредније ефекте. Ови негеномски ефекти се остварују углавном путем функција протеина ослобођених након везивања ГК за цитоплазматски рецептор, или везивањем за мембрански ГКР, или као последица физичко-хемијске интеракције са мембранама ћелије и утицаја на њихову пропустљивост (*Almawi u Melemedjian, 2002; Buttgerit u cap. 2005*).

Путем наведених механизма ГК испољавају невероватан распон имуносупресивних и анти-инфламацијских ефеката, делујући на практично све ћелије укључене у инфламацијски одговор (циркулишуће леукоците, МФ, ендотелне ћелије, фибробласте). Неки од најзначајнијих анти-инфламацијских ефеката ГК су смањење броја циркулишућих леукоцита и њиховог приступа месту инфламације (инхибиција експресије адхезивних молекула, смањење пермеабилности васкуларног ендотела), инхибиција продукције цитокина и других инфламацијских медијатора (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α, простагландини), смањење пролиферације фибробласта и др. (*Buttgerit u cap. 2005*). Све ово чини ГК тренутно најефикаснијим и најприступачнијим анти-инфламацијским и

имуномодулаторним лековима. Нажалост, употреба ових лекова је праћена је бројним нежељеним ефектима, као и развојем резистенције.

ГК се, као помоћна или главна терапијска средства, користе и у терапији тумора (*Kaal u Vecht, 2004; Kassi u Moutsatsou, 2011; Torimoto u cap., 2015; Jackson u cap., 2016*). Иако се често користе као помоћни лекови, у циљу смањења нежељених ефеката хемио- и/или радиотерапије, или сузбијања пратећих ефеката раста тумора, ГК имају и дирекне анти-туморске ефекте делујући на бројне регулаторне молекуле укључене у ћелијски циклус, апоптозу, трансформацију, ангиогенезу, инвазивност и др. кључне аспекте развоја тумора (*Kassi u Moutsatsou, 2011*).

Такође, показано је да дексаметазон инхибира експресију uPA у хуманим ћелијама карцинома простате и тиме смањује њихов метастатски капацитет (*Reyes-Moreno u cap., 1995*). Сличан ефекат на продукцију uPA (али и друге протеазе) дексаметазон и други ГК остварују и у контакту са разним другим ћелијама канцера (карцином дојке, фибросарком, промијелоцитна леукемија, сквамозелуларни карцином), као и у МФ (*Medcalf u cap., 1986; Busso u cap., 1987; Mustjoki u cap., 1998; Verpu u cap. 2002; Saksela u cap., 1985; Kung u Lau, 1993*).

У МФ ГК снажно супримирају експресију GM-CSF, TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, COX2, iNOS, uPA и др. (*Buttgereit u cap. 2005; Kung u Lau, 1993*). ГК усмеравају МФ ка M2 функционалном фенотипу и то донекле различитом у односу на онај индукован IL-4 (*Martinez u Gordon, 2014*). Механизам деловања ГК на продукцију uPA у МФ није до краја расветљен, те је од посебног значаја испитати ефекте и механизме деловања Dex на ову продукцију у контексту различитих стадијума инфламацијског одговора.

2. Циљеви истраживања

Улога кључних фактора индукције инфламације (LPS и IFN- γ) и фактора укључених у резолуцију инфламације (TGF- β и IL-4) на продукцију протеаза ванћелијског матрикса, MMP9 и uPA, у мишјим макрофагима је до сада само делимично истражена. Наиме, познато је да приликом покретања инфламације LPS у макрофагима стимулише експресију и секрецију MMP9, ензима кључног за деградацију ванћелијског матрикса, док TGF- β стимулише uPA, који је укључен у обнављање и ремоделовање ткива у фази резолуције. Из тога се може претпоставити да се у макрофагима MMP9 и uPA узајамно реципрочно експримирају и секретују, зависно од тога да ли су макрофаге стимулисане факторима који покрећу инфламацију или доводе до њене резолуције.

Истраживања у оквиру ове дисертације биће усмерена на испитивање утицаја кључних про- и анти-инфламацијских фактора (LPS и IFN- γ односно TGF- β и IL-4), као главних детерминанти функционалне поларизације (M1 и M2) макрофага, на макрофагну експресију ензима MMP9 и uPA који одређују ток реорганизације ванћелијског матрикса у инфламацији, као и путеве сигналне трансдукције којима се утицај ових фактора остварује.

Антитуморски лекови који утичу на микротубуларни апарат, попут естрамустина и паклитаксела, и анти-инфламацијски лекови, као што је дексаметазон, могу имати значајан утицај на функцију макрофага у туморима. Имајући у виду значај макрофага и инфламације у биологији тумора, као и функцију микротубуларног система у секрецији протеина и миграцији ћелија, од значаја је испитати ефекат фармаколошке модулације овим лековима на продукцију протеаза ванћелијског матрикса и миграцијски потенцијал макрофага.

Полазећи од наведеног, циљ је био да се испита утицај кључних про- и анти-инфламацијских фактора на макрофагну експресију ензима MMP9 и uPA који одређују ток реорганизације ванћелијског матрикса у инфламацији, као и могући путеви сигналне трансдукције којим се утицај ових фактора остварује. У реализацији постављеног циља, истраживања у овој дисертацији су подељена у неколико целина:

1. Испитивање утицаја LPS на продукцију uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.
2. Испитивање утицаја TGF- β на продукцију MMP9 и uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.
3. Испитивање маркера функционалне диференцијације макрофага у M1 или M2 тип након третмана LPS и IFN- γ или IL-4.
4. Испитивање утицаја IFN- γ и IL-4 на продукцију MMP9 и uPA у макрофагима.
5. Испитивање ефекта антитуморских лекова паклитаксела и естрамустин фосфата на миграторни потенцијал и продукцију uPA у TGF- β стимулираним макрофагима.
6. Испитивање ефекта дексаметазона на продукцију uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.

3. Материјал и методе

3.1. МАТЕРИЈАЛ

3.1.1. Медијуми

За култивацију RAW264.7 и ћелија косне сржи мишева коришћен је RPMI-1640 медијум (*Roswell Park Memorial Institute, RPMI*) (*Sigma-Aldrich, САД*) обогаћен 10% феталним серумом говечета (FCS, од енгл. *Foetal Calf Serum, Gibco, Life Technologies, САД*), са додатком 100 јединица/ml (U/ml) пеницилина и стрептомицина (финално 1% P/S) (*Gibco, Life Technologies, САД*), на температури од 37°C, у атмосфери са 5% CO₂ и 100% влажности. Овоје састав стандардног, хранљивог медијума који је коришћен за раст поменутих ћелија и поједине експерименте или њихове фазе.

L929 мишја ћелијска линија култивисана је у DMEM ћелијском медијуму (од енгл. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, САД*) са 5% FCS и 1% P/S. Коришћена је за производњу кондиционог медијума. Након 6 дана култивације у инкубатору за гајење ћелија (5% CO₂, 37°C), L929 ћелије су обогатиле почетни медијум високим саджајем M-CSF, фактором за диференцијацију прекурсора макрофага из косне сржи мишева у макрофаге. Овако добијени медијум је замрзнут на -20°C и по потреби коришћен као 20% кондициони медијум.

3.1.2. Антитела и реагенси

Подаци о примарним и секундарним антителима примењеним у експериментима приказани су у **Табели 3.1**. Подаци о примењеним цитокинима, фармаколошким инхибиторима сигналне трансдукције, лековима и ензимским супстратима приказани су у **Табели 3.2**.

Табела 3.1. Примарна и секундарна антитела примењена у експериментима (WB, Western blot; IF, имунофлуоресцентно обележавање; TRIC, тетраметилродамин изотиоцијанат; FITC, флуоресцеин изотиоцијанат).

Антиген	Порекло	Метод	Разблажење	Произвођач
ПРИМАРНА АНТИТЕЛА				
pSmad2	зечије	WB	1 : 1000	CalbioChem, Немачка
pSmad3	зечије	WB, IF	1 : 1000	CalbioChem, Немачка
Smad2,3	зечије	WB	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, САД
pERK1,2	зечије	WB	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, САД R&D Systems, САД
pERK1,2	мишје	WB	1 : 1000	BD Biosciences, R&D Systems, САД
ERK1,2	зечије	WB	1 : 1000	R&D Systems, САД
pp38	зечије	WB	1 : 1000	R&D Systems, САД
p38	зечије	WB	1 : 1000	R&D Systems, САД
pJNK	зечије	WB	1 : 1000	R&D Systems, САД
JNK	зечије	WB	1 : 1000	R&D Systems, САД
p50	зечије	WB	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, САД
p65	козје	WB	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology, САД
iNOS	мишје	WB	1 : 1000	BD Translab Inc.
аргиназа 1	зечије	WB	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, САД
актин	зечије	WB	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, САД
тубулин	мишје	WB, IF	1 : 1000	Sigma-Aldrich, САД
хистон (H2B)	козије	WB	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology, САД
СЕКУНДАРНА АНТИТЕЛА				
HRP коњуговано анти-зечије	козје	WB	1 : 1000	Sigma-Aldrich, САД
HRP коњуговано анти-зечије	козје	WB	1 : 7000	Santa Cruz Biotechnology, САД
HRP коњуговано анти-зечије	овчије	WB	1 : 1000	Rockland
HRP коњуговано анти-мишје	козје	WB	1 : 1000	Pierce Biotechnology
TRIC коњуговано анти-мишје	мишје	IF	1 : 1000	Sigma-Aldrich, САД
FITC коњуговано анти-мишје	зечије	IF	1 : 1000	Sigma-Aldrich, САД

Табела 3.2. Цитокини, инхибитори сигналне трансдукције, лекови и ензимски супстрати примењени у експериментима.

Назив	Разблажење	Опис	Произвођач
ЦИТОКИНИ			
LPS	100 ng/ml	из <i>Escherichia coli</i>	Sigma Aldrich, САД
IFN- γ	20 ng/ml	рекомбиновани мишји IFN- γ	R&D Systems, САД
rh TGF β 1	5 ng/ml	рекомбиновани хумани TGF β 1	R&D Systems, САД
IL-4	20 ng/ml	рекомбиновани мишји IL-4	R&D Systems, САД
ИНХИБИТОРИ СИГНАЛНИХ МОЛЕКУЛА			
SB-505124	1 μ M	инхибира ALK5	Sigma Aldrich, САД
SiS3	2.5 μ M	инхибира Smad3	Sigma Aldrich, САД
PD-98059	50 μ M	инхибира ERK1/2	Calbiochem, Немачка
SB-203580	10 μ M	инхибира p38	Calbiochem, Немачка
SP-600125	10 μ M	инхибира JNK1/2	Calbiochem, Немачка
JSH-23	5 μ M	инхибира NF κ B	Calbiochem, Немачка
ЛЕКОВИ			
Естрамустин фосфат	5 μ M	анти-туморски лек	Sigma Aldrich, САД
Паклитаксел	1 μ g/ml	анти-туморски лек	Calbiochem, Немачка
Дексаметазон	0.5 μ g/ml	анти-инфламаторни лек	Sigma Aldrich, САД
ЕНЗИМСКИ СУПСТРАТИ			
плазминоген	1:1000	про-ензим	Sigma Aldrich, САД
казеин	0.5%	протеин	Торлак, Србија
желатин	2%	протеин	Торлак, Србија

3.1.3. Ћелијске линије

3.1.3.1. RAW 264.7 ћелијска линија

RAW264.7 је моноцитно/макрофагна ћелијска линија, изолована 1978. године из асцита тумора мишева соја BALB/с индукованог инфекцијом Абелсоновим вирусом леукемије мишева (A-MuLV) и Молонијевим вирусом леукемије мишева (Mo-MuLV) као помоћним вирусом (*Raschke et al., 1978*). Произведена је у American Type Culture Collection (*ATCC, Rockville, MD, САД*), а до нас је стигла љубазношћу др Carmelo Bernabeu, CIB/CSIC, Шпанија.

Ћелије су култивисане у RPMI-1640 медијуму са 10% FCS и 1% P/S, на температури од 37°C, у влажној атмосфери са 5% CO₂. Залеђиване су по 1-2 милиона ћелија у 1ml медијума за залеђивање (10% DMSO, 90% FBS), постепено, прво 60 до 120 минута на -20°C, а потом чуване до употребе на -70°C. Одлеђиване су брзо на собној температури, ресуспендоване и испране у RPMI-1640 медијуму са 10% FCS и 1% P/S.

3.1.3.2. L929 ћелијска линија

L929 је ћелијска линија фибробласта изолована из масног ткива мужјака миша соја СЗН/Ап. Добијена је љубазношћу др Татјане Срдић из Института за онкологију и радиологију Србије, Београд, Србија. Коришћена је за добијање кондиционог медијума за диференцијацију макрофагних прекурсора косне сржи мишева у макрофаге.

3.1.4. Мишји макрофаги

Макрофази су изоловани из мужјака мишева инбредног ЦБА (СВА/Н) соја, старости 6 до 8 недеља. Након цервикалне дислокације, мишевима су извађене тибиге и фемури чије су костне сржи изоловане испирањем стандардним медијумом за култивацију ћелија. Испитивања су вршена на ћелијама изолованим из косне сржи нетретираних животиња, чија је диференцијација у макрофаге

индукована култивацијом од 6 дана у 20% кондиционом медијуму L929 ћелија, а затим су ћелије теретиране према текућем експерименталном дизајну.

Животиње су узгајане у виваријуму Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду (ИМИ). Са експерименталним протоколом се сагласила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, а Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије – Управа за ветерину је издало решење о одобрењу спровођења тражених огледа број 323-07-06070/2015-05/1.

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН

Истраживање је спроведено *in vitro* на моноцитно-макрофагној ћелијској линији RAW 264.7, која је један од најбољих модела за испитивање биологије макрофага.

Утицај LPS и TGF- β на:

- преживљавање макрофага утврђен је МТТ тестом,
- активацију макрофага утврђен је одређивањем продукције NO Грисовом реакцијом,
- експресија гена uPA и MMP9 у макрофагима анализирана је RT-PCR методом,
- активност секретованих uPA и MMP9 анализирана је зимографијом.

Утицај IFN- γ у садејству са LPS и IL-4 на продукцију uPA и MMP9 анализиран је зимографијом.

Диференцијација RAW264.7 ћелија у M1 или M2 функционални фенотип, након третмана одговарајућим факторима, праћена је кроз експресију проинфламацијског маркера iNOS и анти-инфламацијског маркера аргиназе-1, применом Western blot методе.

Учешће сигналних путева MAPK у трансдукцији LPS сигнала, и Smad, MAPK и NF κ B у трансдукцији TGF- β сигнала у макрофагима испитано је Western blot анализом фосфорилације и експресије наведених сигналних молекула, а

њихову улогу у ефектима LPS и TGF- β на макрофаге анализом дејства одговарајућих инхибитора сигналних путева на експресију и активност протеаза RT-PCR методом, одн. зимографијом.

У циљу испитивања директне укључености појединих сигналних молекула у трансдукцију сигнала, коришћени су луциферазни репортер-плазмиди за: p38 (Gal4-CHOP), ERK1/2 (Gal4-ELk1) и JNK1/2 (Gal4-cJun) котрасфектовани са pFr5-luc репортер-плазмидом, а за Smad3 (CAGAC-luc) и за NF κ B (Kfb-luc). За све њих коришћен је SV40- β -Gal као позитивна контрола ефикасности трансфекције.

Ефекат лекова на покретљивост макрофага тестиран је помоћу следећих метода:

- миграциони потенцијал макрофага *in vitro* тестом зарастања ране,
- миграциони капацитет ћелија миграционим есејем са Бојденовом комором (*Boyden chamber-based cell migration assay (Costar, Cambridge MA)*).

Као примарни макрофаги коришћени су макрофаги пореклом из косне сржи мишева *CBA* соја које смо такође испитивали у *in vitro* условима. МФ су одговарајућим факторима усмеравани ка M1 функционалном фенотипу (LPS, 0.1 μ g/ml, и IFN- γ , 20 μ g/ml) или M2 функционалном фенотипу (TGF- β , 5ng/ml, и IL-4 20 μ g/ml), што је проверено Грисовом реакцијом и Western blot анализом присуства повећане продукције NO као проинфламацијског маркера, одн. iNOS протеина, и анти-инфламацијског маркера, аргиназе-1, у третираним ћелијама. Продукција uPA и MMP-9, у овако поларизованим ћелијама, утврђена је зимографијом.

3.3. МЕТОДЕ

3.3.1. Анализа ћелијских функција

3.3.1.1. Анализа пролиферације ћелија применом МТТ теста

Тест је заснован на реакцији редукције тетразолијумске соли (диметилтиазолдифенил тетразолиум бромид, МТТ) која се одвија у митохондријама дејством NAD(P)H-зависних ћелијских оксидоредуктаза, при чему долази до цепања тетразолијумског прстена и појаве формазана карактеристичне боје. МТТ могу да редукују само активне митохондрије живих ћелија, због чега је овај тест погодан за мерење броја вијабилних ћелија и пролиферације.

Степен пролиферације ћелија анализиран је МТТ тестом. У плоче са 96 бунара засејавано је по 5×10^3 RAW264.7 ћелија у 100 μ l стандардног медијума по бунару. Наредног дана започео је ћелијски третман са TGF β (5ng/ml), EP (5 μ M), одн. Tax (1 μ g/ml). Након три дана ћелијама је додаван МТТ (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil tetrazolium bromid, Sigma Aldrich, САД) у концентрацији од 0.5 mg/ml. Ћелије су даље инкубиране 2 сата на 37°C, у стандардним условима (атмосфера са 5% CO₂ и 100% влажности), након чега су се формирали кристали формазана, који су растворени додавањем мешавине диметилсулфооксида (DMSO) и изопропанола у односу 2:3. Након инкубације од 15 минута на мешалици, на собној температури, мерена је оптичка густина у аутоматском читачу за микротитарске плоче (Labsystems Multiskan PLUS, Финска) на 540 nm унутар сат времена од завршетка реакције.

3.3.1.2. Испитивање пролиферације МФ применом CFSE

Утицај одговарајућих фактора (TGF β , EP, Tax) на пролиферацију RAW264.7 ћелија анализиран је коришћењем теста дилуције флуоресцентне боје, карбоксифлуоресцеин сукцинимидил естра (CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Sigma Aldrich, САД), на проточном цитометру. Тест је заснован на прогресивном смањењу количине флуоресцентне боје у кћеркама ћелијама након

деобе и следственом сукцесивном смањењу интензитета флуоресценце са сваком деобом. Интензитет флуоресценце сваке ћелије је читаван на проточном цитометру и приказан у виду хистограма флуоресценце.

Укратко, RAW264.7 ћелије су инкубиране 15 минута у PBS са 5 μ M CFSE, након чега је додат стандардни медијум у 10 пута већој запремини да би се зауставио процес обележавања. Потом су ћелије три пута испране стандардним медијумом како би се испрао невезан CFSE. Након тога је у плоче са 6 бунара, преко ноћи остављено 0,5x10⁶ ћелија по бунару у стандардном медијуму са TGF β (5ng/ml), EP (5 μ M), одн. Tax (1 μ g/ml). Након 3 дана, ћелије су покупљене и испране PBS-ом, а затим фиксирани 2% формалдехидом у PBS-у и анализирани на проточном цитометру CyFlow CL (*Partec, Münster, Немачка*). Као позитивна контрола коришћене су ћелије које су обојене CFSE на исти начин, али су одмах потом фиксирани (t_0). Интензитет флуоресценце је приказиван хистограмом, као проценат ћелија које имају нижи интензитет флуоресценце од t_0 ћелија.

3.3.1.3. Поларизација макрофага (M1, M2)

Макрофагни прекурсори из косне сржи мишева су диференцирани у макрофаге култивисањем 6 дана у 20% кондиционом медијуму L929 ћелија (претходно култивисаних у RPMI са 10% FCS и 1% P/S како је раније описано).

RAW264.7 ћелије и макрофази диференцирани из косне сржи су једнодневном култивацијом у стандардном ћелијском медијуму у присуству LPS (100ng/ml) и IFN- γ (20ng/ml) поларизовани ка M1, односно у присуству IL-4 (20 ng/ml) ка M2 функционалном фенотипу.

3.3.2.4. Грисова реакција

Активирани макрофаги ослобађају NO. Количина азотмооксида у супернатанту ћелијских култура сразмерна је степену активације макрофага, те се њеним мерењем добија информација о томе да ли тестирани фактори активирају или инхибирају макрофаге. Концентрација нитритних јона (NO₂⁻) у супернатанту ћелијских култура одређена је Грисовом реакцијом. Коришћен је искључиво

свеже припремљен реагенс. Компоненте реагенса, 1% сулфаниламид растворен у 5% H_3PO_4 и 0,1% N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорид (NED) растворен у води, су направљене дан пре употребе и чуване на 4°C. Стандардни раствор NaNO_2 и узорци ћелијских супернатаната су сипани (по 50 μl) у трипликату у бунаре са равним дном плоча са 96 бунара. Затим је Грисов реагенс направљен мешањем једнаких запремина поменутих компоненти и сипан у једнакој запремини као и узорак (по 50 μl) по бунару. Након 10 минута инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца на 540 nm у аутоматском читачу за микротитарске плоче. Количина нитрита у узорцима одређена је из стандардне криве.

3.3.2.5. Анализа ћелијске миграције тестом зарастања ране

Миграциони потенцијал макрофага испитан је *in vitro* тестом „зарастања ране” (*Scratch* тест). У плоче са 24 бунара засејавано је 10^5 RAW264.7 ћелија по бунару у стандардном медијуму и култивисано у инкубатору. Када би ћелије достигле конфлуентност, врхом наставка за пипету огребано је дно бунара целим његовим пречником, чиме је конфлуентност прекинута и створена „рана”. Након тога бунари су испрани три пута са PBS, да би се уклониле неvezане ћелије. Ћелије су потом остављане још 24 сата у медијуму у присуству TGF β (5ng/ml), TGF β (5ng/ml) и EP (5 μM), одн. TGF β (5ng/ml) и Tax (1 $\mu\text{g/ml}$). Затим су ћелије фиксирани леденим метанолом у трајању од 2 мин и обојене 0,1% *Crystal violet* бојом. Миграција ћелија у предео „ране” је документована на инвертном светлосном микроскопу (CKX41 *Olympus, Japan*).

3.3.2.6. Анализа миграционог капацитета (Бојденова комора)

Миграциони капацитет ћелија је испитан системом са две коморе раздвојене мембраном од поликарбонатног филтера са порама величине 8.0 μm (*Collaborative Research, Bedford, САД*) (*Boyden chamber-based cell migration assay, Costar, Cambridge MA, САД*). RAW264.7 ћелије су обележене флуоресцентном бојом (CFSE) на исти начин као и у тесту пролиферације. У горњу комору

постављено је 10^5 RAW264.7 ћелија у стандардном медијуму са EP ($5\mu\text{M}$) или Tax ($1\mu\text{g/ml}$), и култивисано у инкубатору током 2ч, након чега је у доњу комору у додат TGF β (5ng/ml) у стандардни медијум. Након 24 ч култивације у инкубатору, ћелије из горње коморе су уклоњене ручно штапићем са ватом, док су ћелије које су мигрирале и везале се за дно „трансвел” система фиксирание 4% формалдехидом у PBS-у 5 минута, испране три пута PBS-ом, и посматране под епи-флуорисцентним микроскопом (CKX41 *Olympus, Japan*). Зелено обележене ћелије су избројане помоћу *ImageJ* програма (NIH, SAD). Резултати су приказани као микрографије.

3.3.3. Анализа експресије протеина

3.3.3.1. Одређивање протеинске концентрације у узорцима

Концентрација протеина је у сваком узорку одређена употребом комерцијалног *BCA* теста (*Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, САД*) према упутству произвођача. Тест је заснован на редукцији Cu^{2+} јона бакар-сулфата (Биуретова реакција) и везивању Cu^{1+} са два молекула бицинохоничне киселине (*BCA*) што даје љубичасти продукт који се мери колориметријски на 540 nm (*Labsystems Multiskan PLUS, Финска*). Добијене вредности су коришћене за интерну нормализацију узорака.

3.3.3.2. Изоловање једарних протеина

Група ћелија, из које је требало изоловати једарне протеине, је центрифугирана (10 000 rpm, током 14 минута, на собној температури) а супернатант је одливен. Ћелијски талог је ресуспендован у хладном PBS и центрифугиран (6000 rpm, током 5 минута, на 4°C), након чега је уклоњен супернатант. Ћелијски талог је затим ресуспендован у пуферу за одвајање цитоплазме (CE, од енгл. *Cytoplasmic Extraction*, састав: 10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, а непосредно пре употребе су додати 0.3% NP-40 и инхибитори протеаза) у пет пута већој запремини од запремине пелета, и остављен на леду уз повремено мешање на Вортексу. Ћелијска суспензија је

потом центрифугирана (3000 грм, током 5 минута, на 4°C), након чега су супернатанти са ћелијским протеинима пажљиво уклоњени, а пелет ресуспендован у *CE* без NP-40 и поново центрифугиран (3000 грм, током 5 минута, на 4°C). Последња два корака испирања су поновљена ради добијања чистијег узорка једарних протеина. Затим је пелет ресуспендован у њему једнакој запремини пуфера за изоловање једарних протеина (*NE*, од енгл. *Nuclear Extraction*, састав: 20mM HEPES рН 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 25% глицерол, у који су непосредно пре употребе додати инхибитори протеаза), инкубиран 10 минута на леду уз повремено мешање на Вортексу. Након тога је раствор центрифугиран (14 000 грм, током 5 минута, на 4°C), а супернатант са једарним протеинима чуван на -70°C до употребе.

3.3.3.3. Зимографија

Зимографија је метод којим се утврђује активност матриксних протеаза и њихова молекулска маса. Може се користити за анализу урокиназа или металопроотеиназа. Заснива се на визуелизацији последица ензимске активности испитиваног ензима у присуству одговарајућег супстрата, те се утолико њихови протоколи разликују.

Урокиназе су ензими који разградњом плазминогена дају плазмин, који у присуству јона Ca^{2+} разграђује казеин. Постоје два приступа у њиховој анализи. За оба је кључан агарозни гел који у себи, осим 1% агарозе у раствору TRIS рН 8.5, садржи плазминоген, 0.5% казеин и 20 mM Ca^{2+} . Раствор 20mM Ca^{2+} иначе провидном агарозном гелу даје мутну белу боју, а његовим локалним ангажовањем губи се поменута боја што сведочи о деградацији казеина у присуству активне урокиназе у агарозном гелу.

Радијална зимографија је поступак, технички једноставнији и бржи за припрему, у ком се агарозни гел за зимографију прави са бунарима у које се директно сипа по 100µl протеинског узорка (ћелијски супернатант), и остави у влажној атмосфери на 37°C до развијања резултата. У овом поступку, ензими директно из узорка дифундују у гел подједнако у свим правцима, чиме се око

бунара ствара просветљени круг чији дијаметар зависи од укупне количине активне урокиназе у узорку.

Други приступ је поступнији. У њему се узорци (ћелијски супернатант или лизат) подвргну SDS-PAGE електрофорези у нередукујућим условима, током које се протеини раздвоје по молекулским масама. Затим се протеини у акрил-амидном (AA) гелу ренатуришу испирањем два пута по пола сата у 2% раствору детерџента Triton X-100 у дејонизованој води, на собној температури, након чега се AA гел са ензимима положи на гел за зимографију и остави у влажној атмосфери на 37°C да би активни ензими урокиназе дифундовали у правцу гравитационих линија у агарозни гел са супстратима и ту испољили своју ензимску активност, која постаје детектабилна настанком просветљених трака на иницијално униформно мутном гелу (након 12 до 48 часова).

Матриксне металопротеиназе разграђују желатин. Отуда се протеински узорак од интереса прво раздвоји SDS-PAGE електрофорезом у нередукујућим условима, у AA гелу са 0,2% желатина. Затим се гел са узорцима испира два пута по пола сата у раствору 2.5% Triton X-100 у дејонизованој води, да би се ензими ренатурисали и онда остави 24 часа на 37°C у раствору 100 mM Tris pH 8.5 са 10 mM Ca²⁺ да би испољили своју активност у гелу. Након тога се гел, на собној температури, боји 20 минута раствором 0.25% Coomasi R плаве боје у 10% сирћетној киселини и 50% метанола, а потом одбојава на мешалици раствором 10% сирћетне киселине и 10% метанола у дејонизованој води до појаве необојених трака. Овим поступком се желатин присутан у AA гелу боји у плаво, док се одбојавањем испира вишак боје који маскира просветљења у гелу која нису могла да се обоје јер у њима након дејства металопротеиназа нема више желатина.

3.3.3.4. Имуноцитохемијски метод детекције протеина

За детекцију протеина у RAW264.7 ћелијама, примењено је имунофлуоресцентно обележавање. Ћелије су култивисане на желатином обложеним округлим стакленим љуспицама. Љуспице (укупно 4, дијаметра 10mm, *Thermo Scientific*) су урођене у 0.1% раствор желатина у PBS и остављене преко ноћи на 4°C. Затим су испране три пута са PBS од невезаног желатина.

Затим је постављено 5×10^4 ћелија по љуспици и култивисано у 2 ml стандардног медијума преко ноћи. Сутрадан су ћелије третиране према текућем експерименталном дизајну: само са TGF β (5ng/ml) 1 ч, или ЕР (5 μ M), одн. Тах (1 μ g/ml) 2ч, па са TGF β (5ng/ml) 1ч. Ћелије су потом испране PBS-ом, фиксиране 10 минута у 4% формалдехиду у PBS, а затим пермеализоване са 0,5% PBS 5 минута на собној температури. Неспецифично везивање протеина блокирано је инкубацијом ћелија у 3% BSA у PBS, у трајању од 30 минута на собној температури. Ћелије су затим инкубирани са одговарајућим антителом 1 сат, а потом и са комплементарним секундарним антителом (**Табела 3.1.**) и 1 μ g/ml DAPI (*Sigma-Aldrich, САД*), такође у трајању од 1 сата, све на собној температури. Ћелије су на крају испране PBS-ом и водом и монтиране у DPX (DABCO/MOWIOL) медијуму на микроскопске плочице. Овако припремљени узорци су анализирани и документовани на флуоресцентном микроскопу (СКХ41 *Olympus, Јапан*).

3.3.3.5. Western blot

Western blot је метод којим је могуће у раствору смесе различитих протеина специфично детектовати тражени протеин у пикограмској количини.

Изолација протеина. Након различитих експерименталних процедура којима су ћелије биле подвргнуте, укупни ћелијски протеини су изоловани применом пуфера за лизу ћелија који се састојао од: 1% NP-40, 0.5% Triton X-100, 2mM EDTA у PBS-у, у који су непосредно пред употребу додати инхибитори протеаза: 1mM PMSF, 10mM ЕАСА, 1mM натријум-ортованадат и коктел инхибитора (1:100) (*Thermo Scinetific, САД*). Ћелије које су претходно култивисане у плочама са 6 бунара су лизирани са по 200 μ l комплетног пуфера за лизу по бунару, инкубацијом на леду, на ротационој мешалици у трајању од 20 минута. Ћелијски лизат је затим сакупљен и центрифугиран 15 минута на 10000 g и 4°C. Добијени супернатант са протеинима је сакупљен и чуван на -20°C до употребе. Концентрација протеина је у сваком узорку одређивана употребом комерцијалног BSA теста (*Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scinetific, САД*) према упутству произвођача.

Електрофореза и електротрансфер. Узорцима протеинских лизата је додаван редукујући пуфер за узорке следећег састава: 0,2М Tris (pH 6,8), 4% SDS, 40% глицерол, 0,02% бромфенол плаво и 20% DTT, са којим су узорци кувани у кључалој води 3-5 минута и затим одмах охлађени. Овако припремљени протенски узорци, уједначених протеинских маса, су наносени на 10% акриламидни гел дебљине 1.5mm и раздвајани SDS-PAGE електрофорезом, при константној струји од 140 mA током 60-90 минута. Након тога, раздвојени протеини су електротрансфером преношени на нитроцелулозну (*Aplichem*) или PVDF (*Thermo Scinetific, САД*) мембрану на константној струји од 1,9 mA/cm² током 90 минута.

Имуноблот. Неспецифично везивање антитела за мембрану је спречено заузимањем слободних места за везивање протеина на мембрани инкубацијом мембрана у 3% раствору албумина из серума говечета (*BSA, од енгл. Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, САД*) или млека (*Sigma-Aldrich, САД*) у 20% Tween-20 у TBS (TTw) 1 сат на собној температури. Затим су мембране инкубиране са примарним антителом преко ноћи на 4°C, на ротационој мешалици. Мембране су потом испране три пута по 10 минута TTw, и инкубиране са секундарним антителом коњугованим пероксидазом 1 сат на собној температури. Затим су поново испране TTw, па 5 минута само TBS.

Детекција протеина. Након једноминутне инкубације мембране са реагенсима за појачану хемилуминисценцу (*ECL, Enhanced chemiluminescence reagent system, Aplichem*), протеини обележени антителима детектовани су на ауторадиографском филму (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Шведска*), а филм је развијен системом (*Kodak, САД*) и скениран за документацију.

Дензитометрија. Интензитет протеинских трака квантификован је дензитометријски, применом *ImageJ* програма (*National Institute for Health, САД*).

3.3.4. Анализа експресије гена

3.3.4.1. RT-PCR

Специфична експресија гена у ћелијама анализирана је техником реверзне транскрипције и ланчане реакције полимеразе (RT-PCR, од енгл. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).

Изолација РНК. У сврху одређивања ћелијски специфичне генске експресије и механизма који регулишу генску експресију из ћелија је изолована интактна РНК, на основу које је потом добијена комплементарна ДНК (cDNA, *complementary deoxyribonucleic acid*). Ћелије су култивисане у плочама са 6 бунара и третиране према експерименталном дизајну. Након инкубације током које су ћелије достигле конфлуентност, одстрањиван је медијум из сваког бунара. По 1ml *TRIzol* реагенса (*Invitrogen*) додаван је у сваки бунар, где су ћелије директно лизирание пропуштањем кроз пипету. Хомогенизовани узорци пребацивани су у епрувете од 1.5ml и инкубирани 5 минута на собној температури како би се омогућила потпуна дисоцијација нуклеопротеинског комплекса. Потом је сваком узорку додавано по 0.2 ml хлороформа. Епрувете су снажно мућкане 15 секунди и затим инкубирание 2-3 минута на собној температури. Узорци су потом центрифугирани на 12000 g, на температури од 4°C у трајању од 15 минута. Хомогенат се након центрифугирања раздвајао у три фазе: доњу, црвену фенол-хлороформ фазу која садржи протеине, белу интерфазу у којој се налази ДНК и горњу водену фазу која садржи РНК. Водена фаза је пажљиво пребацивана у нову епрувету. Сваком узорку РНК додавано је по 0.5 ml 100% изопропанола а потом су инкубирани на собној температури 5 минута и центрифугирани на 12000 g, на температури од 4°C у трајању од 10 минута. Након центрифугирања, РНК се могла видети у виду белог талог на дну епрувете. Супернатант је одливан, а РНК талог је испиран 1 ml 75% етанола. Узорак је кратко промешан а потом центрифугиран на 7500 g на температури од 4°C у трајању од 5 минута. Након одливања супернатанта, РНК талог је сушен на ваздуху и растваран у води без нуклеаза. Након одређивања концентрације РНК помоћу спектрофотометра, узорци су чувани на -70°C до употребе.

Реверзна транскрипција и добијање комплементарне ДНК. Укупна РНК коришћена је за добијање cDNA и то на основу *oligo dT* прајмера који омогућава реверзну транскрипцију само иРНК. Реверзна транскрипција вршена је према упутству произвођача комплета за реверзну транскрипцију (*RevertAid™ H Minus First Strand cDNA, Fermentas*). Укратко: 2 µg РНК, 1 µl олиго dT прајмера и воде пречишћене од нуклеаза до укупне запремине од 12,5 µl инкубирани су на 65°C у трајању од 5 минута, а потом им је додавана основна мешавина која се састојала од: *RevertAid* реверзне транскриптазе, смесе деоксинуклеотида и инхибитора рибонуклеазе у пуферу за реверзну транскрипцију. Оваква смеша, запремине 20 µl, инкубирана је 60 минута на 42°C, а затим 10 мин на 70°C у термоблоку апарата *Mastercycler personal (Eppendorf, Немачка)*. Концентрација cDNA одређивана је помоћу спектрофотометра.

Реакција ланчаног умножавања. PCR продукти су добијени амплификацијом 200 ng cDNA употребом одговарајућих прајмера и основне мешавине која се састојала од: 2 пута концентрованог пуфера за PCR са солима Mg, смесе нуклеотида (dNTP, 500 µM) и Taq DNK полимеразе (50 U/ml) (*Fermentas*). Амплификација cDNK се одвијала по следећем основном PCR програму:

5 min на температури од 94°C

30 циклуса: 45 секунди на температури од 94°C

30 секунди на температури од 52°C

1.5 минута на температури од 72°C

10 минута на 72°C

Секвенце прајмера, као и температуре везивања специфичне за сваки прајмер приказане су у **Табели 3**. GAPDH је амплификован као контрола количине cDNA у сваком узорку.

PCR продукти раздвајани су електрофорезом на агарозном гелу (1.5%) са 0.01% етидијум-бромида (*Invitrogen*) у ТАЕ пуферу и визуелизовани осветљавањем гела UV светлошћу.

Табела 3.3. Прајмери примењени у експериментима.

ПРАЈМЕРИ			
Ген	Секвенца	Величина PCR продукта	Температура везивања
h/m GAPDH	Fw: ACCACAGTCCATGCCATCAC Rev: TCCACCACCTGTTGCTGTA	450 bp	60°C
UPA	Fw: TGCCCAAGGAAATTCTGCCCAAGGAAATTCCACGC Rev: GCCAATCTGCACATAGCACC	251 bp	60°C
MMP9	Fw: ACCACCACAACCTGAACCACA Rev: ACCAACCGTCCTGAAGAAA	304 bp	60°C

3.3.4.2. Трансфекција

У плоче са 24 бунара стављено је 4×10^4 RAW264.7 ћелија у 0.5ml стандардног медијума по бунару и култивисано у инкубатору преко ноћи. Након достизања 70% конfluентности ћелије су трансфектоване помоћу *Superfect* реагенса за трансфекцију (*Qiagen, Hilden, Немачка*), по 400 ng одговарајућег Gal4 плаزمиде и 100 ng репортер-плазмиде pFr5-luc, односно по 500 ng за репортер CAGAC-luc или репортер Kfb-luc плазмиде, и по 25ng SV40- β -Gal за сваки од њих по бунару. Шест сати након трансфекције, медијум је замењен свежим стандардним медијумом и ћелије су додатно инкубиране преко ноћи у истим условима. Затим су трансфектоване ћелије третиране према текућем експерименталном дизајну. За испитивање утицаја LPS на сигналну активност p38, ERK1/2 и JNK1/2, ћелије трансфектоване генима од интереса уз помоћ вектора са одговарајућим системом обележавања инкубиране су 24 ч у запремини од 0.5 ml стандардног медијума по бунару у присуству само LPS (0.1 μ g/ml), само одговарајућег инхибитора сигнала или у присуству оба. За испитивање ефекта EP и Тах на спонтану и TGF- β индуковану транскрипцију Smad3, ћелије

трансфектоване CAGAC-luc вектором су инкубиране 24 ч у запремини од 0.5 ml стандардног медијума по бунару у присуству само TGF β (5ng/ml), само EP (5 μ M), односно Tax (1 μ g/ml), или у комбинацији TGF β и EP, односно TGF β и Tax.

Након третмана трансфектоване ћелије лизирани су пуфером за лизирање Promega (*Promega, Adison, WI, САД*), а активност луциферазе је мерена помоћу реагенса Luciferase Assay System (*Promega, Adison, WI, САД*) на луминометру Optocomp-P (*MGM Instruments, Hamden, САД*). Активност луциферазе је нормализована у односу на паралелну активност β -галактозидазе, како би се ускладиле разлике изазване разликом у ефикасности трансфекције. Мерење β -галактозидазе вршено је применом реагенса *Galacto-Light Plus System (Tropix, Bedford, MA, САД)*.

У циљу испитивања директне укључености појединих сигналних молекула у трансдукцији сигнала коришћени су луциферазни репортер-плазмиди за: ERK1,2 (Gal4-ELk1), p38 (Gal4-CHOP), и JNK1,2 (Gal4-cJun) са репортер-плазмидом pFr5-luc, а за Smad3 (CAGAC-luc) и NF κ B (Kfb-luc). SV40- β -Gal је коришћен као позитивна контрола ефикасности трансфекције (**Табела 3.4.**).

Табела 3.4. Вектори примењени у експериментима.

ВЕКТОРИ		
Сигнални пут	Вектор	Произвођач
Smad3	CAGAC-luc	Stratagene, La Jolla, CA, САД
ERK1,2	Gal4-ELk1	Stratagene, La Jolla, CA, САД
p38	Gal4-CHOP	Stratagene, La Jolla, CA, САД
JNK1,2	Gal4-cJun	Stratagene, La Jolla, CA, САД
NF κ B	Kfb-luc	Stratagene, La Jolla, CA, САД
репортер-плазмид	pFr5-luc	Stratagene, La Jolla, CA, САД
контрола	SV40- β -Gal	Stratagene, La Jolla, CA, САД

SV40- β -Gal (SV40- β -Галактозидаза) контролни вектор коришћен је као позитивна контрола за ефикасност трансфекције. SV40- β -Gal садржи бактеријски *lacZ* ген, који се конститутивно експримира у ћелијама и чијом транскрипцијом и транслацијом настаје ензим β -галактозидаза. β -галактозидаза је одличан репортер ензим јер се његова експресија може детектовати директно у ћелијским лизатима. Лизатима се додаје супстрат за β -галактозидазу, и њиховом реакцијом настају хемилуминисцентни производи чија се јачина може прочитати на луминометру.

3.3.5. Статистичка обрада резултата

Сва тестирања су понављана најмање три пута. Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна девијација (SD). Student-ов *t*-тест коришћен је за поређење средњих вредности. Статистичка значајност прихватана је за $p < 0.05$.

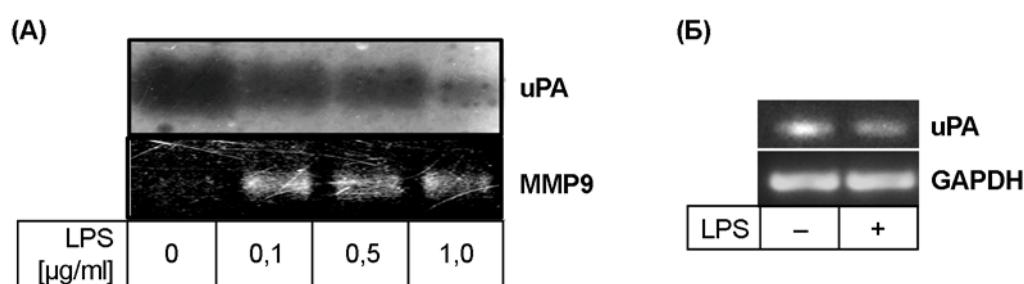
4. Результати

4.1. Утицај проинфламацијског фактора LPS на продукцију урокиназе у макрофагима

4.1.1. Ефекат LPS на продукцију uPA и MMP9 у RAW 264.7 ћелијама

У сврху одређивања дејства LPS, као једног од фактора класичне активације МФ, на продукцију uPA и MMP9, кришћен је опсег концентрација LPS од 0 до 1 $\mu\text{g/ml}$. RAW264.7 ћелије су култивисане у присуству наведених концентрација LPS током 24 ч након чега је испитана количина секретованих ензима у супернатантима култура тестираних ћелија зимографијом (Слика 4.1. А). LPS је на дозно зависан начин, у свим примењеним концентрацијама инхибирао продукцију uPA и истовремено стимулисао продукцију MMP9. У даљим испитивањима примењивана је само једна концентрација LPS: 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Она је одабрана јер је дала јасан резултат за оба ензима, који може недвосмислено да се интерперетира у будућим испитивањима. Такође је и у литератури често употребљавана за анализе утицаја LPS.

Даље је испитан утицај LPS на експресију гена за uPA и показано је да овај активатор макрофага делује инхибиторно (Слика 4.1. Б). Утицај LPS на генску експресију MMP9 није испитиван јер је већ описан у литератури (*Lee и сар., 2009*).



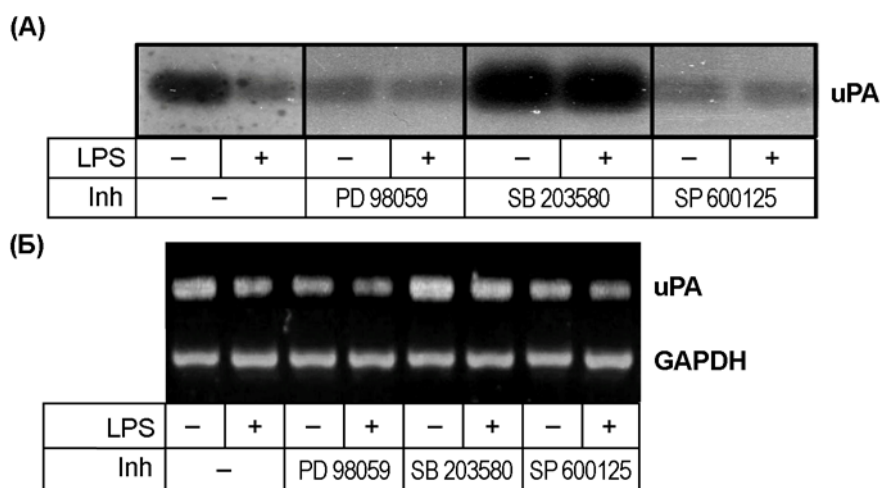
Слика 4.1. Ефекат LPS на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су инкубиране 24 ч са растућом концентрацијом LPS (од 0,1 $\mu\text{g/ml}$ до 1 $\mu\text{g/ml}$). Продукција uPA и MMP9 у супернатантима култура третираних ћелија је анализирана зимографијом (А), док је генска експресија uPA анализирана RT-PCR техником (Б) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

4.1.2. Ефекат инхибитора MAPK на продукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама индуковану LPS

У циљу испитивања укључености сигналних путева MAPK у продукцију uPA од стране RAW264.7 ћелија стимулираних LPS примењени су инхибитори специфични за све три групе MAPK и то: PD98059 (50 μ M), инхибитор ERK1/2 MAPK; SB203580 (10 μ M), инхибитор p38 MAPK и SP600125 (10 μ M), инхибитор JNK1/2 MAPK.

Зимографија узорака супернатаната култура третираних ћелија показала је да инхибитори ERK1/2 и JNK1/2 сигналних путева снажно инхибирају базални ниво продукције uPA, док следствени третман LPS није имао утицај на ефекат инхибитора. Са друге стране, инхибитор p38 сигналног пута је снажно стимулисао базални ниво продукције uPA, који накнадни третман LPS, сат времена касније, није могао да поништи (Слика 4.2. А).

За испитивање ефекта наведених инхибитора MAPK и следствене стимулације LPS-ом, на експресију гена за uPA примењен је RT-PCR метод. Резултат RT-PCR анализе ових ћелија је потврдио резултат зимографије (Слика 4.2. Б).



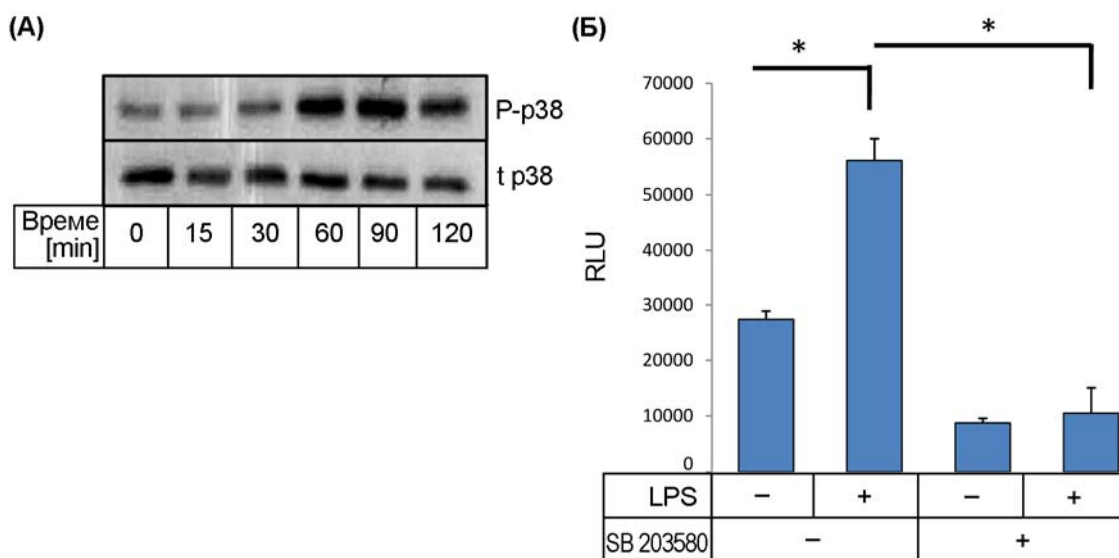
Слика 4.2. Улога MAPK сигналних путева у трансдукцији LPS-ом индуковане експресије uPA. RAW264.7 ћелије су култивисане као што је описано у поглављу Материјал и методе. Утицај инхибитора ERK1/2 (PD98059), инхибитора p38 (SB203580) и инхибитора JNK1/2 (SP600125) на продукцију секретованих ензима је анализиран зимографијом (А). Утицај наведених инхибитора MAPK на експресију гена је одређен

RT-PCR; GAPDH је представљао контролу (Б). Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

За утврђивање капацитета којим LPS да активира MAPK у RAW264.7 ћелијама, примењена је Western blot анализа и специфични луциферазни репортер-плазмиди помоћу којих је утврђена активност све три групе MAPK: ERK1/2, p38 и JNK1/2 (Табела 3.4).

Најпре је утврђен утицај на p38 MAPK. Western blot анализа је показала да LPS активира p38 MAPK сигнални молекул у RAW264.7 ћелијама. Ова активација достиже врхунац у периоду од 60. до 120. минута од почетка стимулације (Слика 4.3. А).

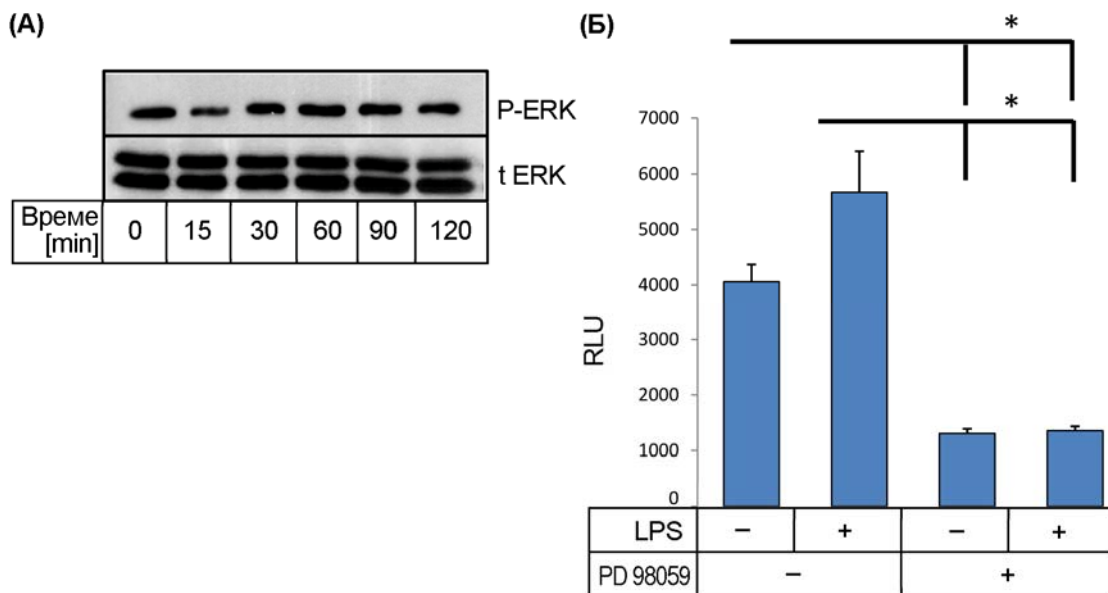
Затим су ћелије третиране инхибитором p38 молекула (SB-203580) и култивисане у присуству или одсуству LPS-а. Резултат је потврдио да LPS снажно увећава активност p38, док је SB203580 инхибира (Слика 4.3. Б). LPS није у стању да превазиђе блокаду активације p38 индуковану деловањем свог специфичног инхибитора.



Слика 4.3. Утицај LPS на кинетику и експресију p38 у RAW264.7 ћелијама. Western blot анализа кинетике активације p38 молекула у ћелијама третираним LPS-ом (0.1 $\mu\text{g/ml}$) (А). Трансактивација Gal4-СНОР репортера за p38 након третмана SB203580 (10 μM), у присуству или одсуству LPS-а (0.1 $\mu\text{g/ml}$) током 24 ч. Процедуре су изведене као што је описано у поглављу Материјал и методе. Вредности су нормализоване у односу на контролне и вредности индуковане помоћу LPS (Б). RLU, relative luciferase units. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. ** $p < 0.01$ у поређењу са одговарајућим контролним ћелијама

Даље је испитан утицај на ERK1/2 MAPK. Western blot анализа протеина RAW264.7 ћелија је показала да LPS благо стимулише фосфорилацију ERK1/2 молекула што се запажа 30 минута од почетка стимулације и одржава до краја тестираног периода (120 минута) (Слика 4.4. А).

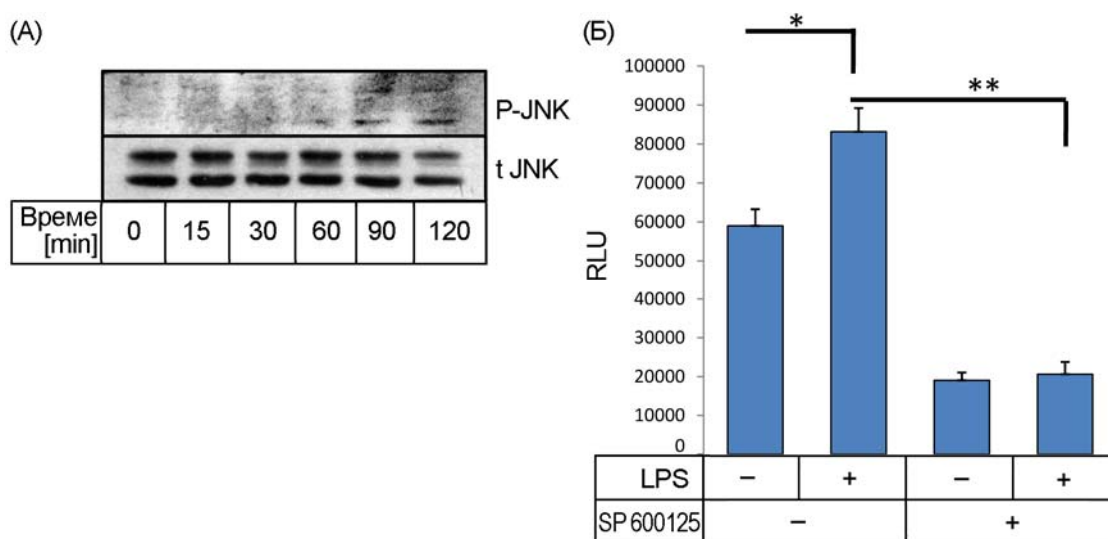
Када су ћелије третиране инхибитором ERK1/2 молекула (PD98059), у присуству или одсуству LPS, показано је да LPS активира ERK1/2 репортер, док га PD98059 инхибира (Слика 4.4. Б). Исто као у случају р38 молекула, LPS није могао да превазиђе блокаду активације ERK1/2 индуковану деловањем специфичног инхибитора ових MAPK.



Слика 4.4. Утицај LPS-а на кинетику и експресију ERK1,2 у RAW264.7 ћелијама. Western blot анализа кинетике активације ERK1/2 молекула у ћелијама третираним LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$) (A). Трансактивација Gal4-ELk1 репортера за ERK1/2 након третмана са PD98059 (50 μM), у присуству или одсуству LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$) током 24 ч. Процедуре су изведене као што је описано у поглављу Материјал и методе. Вредности су нормализоване у односу на контролне и вредности индуковане помоћу LPS (Б). RLU, relative luciferase units. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. * $p < 0,05$ у поређењу са одговарајућим контролним ћелијама.

Овај сегмент истраживања је завршен испитивањем утицаја LPS на JNK1/2 MAPK. Western blot анализа протеина RAW264.7 ћелија је показала да LPS активира JNK1/2 након 90 минута деловања (Слика 4.5. А).

Када су ћелије третиране инхибитором JNK1/2 молекула (SP600125), у присуству или одсуству LPS, показано је да LPS активира JNK1/2 репортер, док га SP600125 инхибира (Слика 4.5, Б). И овај налаз је био сличан претходним и потврдио да LPS не може да превазиђе блокаду активације JNK1/2 индуковану деловањем специфичног инхибитора.



Слика 4.5. Утицај LPS на кинетику и активност JNK1/2 у RAW264.7 ћелијама. Western blot анализа кинетике активације JNK1/2 молекула у ћелијама третираним LPS-ом (0,1 $\mu\text{g/ml}$) (А). Трансактивација Gal4-cJun репортера за протеин JNK1/2 након третмана са SP-600125 (10 μM), у присуству или одсуству LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$) током 24 ч. Процедуре су изведене као што је описано у поглављу Материјал и методе. Вредности су нормализоване у односу на контролне и вредности индуковане помоћу LPS (Б). RLU, relative luciferase units. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ у поређењу са одговарајућим контролним ћелијама.

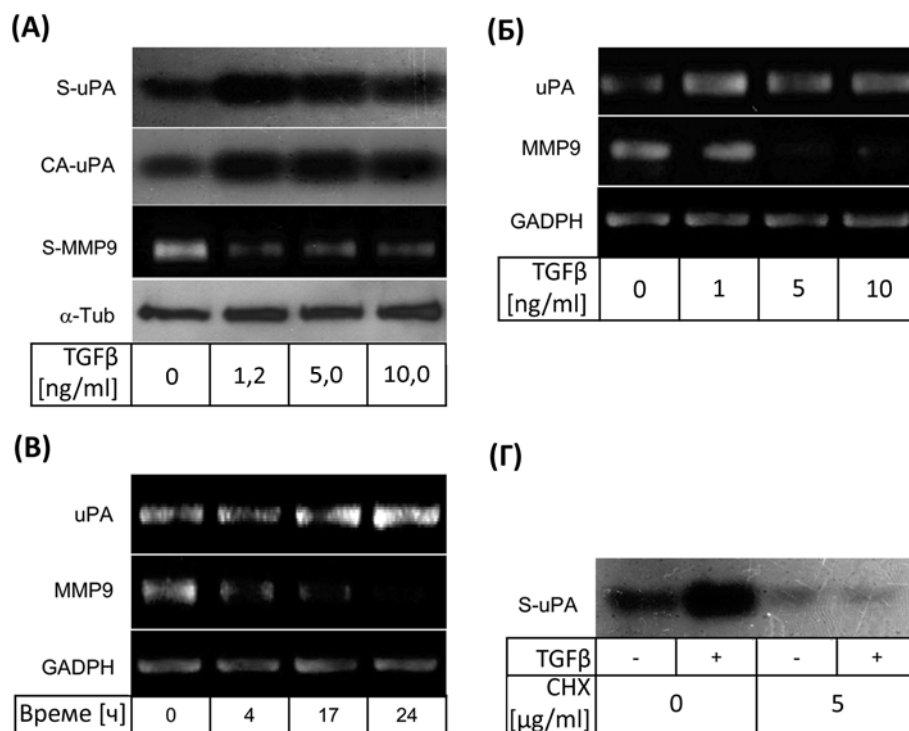
4.2. Утицај анти-инфламацијског фактора TGF- β на продукцију uPA и MMP9 у макрофагима

4.2.1. Ефекат TGF- β на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама

У циљу испитивања дејства TGF- β , као једног од кључних фактора алтернативног пута активације МФ, испитано је дејство овог цитокина на продукцију ензима uPA зимографијом, а његова генска експресија RT-PCR. TGF- β је у експериментима коришћен у концентрацијама од 0 до 10 ng/ml (Слика 4.6.). Резултати су показали да TGF- β стимулише продукцију uPA како у супернатантима култура тако и у самим RAW264.7 ћелијама. Истовремено, овај цитокин инхибира продукцију MMP9 у супернатантима култура RAW264.7 ћелија након 24h присуства. Описани ефекат је детектован од концентрације 1.2 ng/ml (Слика 4.6. А). Овај резултат потврђен је и испитивањима на нивоу експресије гена за uPA (Слика 4.6. Б, В).

Ради утврђивања да ли је протеинска синтеза значајна за стимулаторни ефекат TGF- β на продукцију uPA, ћелије су најпре третиране циклохексимидом, инхибитором синтезе протеина, а потом TGF- β . Зимографијом супернатанта овако третираних ћелијских култура показано је да циклохексимид значајно инхибира како базалну продукцију uPA у супернатантима, тако и продукцију стимулисану TGF- β (Слика 4.6. Г).

На основу добијених резултата, одлучено је да у даљим истраживањима дефинисања молекулских механизма деловања TGF- β овај цитокин буде примењиван у концентрацији од 5 ng/ml.

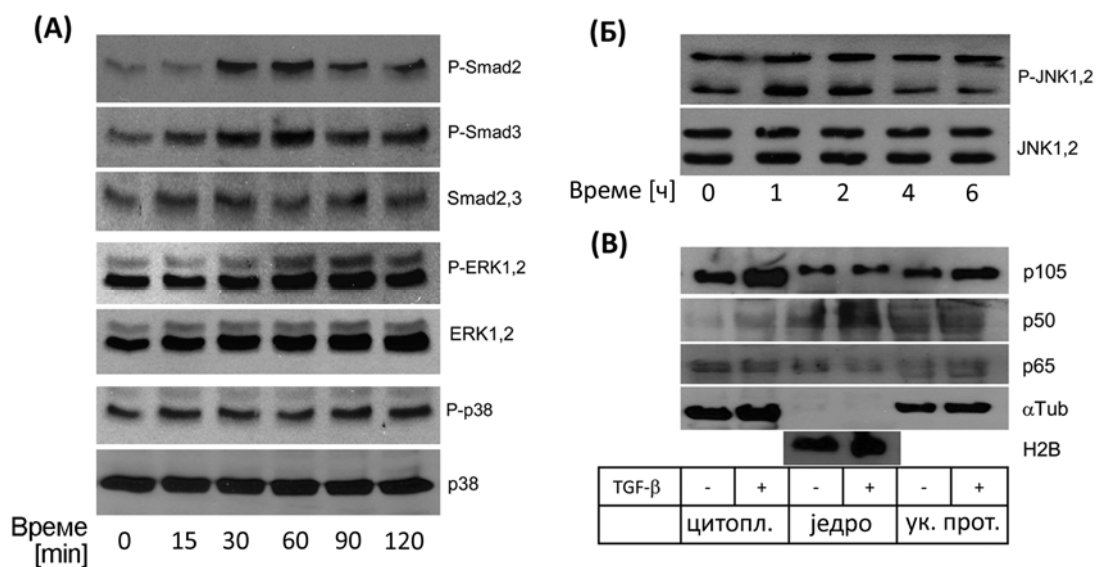


Слика 4.6. Ефекат TGFβ на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама. RAW264.7 ћелије су инкубиране са растућом концентрацијом TGF-β (0, 1/1.2, 5 и 10 ng/ml). Након 24ч инкубације супернатанти третираних ћелија и ћелијски протеини су анализирани зимографијом (A). Укупна РНК је коришћена за RT-PCR са прајмерима за uPA и MMP9; GAPDH је представљао контролу (B). Генска експресија је испитана и у различитим временима након додавања TGF-β (5ng/ml) као стимулуса (C). Ефекат транслације на ензимску активност uPA у супернатантима је испитан зимографијом након котретмана ћелија са инхибитором протеинске синтезе циклохексимином (CHX, 0 и 5 μg/ml) (D). Процедуре су изведене како је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. (S-uPA, солубилна uPA; CA-uPA, ћелијска uPA).

4.2.2. Улога Smad2/3, MAPK и NFκB у ефекту TGF-β на продукцију uPA и MMP9 у RAW 264.7 ћелијама

У даљим истраживањима испитивана је улога сигналних молекула и транскрипционих фактора за које је раније показано да учествују у преносу сигнала након ангажовања рецептора за TGF-β, као што су Smad2, Smad3, MAPK и NFκB. Western blot анализа је показала да TGF-β активира канонске путеве Smad2 након 30 минута, а Smad3 након 15 минута. Врхунац активације ова два протеина се постиже сат времена од почетка третмана TGF-β. Активација путева

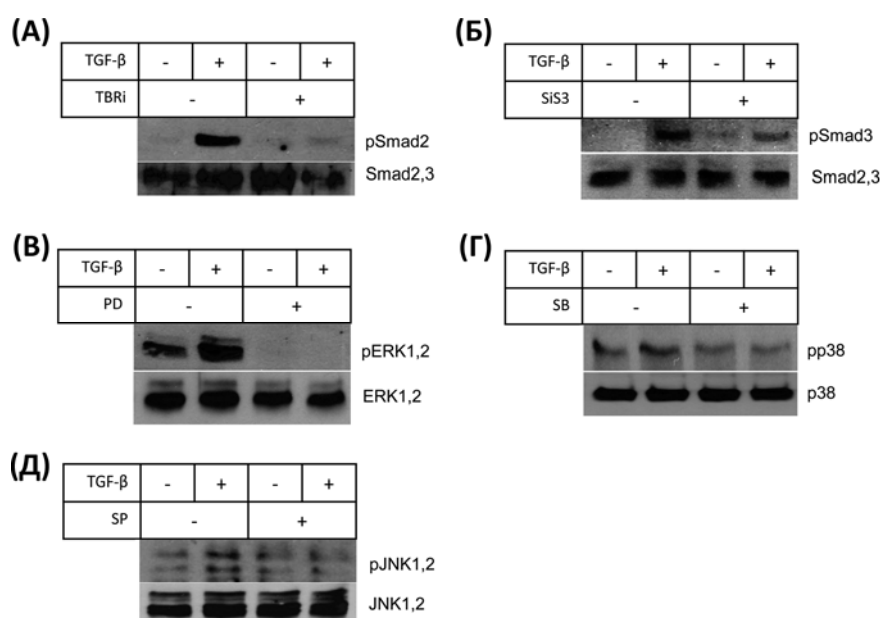
MAPK, анализирана на основу експресије сигналних молекула ERK1/2, p38, JNK1/2 је слабије изражена у односу на Smad2 и 3 (Слика 4.7. А, Б). Анализа ћелијске локализације субјединица (p50 и p65) NFκВ транскрипционог фактора, као и p50 прекурсора p105, показала је да TGF-β стимулус увећава количину p50, смањује количину p65 и не утиче на количину p105 у једру RAW264.7 ćелија. Истовремено у цитоплазми, количина p105 (p50 прекурсора) значајно расте, количина p50 такође расте, а количина p65 је непромењена (Слика 4.7. В/С).



Слика 4.7. Western blot сигналних молекула који се активирају у RAW264.7 ћелијама након ангажовања рецептора за TGF-β. RAW264.7 ћелије су стимулисане TGF-β (5ng/ml). Динамика активације Smad2/3, ERK1/2 и p38 је посматрана током 2ч, применом Western blot-а као што је описано у поглављу Материјал и методе (А). Динамика активације JNK1/2 је праћена у првих 6 сати (Б). Експресија NFκВ субјединица (p50 и p65) и p105 прекурсора је анализирана у једарној и цитоплазматској (цитопл.) фракцији, паралелно са укупним протеинима (ук.прот.) RAW264.7 ћелија. Тубулин (αTub) и хистони (H2B) су коришћени као контроле за цитоплазматске, тј. једарне протеине (В). Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

Као што је познато, зависно од типа ћелије и контекста микроокружења, TGF-β може да активира више сигналних путева. Зато је у следећем кораку, применом специфичних инхибитора, испитана укљученост појединих сигналних компоненти (Smad2, Smad3, MAPK) у ефекат који TGF-β испољава након 1 сата култивације са RAW264.7 ћелијама (Слика 4.8.).

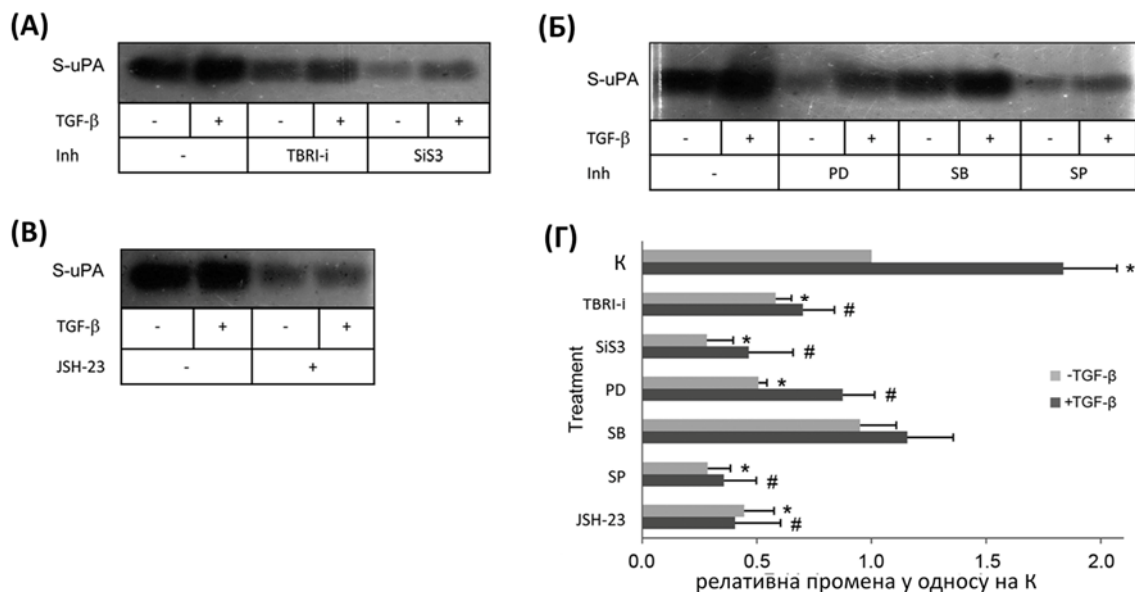
Резултати Western blot анализе су показали да TGF- β снажно активира Smad2 и Smad3 молекуле, који су без овог стимулуса били некативни. TGF- β је активирао и остале испитане молекуле: ERK1/2, p38 и JNK1/2, који су имали одређену базалну активност у одсуству TGF- β . Ефикасност примењених инхибитора се разликовала. PD98059 је био најуспешнији у инхибицији како базалног, тако и TGF β стимулисаног нивоа активације ERK1/2. TBRi је у TGF- β стимулираним ћелијама успешно инхибирао Smad2 а SiS3 нешто слабије инхибирао Smad3. SB203580 и SP600125 су базалну активност својих сигналних молекула инхибирали делимично, али је зато инхибиција њихове активности при TGF- β стимулацији била ефектнија (Слика 4.8.).



Слика 4.8. Улога Smad и MAPK сигналних путева у ефекту TGF- β на RAW264.7 ћелије. Ћелије су најпре инкубиране 1 сат са инхибиторима за: Smad2/3 (SiS3, 2,5 μ M), ERK1/2 (PD98059, 50 μ M), p38 (SB203580, 10 μ M) и JNK1/2 (SP600125, 10 μ M). Након тога у културе је додат TGF β (5ng/ml). Применом Western blot-a је анализиран ефекат третмана на фосфорилацију сигналних молекула Smad2, Smad3, ERK1/2, p38 и JNK1/2 у RAW264.7 ћелијама након 1 сата култивације као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

Примарни циљ у овом делу истраживања је био да одредимо сигналне путеве укључене у стимулаторни ефекат TGF- β на продукцију uPA од стране RAW264.7 ћелија у култури. Инхибиција свих тестираних сигналних молекула (Smad2/3, ERK1/2, JNK1/2, NF κ B) осим p38 MAPK је довела до статистички

значајно мање базалне продукције uPA у култури RAW264.7 ћелија (Слика 4.9). Такође, присуство инхибитора свих сигналних молекула, осим p38, је значајно инхибирало капацитет TGF- β да стимулише продукцију uPA од стране RAW264.7 ћелија. Као што је истакнуто, инхибиција p38 MAPK није статистички значајно мењала ни базалну продукцију ни TGF- β стимулисану продукцију uPA у култури RAW264.7 ћелија.

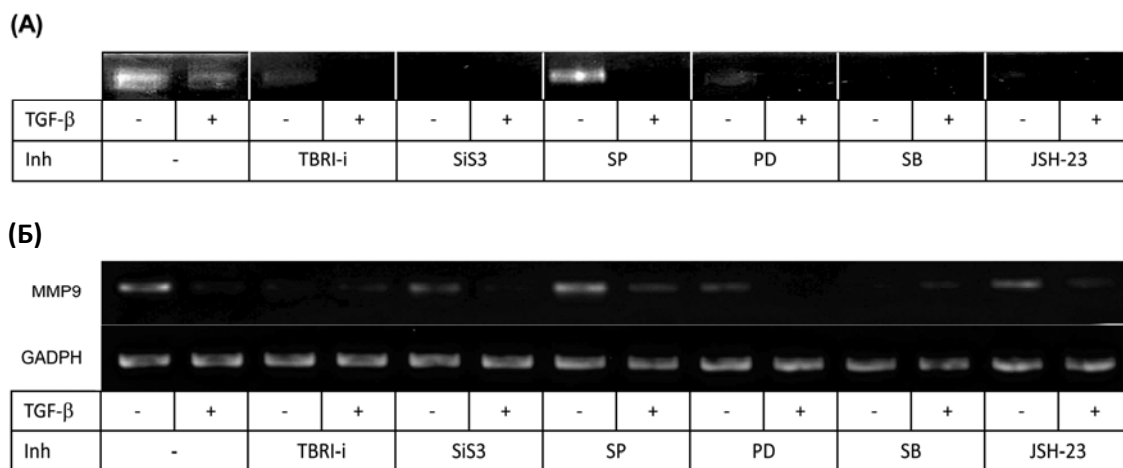


Слика 4.9. Улога Smad2, Smad3, MAPK и NF κ B у TGF- β стимулисаномј продукцији uPA у RAW264.7 ћелијама. Утицај специфичних инхибитора тестираних сигналних молекула на продукцију ензима uPA од стране RAW264.7 ћелија у присуству и одсуству TGF- β (5ng/ml) анализиран је зимографијом (А, Б, В) или дензитометријом (Г) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Примењени су инхибитори (inh) за: ALK5 (TBRI-i, 1 μ M), Smad2,3 (SiS3, 2,5 μ M), ERK1/2 (PD-98059, 50 μ M), p38 (SB-203580, 10 μ M), JNK1/2 (SP-600125, 10 μ M), NF κ B (JSH-23, 5 μ M). Резултати добијени применом дензитометрије су приказани као релативне вредности у односу на нетретиране ћелије, којима је додељена арбитарна вредност један. Приказана је средња вредност из три независна експеримента. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. * $p < 0.05$ у поређењу са контролним нестимулисаним ћелијама (које нису третиране инхибиторима), # $p < 0.05$ у поређењу са контролним TGF- β стимулисаним ћелијама (које нису третиране инхибиторима)

У следећем низу експеримената, применом истих инхибитора, истражени су сигнални механизми укључени у инхибиторно деловање TGF- β на продукцију MMP9 у културама RAW264.7 ћелија. Инхибиција Smad3, p38 и NF κ B молекула је драстично смањила базални ниво продукције MMP9, али није променила TGF- β

индукован инхибиторни ефекат на продукцију овог ензима. Инхибитори ALK5 и ERK1/2 молекула су делимично умањили базални ниво продукције MMP9, али ни ови инхибитори нису утицали на супресивни ефекат TGF- β . Насупрот томе, инхибиција JNK1/2 молекула је повећала базални ниво продукције MMP9, међутим, то није утицало на капацитет TGF- β да супримира продукцију MMP9 ензима.

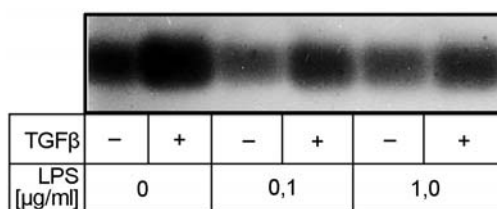
Полазећи од налаза да TGF- β значајно стимулише експресију гена за MMP9, у наредном кораку испитани су молекуларни механизми овог ефекта. У том циљу примењен је исти низ инхибитора сигналних молекула као и у RT-PCR методу. Резултати RT-PCR анализе су потврдили налазе зимографије (Слика 4.10.).



Слика 4.10. Инхибиција продукције и експресије MMP9 у RAW264.7 ћелијама. Утицај појединих инхибитора на активност MMP9, у присуству и одсуству TGF- β (5ng/ml), анализирана је зимографијом (A), а на експресију гена RT-PCR-ом (B). Примењени су инхибитори (inh) за: ALK5 (TBRI-i, 1 μ M), Smad2,3 (SiS3, 2,5 μ M), JNK1/2 (SP-600125, 10 μ M), ERK1/2 (PD-98059, 50 μ M), p38 (SB-203580, 10 μ M), NF κ B (JSH-23, 5 μ M). Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

4.3. Ефекат LPS и TGF- β на продукцију урокиназа у RAW264.7 ћелијама

У току хроничне инфламације, у њеној микросредини присутни су истовремено и про- и анти-инфламацијски фактори. Да би испитали какав ефекат на продукцију секретованих uPA има истовремено и заједничко дејство про- и анти-инфламацијских стимулуса, RAW264.7 ћелије су култивисане у присуству растућих концентрација LPS и константне концентрације TGF- β (Слика 4.11.). Резултати су показали да у присуству оба фактора, RAW264.7 ћелије продукују мању количину активних ензима у поређењу са продукцијом стимулисаном појединачним деловањем TGF- β . Уочљиво је да оба фактора успевају да одрже тренд својих самосталних ефеката на продукцију uPA односно LPS у свим примењеним концентрацијама инхибира продукцију uPA у поређењу са базалном синтезом а TGF- β делује стимулаторно. Као што је напред истакнуто, стимулаторни ефекат TGF- β је у присуству LPS-а инхибиран.

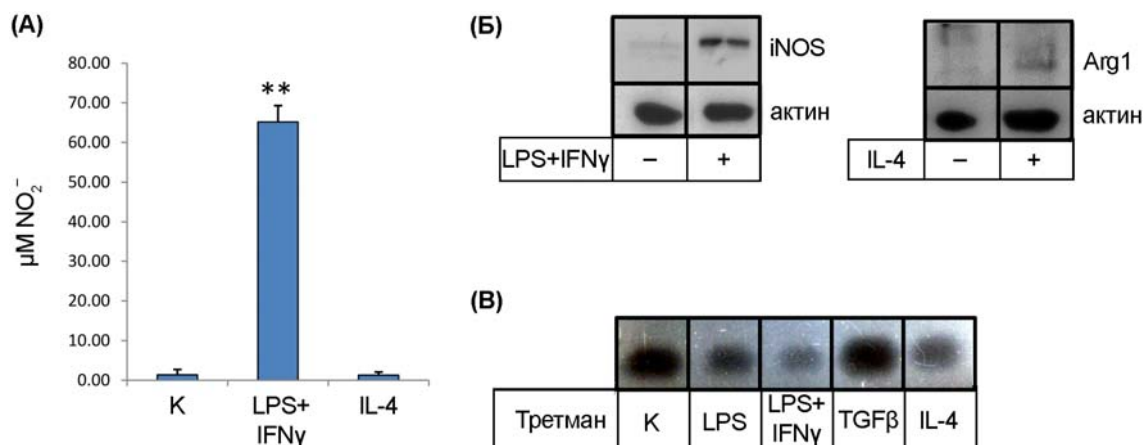


Слика 4.11. Утицај LPS и TGF- β на продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама. RAW264.7 ћелије су култивисане у присуству TGF- β (5ng/ml) и различитих концентрација LPS (0,1 и 1 μ g/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Након 24ч одређена је активност секретованих uPA применом зимографије. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

4.4. Утицај М1 и М2 поларизације макрофага на продукцију uPA и MMP9 у макрофагима

4.4.1. Повезаност функционалног фенотипа RAW264.7 ћелија и продукције uPA.

У циљу испитивања како функционални фенотип МФ утиче на активност урокиназа, RAW264.7 ћелије су третиране факторима класичног пута активације (LPS и IFN γ) који доводе до настанка М1 функционалног фенотипа и IL-4, једним од цитокина који доводи до трансформације у М2 функционални фенотип односно фактором који доводи до активације алтернативног пута. Успешност трансформације RAW264.7 ћелија у жељени фенотип, након деловања М1 и М2 стимулуса, проверен је одређивањем продукције NO у супернатантима култура ових ћелија (Грисовом реакцијом) и Western blot анализом којом је одређена експресија iNOS-а. Показано је да је истовремена стимулација RAW264.7 ћелија LPS-ом и IFN- γ (М1 стимулус) 65 пута повећала продукцију NO, док је продукција NO након деловања IL-4 (М2 стимулус) остала на нивоу контроле (Слика 4.12. А). Western blot анализа на овај начин третираних ћелија је показала да су LPS и IFN γ стимулисали експресију протеина iNOS, а IL-4 експресију протеина аргиназе 1 (Слика 4.12. Б). Пошто је утврђено да су третмани били успешни и да су усмерили RAW264.7 ћелије ка М1, односно М2 функционалном фенотипу, зимографијом је испитана продукција uPA у супернатантима култура ових ћелија. Резултати, приказани на слици 4.12. В показују да IFN- γ потенцира инхибиторни ефекат самог LPS-а на продукцију uPA. У складу са очекивањима, TGF- β стимулише продукцију uPA, док IL-4 делује инхибиторно у поређењу са контролом.



Слика 4.12. Повезаност функционалног фенотипа RAW264.7 и продукције uPA. Трансформација RAW264.7 ћелија у M1 и M2 фенотип је извршена применом одговарајућих стимулуса LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$) и IFN γ (20ng/ml), односно IL-4 (20ng/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Продукција NO испитана је Грисовом реакцијом (A). Експресија протеина iNOS и Arg-1 су испитане применом Western blot анализе (B). Активност ензима uPA у супернатантима култура третираних ћелија је одређена зимографијом (B). Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. ** $p < 0.01$ у поређењу са контролним ћелијама (које нису третиране M1 и M2 стимулисима)

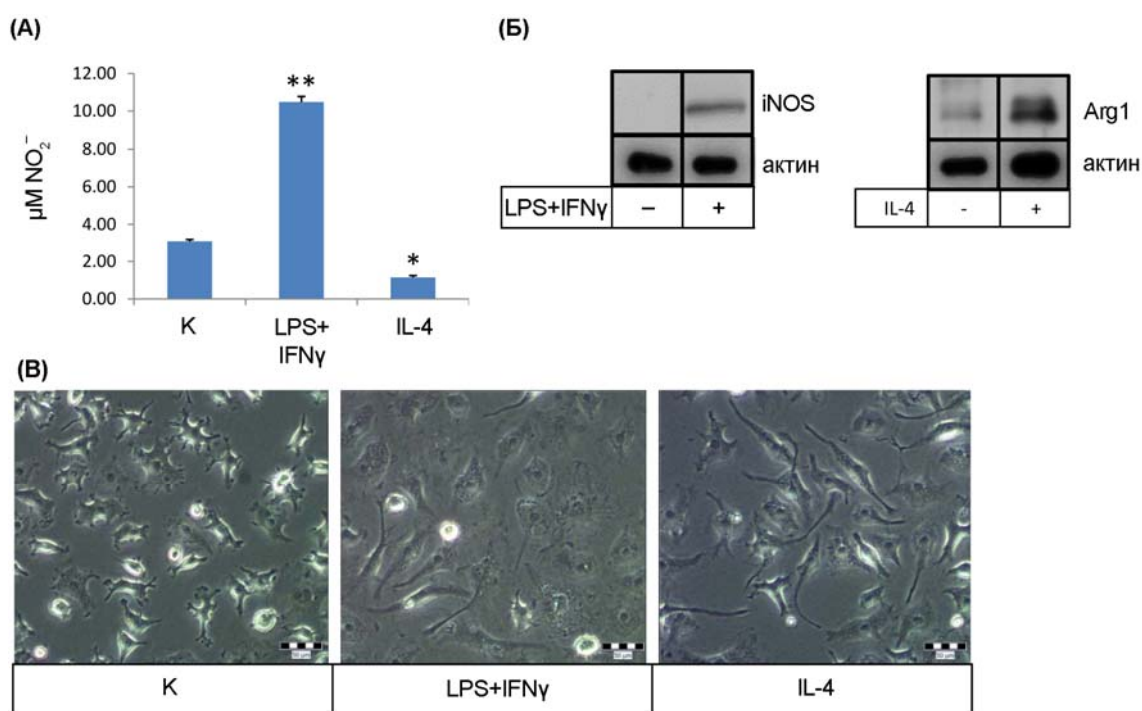
4.4.2. Повезаност функционалног фенотипа мишјих примарних МФ и продукције uPA и MMP9

Ради утврђивања да ли постоји разлика у функционалном одговору примарних МФ у поређењу са МФ ћелијске линије RAW264.7, изоловани су прекурсори МФ из косне сржи мишева соја *СВА/Н*. Применом већ описаних M1 и M2 стимулуса индуковани су M1 и M2 функционални фенотип.

Функционална активност ових МФ, одређивана је анализом степена продукције NO Грисовом реакцијом, односно iNOS и Arg-1 Western blot анализом. Резултати су показали да класично активирани примарни мишји МФ продукују 5 пута више NO у односу на нетретиране ћелије. Алтернативна активација примарних МФ доводила је до статистички значајне инхибиције продукције NO у поређењу са нестимулисаним ћелијама. Western blot анализом ћелија је потврђено да је класична активација МФ стимулисала транскрипцију iNOS, док је алтернативна активација МФ стимулисала транскрипцију аргиназе 1. На овај

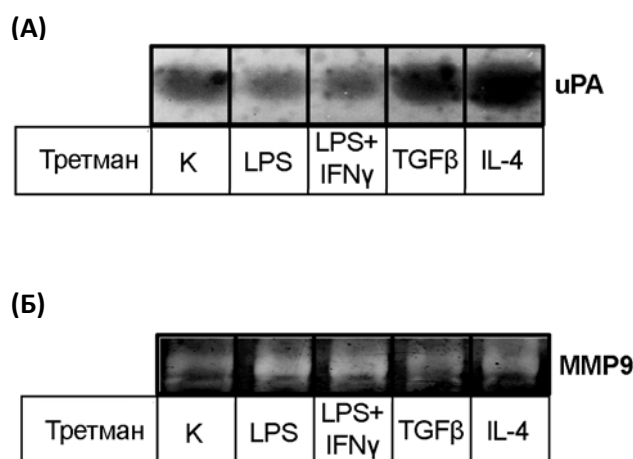
начин утврђено је да су примењени третмани усмерили мишће примарне МФ ка М1 и М2 функционалном фенотипу (Слика 4.13. А, Б).

Испитано је да ли М1 и М2 стимулуси, осим што утичу на функционалну активност ћелија, мењају и њихове морфолошке карактеристике. Због тога су ћелије анализиране под светлосним инвертним микроскопом са фазним контрастом и уочено је да су се ћелије разликовале по морфологији. Нетретиране ћелије су биле мање, са неколико краћих наставка. МФ третирани М1 стимулусима (LPS и IFN γ) имали су претежно заобљен облик, док су МФ третирани путем IL-4 (М2 стимулус) постали упадљиво издужени и вретенасти (Слика 4.13. В).



Слика 4.13. М1 и М2 поларизација мишјих примарних макрофага у култури. Продукција NO је измерена Грисовом реакцијом (А). Експресија iNOS-а и Arg-1 након третмана М1 стимулусом (LPS, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ и IFN γ , 20ng/ml) и М2 стимулусом (IL-4, 20ng/ml) одређена је Western blot анализом (Б). Микрографије мишјих Mf након 24ч третмана М1 или М2 стимулусима (В). Све процедуре су изведене као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. (К, контрола) Увеличање 40x (СКХ41 Olympus, Јапан). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ у поређењу са контролним ћелијама (које нису третиране М1 и М2 стимулусима)

Продукција uPA и MMP9 у супернатантима култура мишјих МФ након M1 односно M2 трансформације је одређена зимографијом. Резултати су показали да LPS самостално или у садејству са IFN γ инхибира продукцију uPA и стимулише продукцију MMP9. Насупрот њима TGF- β и IL-4 појединачно су снажно стимулисали продукцију урокиназа. Међутим, када је у питању MMP9, ефекат ова два цитокина се разликовао: TGF- β је инхибирао а IL-4 није утицао на ниво базалне продукције овог ензима (Слика 4.14.).



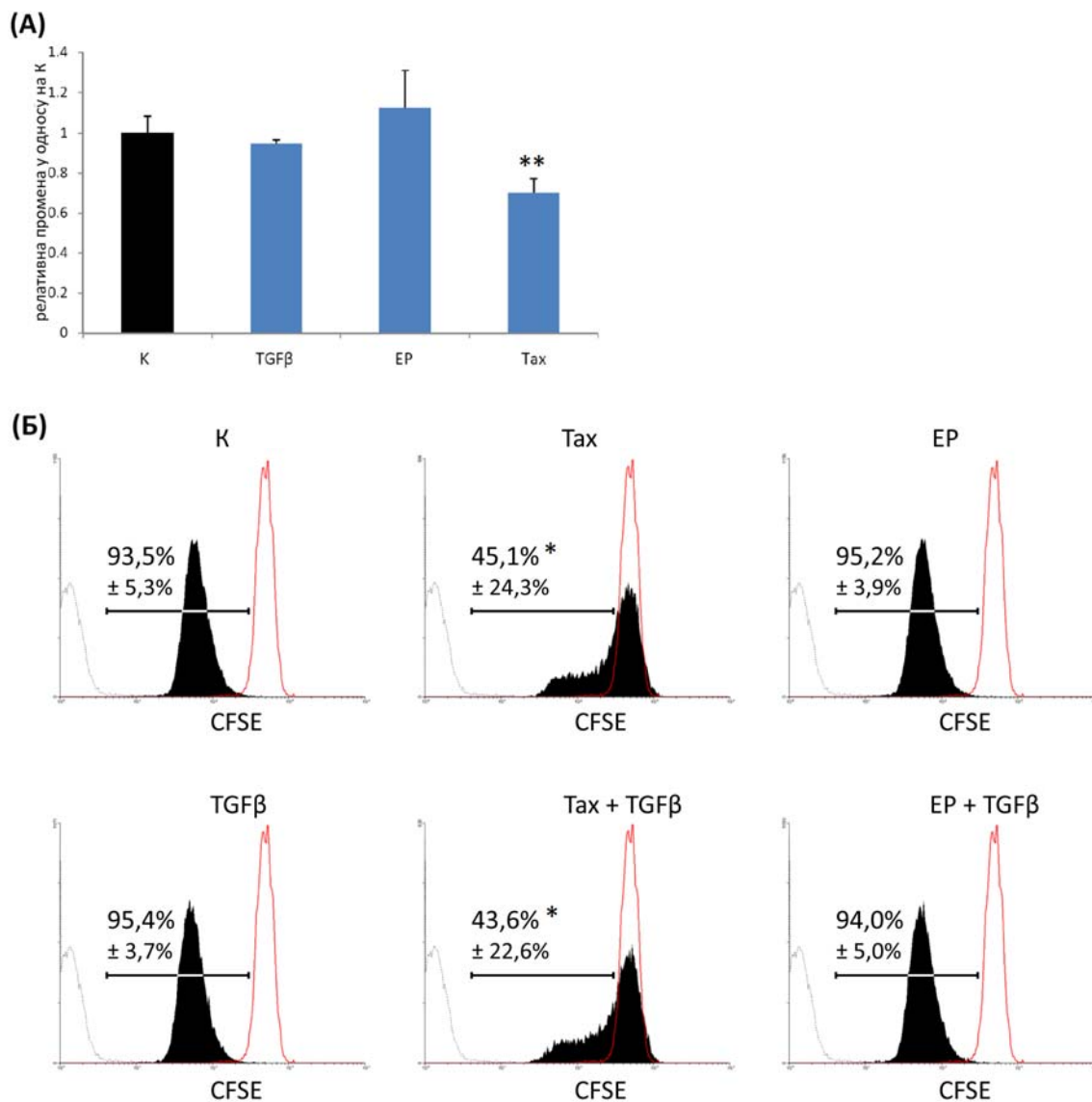
Слика 4.14. Ефекат фактора класичног и алтернативног пута активације МФ на продукцију uPA и MMP9 у мишјим макрофазима. Макрофагни прекурсори изоловани из косне сржи мишева соја СВА/Н, култивисани су присуству LPS (0.1 μ g/ml), IFN γ (20ng/ml), TGF β (5ng/ml) или IL-4 (20ng/ml) током 24ч, као што је описано у поглављу Материјал и методе. Продукција урокиназа (А) и MMP9 (Б) одређивана је зимографијом супернатанта ћелијских култура. Приказане су репрезентативне зимографије једног од најмање три експеримента.

4.5. Ефекат анти-туморских лекова естрамустин фосфата и таксола на макрофаге

4.5.1. Утицај естрамустин фосфата и таксола на ћелијски раст и пролиферацију RAW264.7 ћелија

У наредном низу експеримената, МТТ тестом је испитан утицај TGF- β на раст RAW264.7 ћелија, као и лекова који испољавају анти-туморски ефекат. RAW264.7 ћелије су три дана култивисане у присуству TGF- β или EP односно Tax. Добијени резултати су показали да TGF- β и EP у примењеним концентрацијама не утичу значајно на ћелијски раст, док Tax значајно инхибира пролиферацију третираних ћелија.

Такође, методом проточне цитофлуориметрије, применом флуоресцентне боје CFSE, испитан је модулаторни ефекат TGF- β и лекова на пролиферацију RAW264.7 ћелија када се примене у комбинацији. Резултати су показали да TGF- β и EP када се примене појединачно или у комбинацији не утичу на пролиферацију испитиваних ћелија у поређењу са контролом. Са друге стране, третман Tax је самостално, као и у комбинацији са TGF- β , инхибирао деобу ћелија (Слика 4.15.).

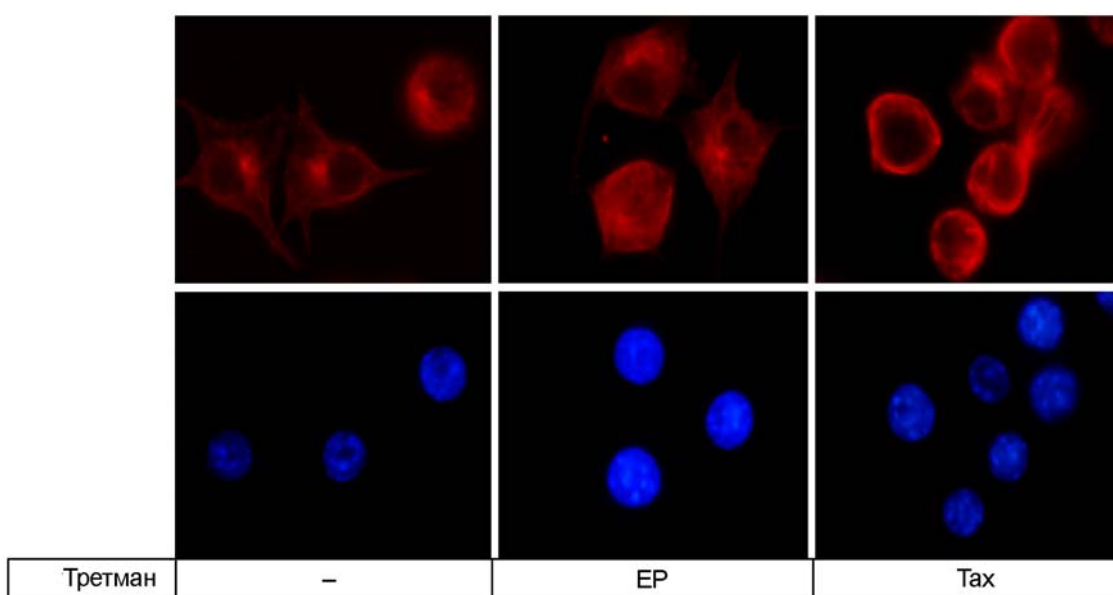


Слика 4.15. Утицај TGF-β, EP и Tax на пролиферацију RAW264.7 ћелија. Ћелије су три дана култивисане са: TGF-β (5ng/ml), EP (5μM) и Tax (1μg/ml), појединачно или у комбинацији као што је описано у поглављу Материјал и методе. Пролиферација ћелија је анализирана применом MTT теста (A) и CFSE методе (B). Приказани су репрезентативни хистограми једног од најмање три експеримента, а бројчане вредности представљају аритметичку средину процента ћелија које су ушле у деобу ± SD. *p<0,05; **p<0,01 у поређењу са контролним, нетретираним, ћелијама.

4.5.2. Ефекат естрамустин фосфата и таксола на микротубуларну структуру RAW264.7 ћелија

Познато је да ЕР омета полимеризацију микротубула као и њихову нормалну ћелијску динамику, док Так стабилизује микротубуле и индукује полимеризацију што чини цитоскелет претерано ригидним. Због тога је један од циљева истраживања било испитивање утицаја ових лекова на микротубуле МФ. Организација тубулина у RAW264.7 ћелијама анализирана је применом метода имунофлуоресценце.

Резултати приказани на микрографијама су показали да ЕР ремети микротубуларну структуру, чинећи је визуелно аморфном у односу на организацију микротубула у контролном узорку где је видљива мрежа филамената. Са друге стране, третман Так је снажно подстакао локализацију тубулина на периферији ћелија и/или организацију у задебљале снопове (Слика 4.16.).

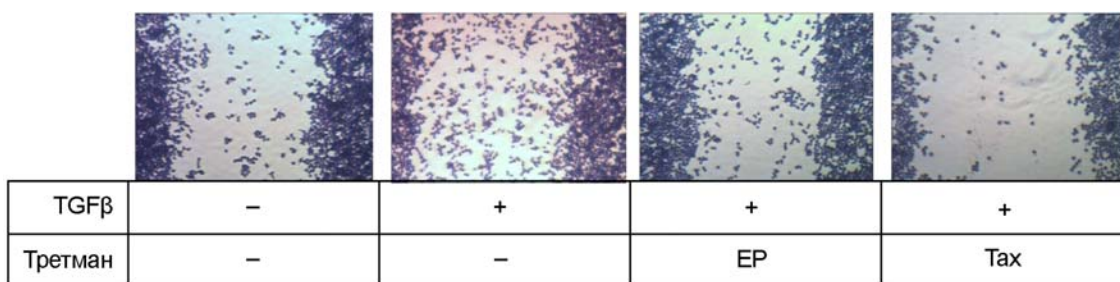


Слика 4.16. Утицај ЕР и Так на микротубуларну структуру RAW264.7 ћелија. Ћелије су 1 дан култивисане у присуству ЕР (5 μ М) или Так (1 μ g/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Тубулин је визуелизован применом анти-тубулинског антитела коњугованог TRIC-ом, а једра су обележена DAPI бојом. Организација тубулина је посматрана на епи-флуоресцентном микроскопу (СКХ41 *Olympus, Japan*). Приказане су репрезентативне микрографије једног од најмање три експеримента. Увеличање 400x.

4.5.3. Ефекат естрамустин фосфата и таксола на миграцију RAW264.7 ћелија

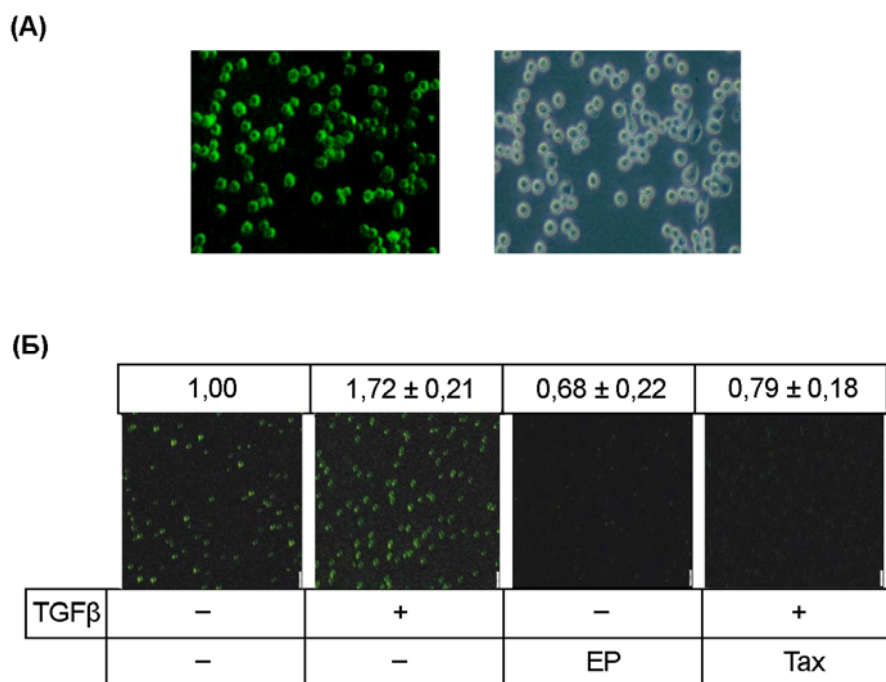
Покретљивост се сматра битном особином МФ за остваривање њихових биолошких улога. С обзиром да ЕР и Так ремете нормалну организацију микротубуларне мреже у ћелијама, у следећем низу експеримената тестиран је утицај ових лекова на миграцију RAW264.7 ћелија као и модулаторни ефекат TGF- β у овим процесима.

Миграциони потенцијал RAW264.7 ћелија је испитан *in vitro* тестом зарастања ране. Резултати теста су показали да TGF- β подстиче улазак ћелија у рану. Присуство лекова је умањивало овај ефекат TGF- β и то ЕР слабије, а Так израженије (Слика 4.17.).



Слика 4.17. Ефекат ЕР и Так на миграциони потенцијал у RAW264.7 ћелијама у присуству TGF- β . *Scratch* тест миграције RAW264.7 ћелија третираних ЕР (5 μ M), односно Так (1 μ g/ml), у присуству или одсуству TGF- β (5ng/ml) је изведен као што је описано у поглављу Материјал и методе. Након 24ч испитивано поље огреботине је фиксирано, обојено *Crystal violet* а миграција ћелија је анализирана на инвертном светлосном микроскопу (СКХ41 *Olympus, Japan*). Приказане су репрезентативне микрографије једног од најмање три експеримента. Увеличање 16х.

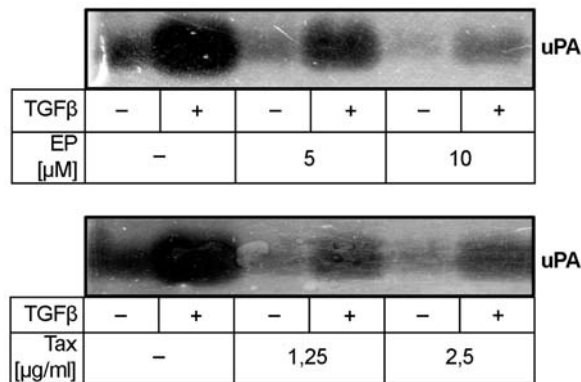
Друга метода којом смо испитали утицај ЕР и Так у присуству TGF- β на миграциони капацитет RAW264.7 ћелија је миграциони есеј са Бојденовом комором. Резултати теста су показали да TGF- β увећава инвазивни капацитет RAW264.7 ћелија, док га додаток ЕР или Так снажно инхибира (Слика 4.18.).



Слика 4.18. Утицај EP и Tax на миграциони капацитет RAW264.7 ћелија у присуству TGF-β. Ћелије су третиране најпре 2 сата EP (5μM) или Tax (1μg/ml), а затим 24ч култивисане у одсуству или присуству TGF-β (5ng/ml). Ћелије су обојене флуоресцентном бојом, CFSE (A) а потом је изведен миграциони есеј као што је описано у поглављу Материјал и методе (Б). Бројчане вредности представљају релативне односе броја ћелија у испитиваном узорку у односу на контролу ± SD. Приказане су репрезентативне микрографије једног од најмање три експеримента. Увеличање 40х.

4.5.4. Утицај естрамустин фосфата и таксола на продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама

Имајући на уму централну тему наших истраживања, као логичан следећи корак наметнуло се испитивање ефекта EP и Tax на продукцију uPA, као и утицај ових лекова на TGF-β индуковану стимулисану продукцију испитиваног ензима. Као и у претходним сегментима продукција uPA је испитана применом зимографије. Зимографија је показала да и EP и Tax када се примене појединачно у свим тестираним концентрацијама инхибирају базалну продукцију uPA. Такође, оба лека умањују стимулаторни ефекат TGF-β (Слика 4.19.).

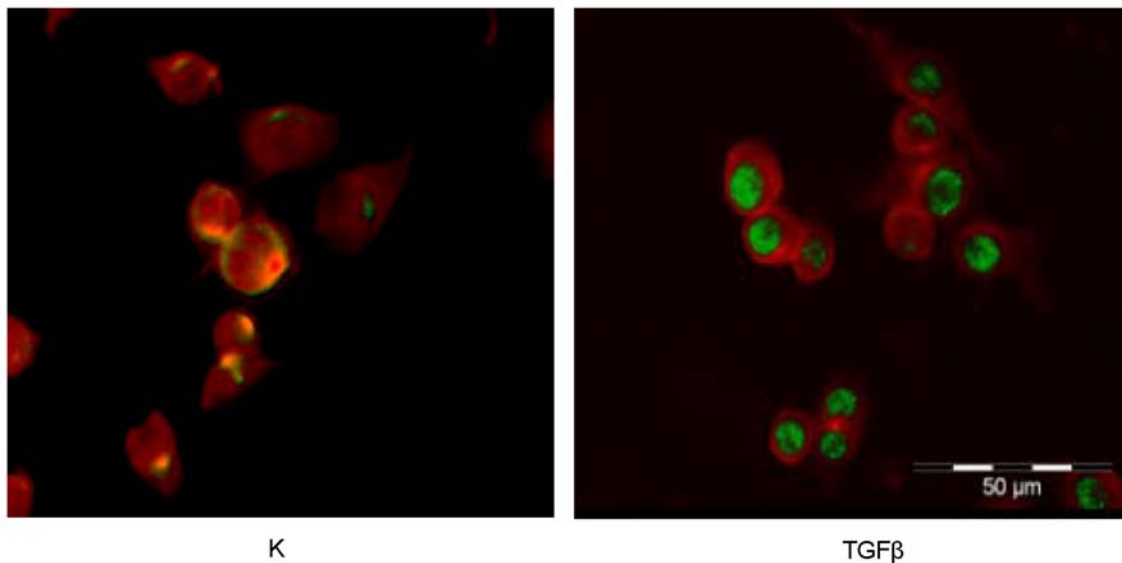


Слика 4.19. Утицај EP и Tax на базалну и TGF-β стимулисану продукцију секретоване урокиназе МФ у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су кутивисане најпре 2 сата са EP (5 и 10μM) или Tax (1,25 и 2,5μg/ml), а затим 24ч у одсуству или присуству TGF-β (5ng/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказане су репрезентативне зимографије једног од најмање три експеримента.

4.5.5. Утицај TGF-β на транслокацију молекула Smad3 у једро RAW264.7 ћелија.

Као што су резултати овог рада показали, Smad3 је један од кључних молекула у сигналном путу који се активира након ангажовања рецептора за TGF-β. Због тога је један од циљева нашег истраживања био да испитамо ћелијску локализацију Smad3 у ћелијама које су претходно кутивисане у присуству TGF-β. Применили смо метод имунофлуоресценце.

RAW264.7 ћелије су кутивисане један сат у присуству TGF-β, а затим је Smad3 визуелизован FITC-коњугованим секундарним антителом, а тубулин TRIC-коњугованим секундарним антителом. У нестимулисаним RAW264.7 ћелијама, Smad3 се налази у цитоплазми и испољава слабији интензитет флуоресценце. У TGF-β стимулисаним ћелијама, Smad3 се транслоцира у једро одакле емитује интензиван сигнал по целој површини једра (Слика 4.20.).



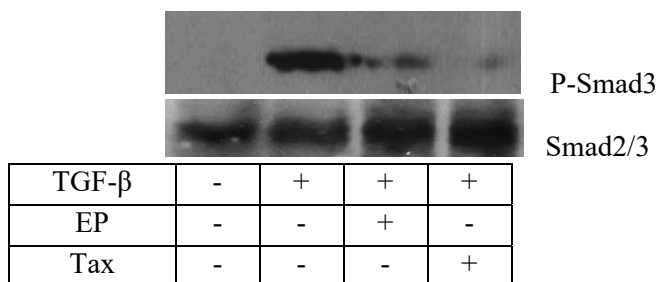
Слика 4.20. Утицај TGF- β на фосфорилацију и транслокацију Smad3 сигналног молекула у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су култивисане 1 сат у присуству TGF- β (5ng/ml), потом је P-Smad3 визуелизован FITC-коњугованим секундарним антителом, а тубулин TRIC-коњугованим секундарним антителом као што је описано у поглављу Материјал и методе. Унутарћелијска локализација протеина је визуелизована помоћу флуоресцентног микроскопа. (К, контролни узорак, TGF- β нестимулисане ћелије). Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента. Увеличање 400x.

4.5.6. Утицај естрамустина фосфата и таксола на TGF- β индуковану активност Smad3 сигналног молекула у RAW264.7 ћелијама.

Резултати овог рада су показали да EP и Tax умањују TGF- β индуковану стимулацију продукције uPA. Истовремено, показано је да је активација Smad3 сигналног пута један од механизма стимулаторног деловања TGF- β на продукцију uPA. Због тога је у наредним експериментима испитан утицај EP и Tax на активацију Smad3. Примењена су три методолошка приступа: Western blot анализа за детекцију степена фосфорилације, имунофлуоресценца за одређивање ћелијске локализације и трансфекција за транскрипциону активност овог молекула.

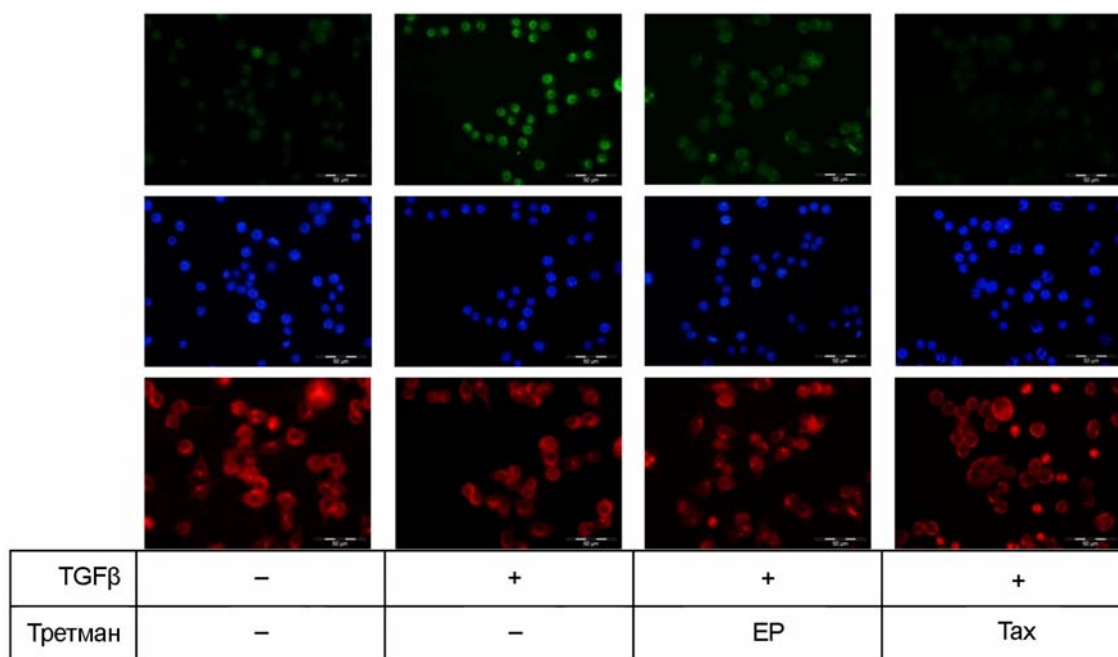
У циљу испитивања утицаја анти-туморских лекова на TGF- β индуковану фосфорилацију Smad3 молекула, RAW264.7 ћелије су култивисане сат времена у

присуству EP или Tax, а затим је додат TGF- β . Након 1 сата изоловани су ћелијски протеини. Добијени резултати су потврдили да TGF- β стимулише фосфорилацију Smad3, и показали да EP, односно Tax, значајно инхибирају овај ефекат (Слика 4.21.).



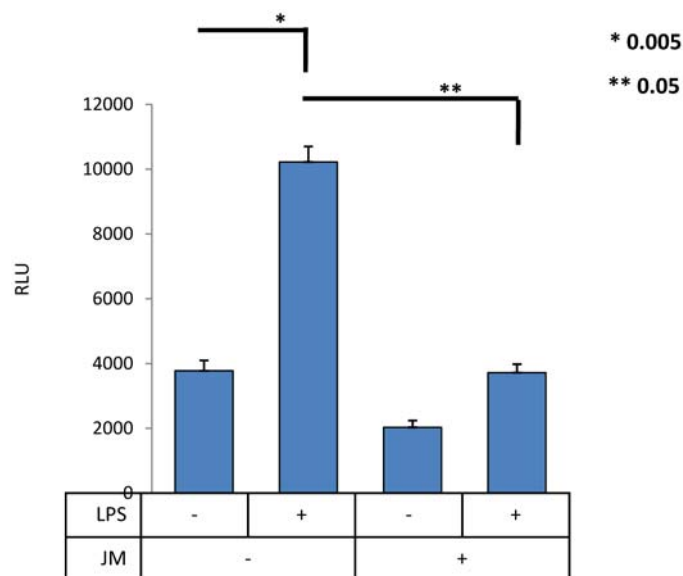
Слика 4.21. Ефекат естрамустина фосфата и таксола на TGF- β индуковану активност Smad3 у RAW264.7 ћелијама. Western blot анализа фосфорилације Smad3 сигналног молекула RAW264.7 ћелија третираних EP (5 μ M) или Tax (1 μ g/ml) као и утицај тестираних анти-туморских лекова на TGF- β (5ng/ml) индуковану активност Smad3 урађени су као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од најмање три експеримента.

За испитивање ћелијске локализације P-Smad3, ћелије су култивисане у присуству анти-туморских лекова или TGF- β . У циљу испитивања утицаја тестираних лекова на ефекат TGF- β ћелије су најпре култивисане два сата у присуству EP или Tax, а затим је додат TGF- β . Након 1 сата P-Smad3 је визуелизован применом FITC-коњугованог секундарног антитета, тубулин је визуелизован применом TRIC-коњугованог секундарног антитета, а једра су обојена DAPI-јем. Резултати приказани на микрографијама (Слика 4.22.) показују да TGF- β снажно активира Smad3 сигнални молекул, чије присуство, због једарне транслокације, постаје интензивно видљиво у једру третираних ћелија. Присуство EP инхибира стимулаторни учинак TGF- β што се манифестовало слабијим интензитетом флуоресценце обележених Smad3 молекула, док присуство Tax поништава ефекат TGF- β и своди интензитет флуоресценце обележених Smad3 молекула на ниво контролних (TGF- β нестимулисаних и лековима нетретираних ћелија).



Слика 4.22. Утицај EP и Tax на TGF-β индуковану активност Smad3 сигналног молекула у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су култивисане 2 сата у присуству EP (5μM) или Tax (1μg/ml), затим 1 сат уз додатак TGF-β (5ng/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. P-Smad3 је визуелизован применом FITC-коњугованог секундарног антитела, тубулин TRIC-коњугованог секундарног антитела, а једра су обележена DAPI бојом. Активација Smad3 молекула и организација тубулина су анализирани на флуоресцентном микроскопу (CKX41 Olympus, Јапан). Приказане су репрезентативне микрографије једног од најмање три експеримента. Увеличање 400x.

Један од циљева наших истраживања је био да испитамо утицај EP и Tax на транскрипциону активност Smad3. У том циљу RAW264.7 ћелије су ко-трансфектоване експресионим плазмидом CAGAC-luc и SV40-β-Gal репортер-плазмидом. Затим су третирани EP или Tax, у присуству или одсуству TGF-β. Добијени резултати су показали да је TGF-β увећао трансактивност Smad3 репортерског плазида, а да EP и Tax, када се примене појединачно, нису мењали транскрипциону активност у поређењу са контролним (нетретираним) ћелијама. Примењени у комбинацији са цитокином, EP и Tax су редуковали TGF-β индуковану стимулацију транскрипционе активности Smad3 (Слика 4.23.).

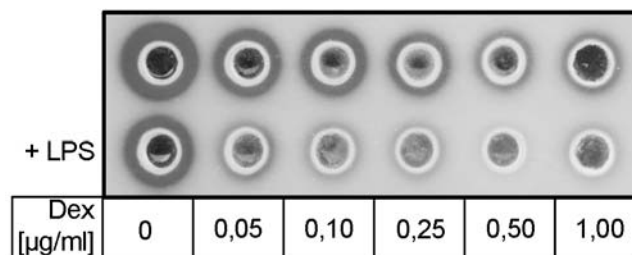


Слика 4.23. Ефекат EP и Tax на спонтану и TGF- β индуковану транскрипциону активност Smad3 у RAW264.7 ћелијама. RAW264.7 ћелије су ко-трансфектоване CAGAC-luc и SV40- β -Gal репортер-плазмидом. Потом су третиране EP (5 μ M) или Tax (1 μ g/ml), у присуству или одсуству TGF- β (5ng/ml) као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказани су репрезентативни резултати једног од три експеримента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ у поређењу са TGF- β стимулираним ћелијама које нису третиране анти-туморским лековима.

4.6. Ефекат дексаметазона на макрофаге

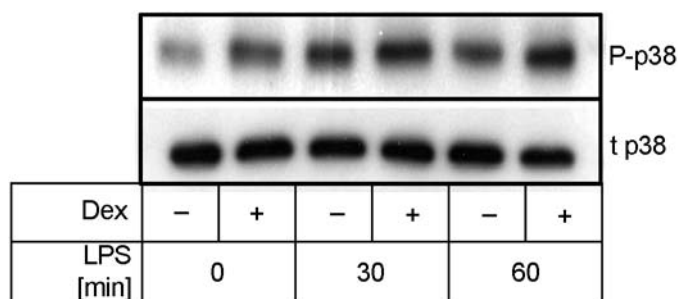
4.6.1. Утицај дексаметазона на LPS-ом индуковану инхибицију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама

Финални део истраживања се односио на испитивање улоге дексаметазона у продукцији uPA, како од стране нестимулисаних RAW264.7 ћелија тако и у условима деловања LPS-а као стимулуса. Радијалном зимографијом испитан је ефекат растућих концентрација дексаметазона (0-1 μ g/ml) на продукцију секретоване uPA. Резултати су показали да дексаметазон дозно зависно инхибира продукцију ензима, док у садејству са LPS-ом готово у потпуности инхибира продукцију uPA (Слика 4.24.).



Слика 4.24. Утицај дексаметазона на LPS-ом индуковану продукцију секретоване uPA у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су третиране различитим концентрацијама дексаметазона (0-1µg/ml) у одсуству или присуству LPS-а (0.1µg/ml) а потом је урађена зимографија супернатанта третираних ћелија као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказана је репрезентативна зимографија једног од најмање три експеримента.

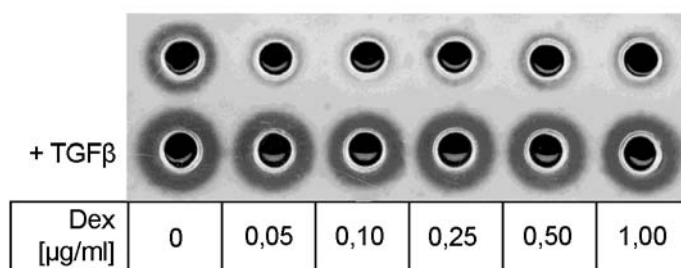
Како LPS инхибира uPA посредством p38 MAPK сигналног пута, ово истраживање је проширено и испитан је утицај дексаметазона на фосфорилацију молекула p38. Резултати Western blot анализе су показали да и дексаметазон и LPS када се примене самостално активирају p38, док заједно показују адитивно дејство (Слика 4.25.).



Слика 4.25. Утицај дексаметазона и LPS-а на активацију p38 у RAW264.7 ћелијама. Активација p38 је анализирана Western blot анализом. Ћелије су најпре третиране Dex (0.5µg/ml) у присуству или одсуству LPS-а (0.1µg/ml) а потом је активација p38 анализирана Western blot анализом као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказан је репрезентативни резултат једног од најмање три експеримента.

4.6.2. Утицај дексаметазона на TGF- β индуковану стимулацију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама

Утицај дексаметазона на TGF- β индуковану стимулацију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама је испитан применом радијалне зимографије. Резултати су показали да, упркос томе што дексаметазон самостално смањује, а TGF- β стимулише продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама, дексаметазон нема утицаја на стимулаторни ефекат TGF- β на продукцију uPA у испитиваним ћелијама (Слика 4.26.).



Слика 4.26. Утицај дексаметазона на TGF- β индуковану продукцију секретоване uPA у RAW264.7 ћелијама. Ћелије су третиране различитим концентрацијама дексаметазона (0-1 $\mu\text{g/ml}$) у одсуству или присуству TGF- β (5ng/ml) а потом је урађена зимографија супернатанта третираних ћелија као што је описано у поглављу Материјал и методе. Приказана је репрезентативна зимографија једног од најмање три експеримента.

5. Дискусија

5.1. Утицај и механизми деловања LPS на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама

Макрофаги су важне ћелије у инфламацији и главни извор протеолитичких ензима који учествују у реорганизацији ЕСМ, као што су катепсини, хијалуронидазе, хепараназе, еластазе, систем uPA и матриксне металопротеиназе (*Liguori u cap., 2011*). Међу најважније протеазе спадају uPA и MMP9 због свог учешћа у различитим аспектима активности МФ (почевши од екстравазације и трансендотелне миграције). На пример, MMP9 је укључен у инфламацијски одговор, док систем uPA регулише хемотаксу МФ и репарацију ткива (*Carmeli u cap., 2004; Novak u cap., 2011; Verollet u cap., 2011*). Прецизна регулација активности ових ензима као и њихових инхибитора је неопходна за правилан ток имунског одговора. У случају одсуства или неадекватне регулације ових ензима може да дође до поремећаја физиолошког тока имунског одговора, као и настанка патолошких стања.

Механизми контроле експресије и активности протеолитичких ензима пореклом од МФ још увек нису сасвим расветљени. Ово се нарочито односи на многобројне аспекте трансдукције сигнала који потичу од кључних фактора активације и резолуције инфламације и њихове ефекте на макрофагну експресију ова два ензима укључена у реорганизацију ванћелијског матрикса. С обзиром да је LPS прототип проинфламацијског стимулуса, у овом истраживању је на моделу мишје моноцитно-макрофагне ћелијске линије RAW264.7 *in vitro* испитиван утицај овог молекула на експресију и активност uPA.

Досадашњи литературни подаци о утицају LPS на експресију uPA у МФ су донекле противречни, јер се могу наћи како резултати који показују како стимулаторни (*Gross u Sitrin, 1990; Politis u cap., 1991; Xidakis u cap., 2005*), тако и они који наводе инхибиторни ефекат (*Vairo u cap., 1992; Kung u Lau, 1993; Nakajima u cap., 2005; Hald u cap., 2012*). Као и потоњи, резултати приказани у овој докторској дисертацији показују инхибиторни утицај LPS на генску експресију и ензимску активност секретоване uPA у RAW264.7 ћелијама. Овај

ефекат је био присутан у свим испитиваним концентрацијама и био је дозно-зависан.

С једне стране, познато је да је концентрација uPA у крвотоку повећана у току ендотоксинског шока и сепсе (прекомерна системска инфламацијска реакција на LPS која доводи до оштећења и поремећаја функције већег броја органа и органских система, пре свега кардиоваскуларног и респираторног), као и да посредује у активацији неутрофилних гранулоцита коју индукује LPS (*Abraham u cap., 2003*). Стимулаторни утицај LPS на продукцију uPA је показан у епителним и стромалним ћелијама многих ткива (*Wu u Aird, 2005; Bodet u cap., 2007; Cheng u cap., 2009; Baldi u cap., 2012; Shetty u cap., 2012; Sugioka u cap., 2014*), као и у неким канцерским ћелијама, попут ћелија колоректалног карцинома и карцинома простате (*Ohta u cap., 2000; Killeen u cap., 2009*). Међутим утицај LPS на МФ је недовољно разјашњен. У неким типовима МФ, попут ТНР-1 Мо/МФ линије човека, млечних МФ говеда и Купферових ћелија пацова, LPS је довео до повећања продукције uPA (*Gross u Sitrin, 1990; Politis u cap., 1991; Xidakis u cap., 2005*). Насупрот томе, LPS је супримирао продукцију uPA у перитонеалним МФ мишева C57/Bl соја, како резидентним, тако и оним активираним тиогликолатом (*Kung u Lau, 1993*). Сличан ефекат LPS је имао и у МФ костне сржи миша, као и у микроглијалним ћелијама пацова (*Vairo u cap., 1992; Nakajima u cap., 2005*). У RAW264.7 ћелијама, LPS је у истраживању Халда и сарадника већ након 6 сати четвороструко смањио експресију гена за uPA (*Hald u cap., 2012*). Истовремено, експресија гена за инхибитор ове протеазе, PAI-1, се драстично увећала већ након 2 сата стимулације путем LPS.

Међутим, о молекуларним механизмима деловања LPS на експресију uPA у МФ нема до сада објављених резултата. Познато је да се трансдукција LPS сигнала у RAW264.7 ћелијама остварује путем MAPK (*Vo u cap., 2014; Yu u cap., 2012*). У овој дисертацији, испитивање улоге путева преноса сигнала у којима учествују MAPK у одржавању базалног нивоа генске експресије и ензимске активности uPA у RAW264.7 ћелијама, показало је да је за одржање овог нивоа била неопходна активност ERK1/2 и JNK1/2. Активност p38 MAPK, с друге стране, ограничавала прекомерну базалну експресију uPA, која је уочена

приликом инхибиције активности ове киназе. У нестимулисаним RAW264.7 ћелијама најснажније се испољила трансактивација гена за JNK1/2, нешто мање ERK1/2, а најмање p38. Присуство LPS активира у RAW264.7 ћелијама прво p38, а касније и JNK1/2 сигнални пут, као и њихову генску транскрипцију, док на активност и транскрипцију ERK1/2 овај стимулус није показао значајан утицај. Примена специфичних хемијских инхибитора ових киназа је показала да инхибиција p38 MAPK онемогућава инхибиторни ефекат LPS на експресију гена и продукцију uPA. Наведени резултати упућују на учешће p38 MAPK као једног од кључних сигналних молекула укључених у механизам инхибиторног деловања LPS на експресију uPA у култури RAW264.7 ћелија. С обзиром да је, у границама доступних сазнања, реч о првим објављеним резултатима у вези са механизмом деловања LPS на експресију uPA у RAW264.7 ћелијама, потребно је да се ови резултати потврде даљим истраживањима, како на истом моделу, тако и на групи сродних модела за експериментално испитивање ћелијских функција. Од посебног је значаја утврдити да ли се описани феномен може уочити и у хуманим системима.

Стимулаторни ефекат LPS на експресију MMP9 у МФ је недвосмислено показан у многим студијама, а описан је и механизам његовог деловања (*Woo u cap., 2004; Rhee u cap., 2007; Dos Santos u cap., 2007; Mendes u cap., 2009; Hald u cap., 2012; Yang u cap., 2015*). MMP9 се у RAW264.7 ћелијама конститутивно експримира (*Hald u cap., 2012; Yang u cap., 2015*), што је показано и у резултатима ове студије. Халд и сарадници су показали да је у базалним условима ниво експресије *mmp9* гена 32 пута већи од нивоа експресије *mmp2* у RAW264.7 ћелијама (*Hald u cap., 2012*). LPS, у концентрацији од 0,1 µg/ml, значајно стимулише експресију већине испитиваних гена за MMP и овај ефекат је за *mmp9* уочљив већ шест сати од почетка стимулације. Рана експресија *mmp9* након LPS-стимулације описана је и код других аутора. Јанг и сарадници су забележили први значајно повећан ниво експресија овог гена након 8 сати, највећи након 12 сати, а пад након 36 сати култивације у присуству 0,1 µg/ml LPS (*Yang u cap., 2015*). Ово повећање генске експресије је праћено и порастом активности овог ензима у култури RAW264.7 ћелија, почев од 12. сата након LPS-стимулације, са врхунцем након 24 сата и падом активности након 36 сати. Из резултата приказаних у овој

дисертацији се такође види да LPS стимулаторно делује на продукцију овог ензима након 24 сата у култури, почев од најниже испитиване концентрације (0,1 µg/ml).

Интересантно је да истовремено са растом MMP опада експресија њихових инхибитора под утицајем LPS (*Hald u cap., 2012*). Базална експресија гена за TIMP1, са којим се MMP9 заједно секретује и чију активност регулише, је 128 пута нижа од експресије *timp2* у RAW264.7 ћелијама. Ипак, и она реагује на LPS малим падом експресије 6 сати од почетка стимулације. Експримирање *timp3* у овим ћелијама није нађено, док је експресија *timp4* ниска и неосетљива на LPS стимулус. Други аутори су међутим показали повећање продукције TIMP1 у RAW264.7 ћелијама током 24-часовне инкубације у присуству LPS, док је ово повећање било још израженије након поновне стимулације овим медијатором, што је довело до нето смањења активности MMP9 (ефекат толеранције на ендотоксин) (*Muthukuru u Cutler, 2015*). Стога би даља истраживања свакако требало да обухвате детаљно испитивање ефеката LPS на продукцију инхибитора протеолитичких ензима током инфламацијског одговора.

У сигналне путеве који утичу на продукцију MMP-9 у RAW264.7 ћелијама спадају MAPK, као и транскрипциони фактори NFκB и AP-1 (*Woo u cap., 2004; Mendes u cap., 2009; Yu u cap., 2012; Vo u cap., 2014*). Ву и сарадници су показали да је ROS-p38-AP-1 каскада у RAW264.7 ћелијама одговорна за транскрипцију *mmp9* (*Woo u cap., 2004*). Упркос томе што постоје бројна истраживања која показују да је NFκB кључни транскрипциони фактор за MMP9 (*Farrina u cap., 1999; Yang u cap., 2000; Yuan u cap., 2013; Vo u cap., 2014*), ови аутори нису нашли везу између активације p38 и активације NFκB. Други радови су такође показали стимулаторни ефекат p38 сигнала на експресију *mmp9*, као и ERK1/2, док је фосфорилација JNK1/2 имала супримирајуће дејство у МФ (*Lee u cap., 2009; Sacares u cap., 2010; Hassan u cap., 2012; Ahmad u cap., 2014*). Ри и сарадници су показали да LPS индукује транскрипцију *mmp9* гена у RAW264.7 ћелијама сигналним механизмом који укључује MyD88, TRAF6, ИкБа и NFκB (*Rhee u cap., 2007*). Мендез и сарадници су такође показали да LPS индукује транскрипцију

mmp9 у овим ћелијама, и то посредством p38 и ERK1/2 MAPK и NFκB транскрипционог фактора (*Dos Santos u cap., 2007; Mendes u cap., 2009*).

5.2. Утицај и механизми деловања TGFβ на продукцију uPA и MMP9 RAW264.7 ћелијама

Један од циљева у овој дисертацији било је испитивање утицаја TGF-β на продукцију MMP9 и uPA у макрофагима и утврђивање који од TGF-β сигналних путева учествује у промени експресије MMP9 и uPA у макрофагима.

Показано је да TGF-β у култури RAW264.7 ћелија, значајно инхибира генску транскрипцију и ензимску активност секретоване MMP9. Насупрот томе, TGF-β увећава продукцију ћелијске и секретоване uPA. Овај ефекат се постиже на нивоу протеинске синтезе, што се види на основу пораста количине иРНК за uPA у ћелији, као и значајно умањене количине секретоване активне uPA након дејства инхибитора протеинске синтезе, циклохексимида. Транскрипција гена за uPA се у МФ костне сржи миша брзо обуставља након престанка деловања стимулуса (као што је CSF-1), док иРНК остаје стабилна још неко време након тога, са временом полуживота од 2 сата (*Stacey u cap., 1994*). Регулацији uPA иРНК доприносе транскрипциони и пост-транскрипциони механизми (*Fawless u cap., 2000*).

У резултатима ове дисертације, као и у литератури (*Cassady u cap., 1991*), показано је да је uPA конститутивно експримирана у RAW264.7 ћелијама, а TGF-β додатно повећава ниво ове експресије. Како би се испитао механизам којим TGF-β стимулише експресију uPA, анализирано је неколико путева интрацелуларне сигналне трансдукције. TGF-β углавном стимулише Smad2/3, ERK1/2 и JNK1/2, слабије p38, док активност NFκB инхибира. Употребом специфичних хемијских инхибитора, утврђено је да TGF-β утиче на продукцију uPA кроз ALK5 рецептор и Smad2/3, ERK1/2 и JNK1/2 сигналне путеве, док инхибиција p38 није утицала на ефекат TGF-β на uPA. Ови подаци сугеришу да би продукцију uPA могло да регулише више сигналних путева.

Према резултатима ове студије, изгледа да у базалним условима Smad-зависни и Smad-независни путеви сарађују у регулацији експресије MMP9. Smad2/3, ERK1/2, p38 и NFκB, са благо различитим учешћем, одржавају базалну активност ензима и генску експресију, док би JNK1/2 инхибицијом прекомерне експресије могао да буде укључен у одржавање базалног нивоа, што је сагласно претходним резултатима који указују да у RAW264.7 ћелијама JNK1/2 инхибира експресију MMP9 (*Lee u cap., 2009*). Интересантно је да инхибиција JNK1/2 има различиту улогу у базалном нивоу експресије uPA и MMP9, јер инхибитор JNK1/2 снажно увећава експресију MMP9, док значајно смањује продукцију uPA.

У циљу утврђивања који сигнални путеви би могли бити укључени у инхибиторни ефекат TGFβ на транскрипцију и транслацију *mtmp9* гена, коришћени су специфични хемијски инхибитори Smad2 и Smad3, све три MAPK и NFκB. Ниједан од тестираних инхибитора није успео да спречи супресивни ефекат TGFβ на генску експресију и продукцију MMP9. Интересантно је да је TGFβ у присуству инхибитора JNK1/2 могао и даље да супримира експресију MMP9, што је неочекивано с обзиром на горе наведено инхибиторно дејство JNK1/2 на MMP9. Даља истраживања би могла да расветле механизме и предуслове супресивног деловања TGFβ на продукцију MMP9.

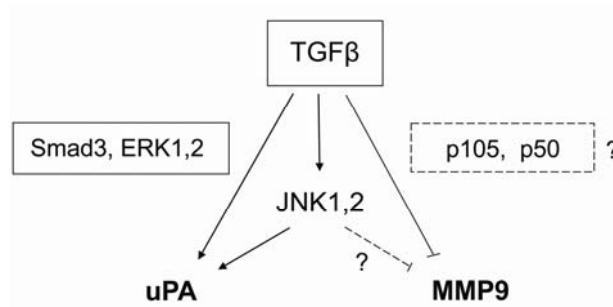
У литератури се могу наћи подаци да TGFβ путем NFκB делује инхибиторно на *mtmp9* промотор у RAW264.7 ћелијама (*Ogawa u cap., 2004*). Аутори су показали да TGFβ не спречава везивање p65/p50 димера за место везивања NFκB на ДНК, али нису дали објашњење механизма инхибиторног дејства. Резултати приказани у овој дисертацији по први пут дају могуће објашњење овог дејства. Наиме, испитивање активности NFκB транскрипционог фактора у RAW264.7 ћелијама након TGFβ стимулуса је показало да се у цитоплазми третираних ћелија не мења количина присутних p65, али расте количина p50 субјединица, а нарочито p105 прекурсора. Анализом једарних протеина, могло се уочити да TGFβ стимулус умањује количину p65 субјединица присутних у једру, не мења присуство p105, али зато увећава количину p50 субјединица.

Како је p105 прекурсор p50 протеина, увећање количине p105 у цитоплазми би се могло објаснити увећањем транскрипције и синтезе p105 за

потребе продукције p50. У експресији *nf-kb1* гена постоји позитивна повратна спрега у којој p50/p50 хомодимери стимулишу експресију сопственог гена (*Budinova u cap., 1999*). p105 је кратко након синтезе слободан у цитоплазми за обраду до p50 протеина. Након тога, формира стабилне инхибиторне комплексе са протеинима NFκB фамилије и другим протеинима и као такав се задржава у цитоплазми (*Moorthy u cap., 2006*). На то указују резултати по којима се новосинтетисани p105 брже обрађује до p50 од оних који су акумулирани у цитоплазми у комплексима (*Harhaj u cap., 1996*). Осим тога, p105 формирањем комплекса са p65 и његовим задржавањем у цитоплазми фаворизује стварање инхибиторних хомодимера p50/p50 у једру (*Mercurio u cap., 1993, Savinova u cap., 2009*). Сличан механизам је описан и за ефекат у ком IL-10 инхибира експресију инфламацијских гена у Мо и МФ: p65 се задржава у цитоплазми, а подстиче се улазак инхибиторних p50/p50 хомодимера који се потом везују за ДНК (*Driessler u cap. 2004*).

Промотор *mtpr9* гена, осим места везивања за NFκB, има место везивања и за AP-1 транскрипциони фактор, који такође утиче на *mtpr9* експресију (*Benbow u cap., 1997*). Показано је да активација JNK1/2 може да изазове смештање AP-1 транскрипционог комплекса на промоторе претходно активирани од стране NFκB, и при том изазове смањење везивања NFκB за свој промотор (*Kim u cap., 2005*). Иако различити механизми регулишу NFκB и AP-1 транскрипционе факторе, изгледа да их бројни стимулуси активирају истовремено (*Fujioka u cap., 2004*). Интересантно је да активирање MAPK води активацији JNK и IKK комплекса (*Lee u cap., 1997; Lee u cap., 2002; Yang u cap., 2001*). Могуће је да NFκB и AP-1 узајамно модулишу своје активности (*Fujioka u cap., 2004*).

На основу наведеног, могло би се закључити да TGFβ смањује експресију MMP9 активацијом JNK1/2 и инхибицијом NFκB, независно један од другог, што је у сагласности са налазом да је TGFβ у стању да редукује експресију MMP9 чак и у присуству инхибитора JNK1/2. Изнети резултати упућују на закључак да TGFβ стимулише експресију uPA у RAW264.7 ћелијама углавном активацијом Smad3, ERK1/2 и JNK1/2 сигналних молекула, док истовремено смањује експресију MMP9 путем активације JNK1/2 и инхибиције NFκB, независно од Smad3 (Слика 5.1.).



Слика 5.1. Схематски приказ могућих путева утицаја TGFβ на експресију uPA и MMP9

5.3. Збирни утицај LPS и TGFβ на продукцију uPA и MMP9 у RAW264.7 ћелијама

Испитивањем истовременог утицаја TGFβ и LPS на ензимску активност секретованих uPA у култури RAW264.7 ћелија, у овој студији је показано да преовладава стимулаторни утицај TGFβ, иако је интензитет ензимске активности секретованих uPA под оваквим околностима умањен у односу на околности у којима TGFβ делује самостално.

Испитивање ефекта на продукцију MMP9 у сличним околностима показало је да TGFβ инхибира LPS стимулисану генску транскрипцију и ензимску активност MMP9 у перитонеалним МФ миша (*Xie и сар., 1994*), као и у моноцитној ћелијској линији човека MM6 и RAW264.7 ћелијама (*Ogawa и сар., 2004*).

Може се претпоставити да је ово један од механизма којим се у ткивима на нивоу активности МФ регулише прелаз из проинфламацијске фазе инфламације у прорезолуцијску. Чим у инфламаторној микросредини концентрација LPS опадне, а концентрација TGFβ порасте, тј. њихов међусобни однос се промени у корист TGFβ, МФ реагују на ту промену и у њима почиње да преовладава прорезолуцијски програм обнове ЕСМ: инхибира се продукција MMP9, а стимулише продукција uPA.

Извесни подаци добијени *in vivo* у сагласности су са горе наведеним запажањима. Доминантан утицај TGF- β у односу на ефекте LPS уочен је на нивоу стимулације експресије инфламацијских цитокина код миша. Септички шок који се јавља у инфекцијама Грам-негативним бактеријама изазван је каскадом инфламацијских цитокина. Неколико студија је показало да TGF- β инхибира септични шок супресијом експресије LPS индукованих инфламаторних цитокина, као и да се на нивоу МФ то остварује супресијом транскрипционог фактора AP-1 (*Imai u cap., 2000*).

5.4. Утицај поларизације RAW264.7 ћелија на продукцију uPA и MMP-9

Спектар различитих активационих стања МФ се креће од проинфламацијског, класично активираних или M1 функционалног фенотипа, до анти-инфламацијског или прорезолуцијског, алтернативно активираних, M2 функционалног фенотипа, а међу многобројним факторима који утичу на ову поларизацију су IFN γ и/или LPS, као класични активатори, и IL-4, IL-10, TGF β , глукокортикоиди и многи други, који доводе до разних видова алтернативне активације МФ (*Murray u cap., 2014*). Једна од главних фенотипских одлика M1 и M2 МФ се огледа у правцу у ком је усмерен метаболизам аргинина. У M1 МФ се активира iNOS и следствено доводи до повећане продукције NO, који је у високим концентрацијама токсичан за микроорганизме и инхибира ћелијску деобу, док је у M2 МФ активна аргиназа-1, која разлаже аргинин до орнитина, аминокиселине која је укључена у синтезу полиамина и колагена, те је важна за ћелијску деобу и изградњу ванћелијског матрикса (*Mills u cap., 2014*).

У истраживањима описаним у овој дисертацији, RAW264.7 ћелије и МФ пореклом из костне сржи миша су стимулирани третманом LPS и IFN γ како би се усмерили ка M1 фенотипу, одн. третманом IL-4, како би се усмерили ка M2 функционалном фенотипу. Као што је очекивано, у обе испитиване популације МФ, RAW264.7 ћелијама и МФ пореклом из костне сржи, класична активација путем LPS и IFN γ је индуковала експресију iNOS, док је алтернативна активација путем IL-4 довела до повећане експресије аргиназе-1. У складу с тим, МФ

активирани путем LPS и IFN γ су продуковали далеко више NO у односу на неактивирани МФ, док се продукција овог молекула у МФ активираним путем IL-4 није значајно разликовала од контролне. Овим је потврђено да су стимулацијом испитиваних МФ комбинацијом LPS и IFN γ добијени класично активирани M1 МФ, док су стимулацијом путем IL-4 добијени МФ M2 функционалног фенотипа. Овај резултат одговара многобројним резултатима из литературе (*Mills u cap., 2000; Ming u cap., 2012; Lyamina u cap., 2012; Martinez u cap., 2014*).

У даљем току истраживања испитиван је утицај различитих путева активације МФ на продукцију протеаза ЕСМ у овим ћелијама. Анализа ензимске активности секретованог uPA је показала да класични активатори, LPS и IFN γ , инхибирају продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама, као и да је овај инхибиторни ефекат LPS и IFN γ у комбинацији још израженији у односу на ефекат самог LPS на продукцију uPA у овим ћелијама. Нажалост, добијени подаци не омогућују да се закључи да ли је реч о адитивном или супраадитивном ефекту. Као што је већ наведено у одговарајућем одељку, TGF β је стимулисао продукцију uPA. Помало неочекивано, ефекат канонског активатора M2 фенотипа МФ, IL-4, на продукцију uPA је био инхибиторан. Имајући у виду улогу uPA у обнављању ЕСМ и фибрози, очекивало би се да M2 МФ, који су такође укључени у ове процесе, повећано продукују овај ензим. За uPA је показано да је од кључног значаја за M2 поларизацију МФ и следствени развој фиброзе током репарације миокарда након претрпљеног инфаркта (*Mezmarich u cap., 2013; Carlson u cap., 2016*). Ипак, разлике у експресији маркера M2 фенотипа МФ у различитим контекстима су показане за већину ових маркера, укључујући и аргиназу-1 (*Jin u cap., 2015; Roszer, 2015*). Поред тога, ваља имати на уму и чињеницу да uPA по много чему не представља типични маркер M2 фенотипа.

Са циљем утврђивања да ли постоји разлика у функционалном одговору примарних МФ добијених из костне сржи у поређењу са МФ ћелијске линије RAW264.7, применом већ поменутих M1 и M2 стимулуса у овом истраживању индуковани су код примарних МФ функционални фенотип M1, односно M2. Резултати анализе поларизованих примарних МФ су показали да LPS самостално или у садејству са IFN γ инхибирао продукцију uPA, што је у складу са резултатима добијеним на RAW264.7 ћелијама. TGF β је пак, као и код потоњих,

снажно стимулисао продукцију uPA, а ихибирао MMP9. Међутим, ефекат IL-4 се разликовао код ова два типа ћелија: док је у RAW264.7 ћелијама инхибирао продукцију uPA, у примарним МФ је ову продукцију стимулисао. Ова разлика између ћелијске линије и примарних МФ, могла би да се објасни различитим особинама ових ћелија које произилазе из њиховог порекла, а евентуално и различитих видова *in vivo* модулације који су могући код примарних ћелија. Наиме, примарни МФ су настали индукцијом адхерентних ћелија костне сржи, те је то мешовита популација ћелија и међу њима нису нужно све ћелије подједнако диференцирани МФ, док су све RAW264.7 ћелије међусобно истоветне, те је логично да уједначено реагују на факторе присутне у ћелијском медијуму.

Код примарних МФ је уочено и да су под различитим третманима ове ћелије попримале различите морфолошке одлике. Ћелије које су биле третиране M1 стимулусима (LPS и IFN γ) имале су претежно заобљен облик, док су МФ третирани путем IL-4 (M2 стимулус) постали упадљиво издужени и вретенасти. Недавно је испитиван и повратни утицај облика ћелија на поларизацију МФ костне сржи мишева (*McWhorter u cap., 2013*). Аутори су показали да издуживање МФ усмерава ћелије ка M2 фенотипу: постојао је тренд редукције проинфламацијских цитокина и увећања експримирања M2 маркера. Издужени МФ су слабије експримирали iNOS на стимулацију LPS и IFN γ , али су интензивније реаговали на третман IL-4 и IL-13. Осим тога, ћелије које су биле онемогућене да се издуже, нису испољиле пун капацитет M2 поларизације.

Када су у питању потенцијални механизми који леже у основи описаних ефеката, резултати ове докторске дисертације су показали да LPS стимулацијом p38 MAPK остварује инхибиторни ефекат на продукцију uPA у RAW264.7 ћелијама. Тиме се спречава синтеза ензима који би подстицањем разлагања фибрина могао деструктивно да утиче на процес полагања елемената везивног ткива. Истовремено, LPS у овим ћелијама истим путем подстиче синтезу и активност iNOS и следственоу продукцију NO (*Kim u cap., 2009; Pansanit 2013; Jin 2015*). Продукција NO је важна за МФ у његовој функцији у урођеном имунитету и главна одлика M1 функционалног фенотипа. Иако се главном одликом M2 функционалног фенотипа сматра синтеза и активност аргиназе 1, ипак се могу пронаћи подаци о томе да LPS у МФ / RAW264.7 ћелијама активира генску

транскрипцију и синтезу аргиназе 1 (*Jin u cap., 2015*), али не и да TGF- β стимулише продукцију NO. У почетној фази инфламације, за миграцију МФ кроз ткиво неопходна је експресија MMP9, што је, између осталог, управо резултат стимулације LPS. Главни транскрипциони фактор одговоран за стимулацију експресије MMP9 у МФ је p65/p50 NF κ B (*Farina u cap., 1999, Bond u cap., 1998*). Показано је да у различитим типовима ћелија различите MAPK доприносе регулацији гена *mmp9*, а у RAW246.7 ћелијама је то p38 (*Woo u cap., 2004*). Сматра се да би p38 могао да модулише активност NF κ B (*Saccani u cap., 2002; Lee u cap., 2009*) на RAW264.7 ћелијама. Могуће је да се то остварује нитрацијом тирозина на I κ B α путем iNOS, након чега се NF κ B одваја од свог инхибитора (*Lu, 2015*).

Не треба заборавити да NO настао активношћу iNOS у активираним МФ миша инхибира сопствени M1 функционални фенотип *in vitro* и *in vivo*. Селективном регулацијом експресије гена специфичних за M1, овај медијатор учествује у физиолошки важном ограничавању почетне фазе инфламације и започињању фазе резолуције (*Lu, 2015*). Активација NF κ B сигналних путева је строго контролисана и брзо се окончава. Пролозна активација NF κ B има физиолошки значај, јер би дуготрајна активација могла да има штетне, разарајуће, па чак и фаталне последице, што се локално дешава у акутној инфламацији, а системски у септичном шоку. Једна од потенцијалних последица на ћелијском нивоу је губитак контроле над ћелијским циклусом који води ка канцеру (*Xiao u Fu, 2011*). Кључна субјединица NF κ B за M2 функционални фенотип *in vitro* и *in vivo* јесте p50. Она раздваја M1 и M2 функционални фенотип тако што подстиче ангажовање полимеразе II на генима за M2 функционални фенотип (као што је аргиназа 1), а ограничава на M1 генима (као што је iNOS) (*Porta u cap., 2009*). Према резултатима из ове дисертације, TGF β инхибира продукцију MMP9 стимулацијом продукције молекула p105, који је прекурсор p50. Јасно је да је за исправно одвијање фазе резолуције инфламације неопходна продукција uPA, а TGF β стимулише продукцију uPA кроз Smad3 сигнални пут. Исти сигнални пут инхибира и продукцију iNOS (*Sugiyama u cap., 2012*).

5.5. Утицај анти tubулинских лекова и глукокортикоида на RAW264.7 ћелије

У терапији тумора примењују се фармаколошки агенси који интерагују са микротубулама и ремете равнотежу њихове изградње и разграђе (*Javeed 2009*). Деле се у две велике групе: оне који онемогућавају и оне који подстичу полимеризацију микротубула. Заједничко им је да обустављају митозу (*Ganguly и сар., 2010*).

У литератури је предложено више тумачења инхибиторног ефекта ЕР на микротубуле: од слабе интеракције са MAP (од енгл. *Microtubule-Associated Proteins*) (*Stearns и сар., 1988; Stearns и Tew, 1988*), преко везивања за тубулинске димере (*Laing и сар., 1997; Panda и сар., 1997*), до умерене инхибиције полимеризације тубулина без MAP (*Panda и сар., 1997*). У ћелијама глиома, ЕР изазива растављање микротубула и њихово повлачење са ћелијске периферије ка једру (*Perry и сар., 1995; Tew и сар., 1989*) и задржавање у G2/M фази ћелијског циклуса (*Stearns и сар., 1988; Speicher и сар., 1992; Walz и сар., 1998*). Могуће је да се места везивања ЕР и Тах за тубулин делимично преклапају (*Laing и сар., 1997*). Тах се везује за тубулин већ 15 минута од почетка третмана ћелија у култури и стабилизује их, што чини цитоскелет претерано ригидним, и блокира ћелијски циклус у G2/M фази (*Moos и Fitzpatrick, 1998*).

Резултати приказани у овој дисертацији су потврдили да ЕР ремети микротубуларну структуру, чинећи је визуелно аморфном у односу на организацију микротубула у контролном узорку где је била видљива мрежа филамената. Са друге стране, третман Тах је снажно подстакао локализацију тубулина на периферији ћелија и/или организацију у ригидне, задебљале снопове. Испитивање пролиферације RAW264.7 ћелија у култури у присуству ЕР или Тах је показало да ЕР не утиче на пролиферацију испитиваних ћелија, док је Тах инхибира. Могуће је да примењена концентрација ЕР нема утицаја на ћелијски циклус, већ само стабилност микротубула.

Фармаколошки утицаји Тах на МФ превазилазе ефекте стабилизације микротубула, јер Тах индукује експресију бројних гена: цитокина, транскрипционих фактора са тумор-супресивним ефектом, ензима који управљају пролиферацијом, апоптозом и инфламацијом (*Moos и Fitzpatrick, 1998; Hao и сар.,*

2012). Тах у МФ и RAW264.7 ћелијама индукује продукцију NO, као и TNF α који подстиче њихову апоптозу, те је могуће да је то један од механизма који је у основи инхибиције пролиферације RAW264.7 ћелија у култури у присуству Тах.

Испитивање утицаја TGF- β на миграцију RAW264.7 ћелија у овој студији, показало је да TGF- β подстиче миграцију RAW264.7 ћелија у *in vitro* моделу зарастања ране и тесту миграције са Бојденовом комором. Додавање ЕР у ћелијске културе је умањило стимулаторни ефекат TGF β на миграцију RAW264.7 ћелија у простор „ране“, до нивоа спонтане миграције нетретираних ћелија, док је додавање Тах снажно инхибирало миграцију ових ћелија, чак испод нивоа њихове спонтане миграције. Поред тога, у тесту миграције са Бојденовом комором, TGF β је индуковао миграцију RAW264.7 ћелија кроз поре мембране, коју су ЕР и Тах снажно инхибирали.

У литератури има података да Тах инхибира миграцију супримирањем динамике микротубула. Анализа миграције На β 3-5 ћелија (ћелијска линија јајника хрчка) показала је да Тах не мења правац кретања, већ продужава паузе између ћелијских покрета (*Ganguly и сар., 2011*). С озбиром на значај uPA у ћелијској миграцији, у овој студији испитан је ефекат ЕР и Тах на активност секретоване uPA. Резултати су показали да и ЕР и Тах инхибирају базалну продукцију uPA, али и да умањују стимулаторни ефекат TGF β на продукцију uPA. То би могло да буде од значаја за дизајнирање нових терапијских протокола базираних на супстанцама из ове групе у лечењу како неопластичних, тако и хроничних инфламацијских процеса.

Како су претходно описани резултати ове студије показали, активација Smad3 сигналног пута је један од механизма стимулаторног деловања TGF- β на продукцију uPA. Због тога је испитан ефекат дејства ЕР и Тах на активацију Smad3. У нестимулисаним RAW264.7 ћелијама, имунофлуоресцентно обележени Smad3 се налазио неактиван у цитоплазми и испољавао је слабији интензитет флуоресценце. У ћелијама стимулираним путем TGF β , Smad3 се транслоцирао у једро одакле је емитовао интензиван флуоресцентни сигнал по целој површини једра. Присуство ЕР је инхибирало стимулаторни ефекат TGF- β што се манифестовало слабијим интензитетом флуоресценце обележених Smad3 молекула, док је присуство Тах поништавало овај ефекат TGF- β и свело интензитет

флуоресценце обележених Smad3 молекула на ниво контролних ћелија. Осим тога, резултати добијени Western Blot анализом су потврдили да TGF β стимулише фосфорилацију Smad3, а да ER и Tax значајно инхибирају овај ефекат.

На примеру неколико ендотелних, епителних и туморских ћелијских линија (CCL64, Mv1Lu, R1b, DR26, HeLa) показано је да се сигнални молекули Smad2/3/4 специфично везују за микротубуле (*Dong u cap., 2000*). Ово везивање је независно од ћелијског циклуса и TGF β -стимулуса. На TGF β стимулус, Smad2/3 молекули дисоцирају из комплекса са тубулином, фосфорилишу се и премештају у једро где утичу на генску транскрипцију. Оваква ћелијска локализација Smad молекула има важну улогу у ефикасној иницијацији и одржавању сигналног пута: спречава се неадекватна транскрипциона активност Smad молекула у одсуству TGF- β сигнала, регулише се интеракција Smad молекула са рецепторском киназом и следствена активација, и контролише се премештање у једро активiranог Smad молекула.

Антитуморски лекови, никодазол и колхицин, као и прекомерна експресија α -C19 γ тус (мутирани облик α -тубулина), дестабилизују микротубулинску структуру, па се Smad2/3 молекули ослобађају и активирају и без TGF- β стимулуса. Међутим, Tax инхибира Smad2/3 молекуле активирание овим факторима, чак и у присуству TGF- β стимулуса. Tax на микротубуларну структуру делује тако што је стабилизује, те Smad2/3 молекули остају везани за тубулин, онемогућени да интерагују са TGF- β рецептором који их фосфорилише (*Dong u cap., 2000*).

Све више резултата из литературе указује да смањење дозе цитотоксичних антитуморских агенаса и комбинована хемотерапија могу не само да смање токсичност хемотерапије него и да увећају њену ефикасност, јер у нижој концентрацији остварују утицај на диференцијацију и активност имунских регулаторних и ефекторских ћелија (*Hellal u cap., 2011; Sun u cap., 2011; Zhou u cap., 2010; Mirzapoizova u cap., 2007*).

Примена изразито ниских нетоксичних доза Tax (1mg/kg, код C57BL/6 соја мишева) значајно смањује продукцију хроничних инфламацијских медијатора, као што су TGF β , GM-SCF, IL-1 β , IL-10, TNF α , IFN γ , у примарним туморима. Антитуморски ефекат Tax је доведен у везу са обнављањем имуносупресије и

кроз обнављање активности CD8 T ћелија у туморској микросредини и продуженим преживљавањем мишева са тумором (*Sevko u cap., 2013*).

Смањење укупне продукције инфламацијских медијатора у примарним туморима могло би да омогући преусмеравање већег броја TAM ка анти-туморским активностима. Познато је да Тах стимулише МФ да продукују висок ниво NO, TNF α и IL-1 β (*Hao 2012*). Овако стимулисани МФ могу да увећају цитотоксичност усмерену ка туморским ћелијама, као и да обнове продукцију IL-12 у мишевима са тумором (*Siveen u Kuttan, 2009*).

Осим што инхибирају утицај TGF β на МФ, EP и Тах би својим инхибиторним деловањем на продукцију uPA у TAM могли да смање интензитет активације латентних TGF β молекула присутних у туморској микросредини, а тиме и њихов утицај на развој тумора. Све ово би могло да допринесе преусмеравању функционалног фенотипа TAM од M2 ка M1. Поред тога, EP и Тах имају инхибиторни ефекат и на миграцију ћелија која је важан сегмент развоја тумора и метастазирања. Овај ефекат се кроз инхибицију продукције uPA постиже на више нивоа: 1) смањена је мезенхимска покретљивост МФ кроз матрикс, 2) смањује се продукција активних молекула плазмина, који активирају MMP9 који је такође неопходан за метастазирање, и 3) смањује се могућност повратног стимулаторног дејства MMP9 на продукцију uPA. Ипак, треба имати у виду и да туморски супернатант и његове компоненте, TGF β и IL-10, ремете стимулаторни ефекат Тах на RAW264.7 ћелије да продукују висок ниво NO, TNF α и IL-12 *in vitro* (*Mullins u cap., 2001*).

Дексаметазон је анти-инфламацијски агенс који се користи као помоћно или главно терапијско средство у лечењу тумора (*Kaal u Vecht, 2004; Kassi u Moutsatsou, 2011; Torimoto u cap., 2015; Jackson u cap., 2016*). Dex инхибира продукцију uPA у ћелијама карциномске линије SCC планоцелуларног карцинома човека (*Verru u cap., 2002*). Такође, Dex инхибира транскрипцију uPA и у HT1080 ћелијама фибросаркома човека и тиме онемогућава њихову миграцију кроз меки агар, што је модел систем за миграцију ћелија кроз ткиво (*Kondoh u cap., 1998*). Овај резултат је добио својеврсну потврду у експериментима који су показали да Dex дозно зависно инхибира миграцију TNP-1 ћелија *in vivo* (*Ichimura u cap., 2013*).

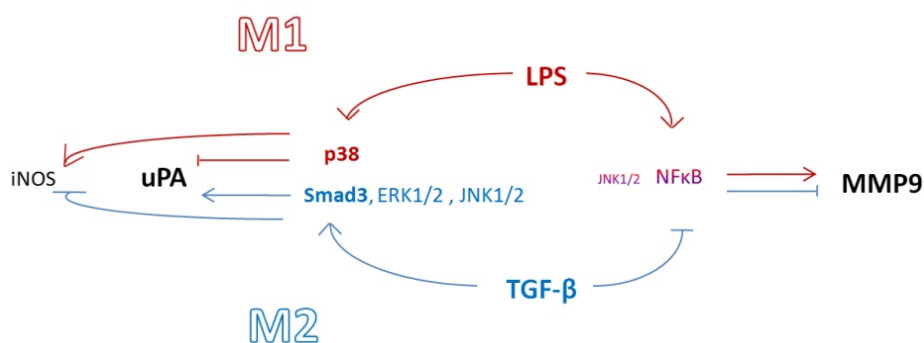
Недавно је показано да се RAW264.7 ћелије, употребљене као модел TAM, један дан након интравенског уноса у мишеве са тумором, смештају у туморско ткиво и ту се задржавају (Choi *и сар.*, 2016). Третирање мишева са Dex од момента уноса ћелија, онемогућило је улазак RAW264.7 ћелија у туморско ткиво и његов следствени раст који би иначе подстакла активност ових ћелија. Аутори публикације нису истраживали механизме у основи овог ефекта Dex.

Имајући у виду улогу uPA у миграцији МФ, у овој дисертацији је испитан утицај Dex у продукцији uPA, како од стране нестимулисаних RAW264.7 ћелија, тако и у условима деловања LPS или TGF- β као про- и анти-инфламацијских стимулуса. Резултати су, као и код других аутора, показали да дексаметазон дозно зависно инхибира продукцију овог ензима. У садејству Dex са LPS показано је да је продукција uPA готово у потпуности инхибирана. Како LPS инхибира uPA посредством p38 MAPK сигналног пута, испитан је утицај Dex на фосфорилацију молекула p38. Резултати Western Blot анализе су показали да и Dex и LPS, када се примене самостално, активирају p38, док заједно показују адитивно дејство.

У овој студији испитиван је и утицај Dex на продукцију uPA у присуству анти-инфламацијског фактора TGF β у култури RAW264.7 ћелија. Резултати су показали да, упркос томе што Dex самостално смањује, а TGF β самостално стимулише продукцију uPA, Dex нема утицаја на стимулаторни ефекат TGF β на продукцију uPA у испитиваним ћелијама. Резултат би се могао објаснити различитим сигналним путевима којима ови фактори остварују свој утицај на продукцију uPA: TGF β користи Smad3 сигнални пут за стимулацију продукције uPA у RAW264.7 ћелијама, док Dex користи p38. У датим условима и примењеним концентрацијама TGF β и Dex, ако се и активира p38 сигнални пут, из за сада непознатих разлога, на продукцију uPA доминантно утиче активност Smad3 молекула. Није искључено да TGF- β инхибира p38 сигнализацију стимулисану путем Dex. Потребна су додатна истраживања да би се разјаснио механизам овог ефекта.

Како Dex делује као инхибитор проинфламацијских цитокина, могуће је да његова примена резултује смањењем проинфламацијских цитокина у тумору и у серуму. Његов утицај на МФ би могао да допринесе антитуморском ефекту: смањење продукције uPA, као неопходног фактора МФ миграције, онемогућава

улазак нових МФ у ткиво тумора, а тиме би могао да се смањи и ниво проинфламацијских цитокина које би иначе ови МФ ослободили у микросредину тумора, те Dex и овим посредним путем остварује супресивни ефекат на прогресију тумора. Међутим, у туморској средини у којој преовладава присуство TGF- β , Dex не би могао сам да спречи продукцију uPA и МФ миграцију. Свеукупно, резултати ове дисертације потврђују да се неки од многобројних механизма анти-инфламацијског деловања глукокортикоида одвијају путем сложене модулатије функција МФ.



Слика 5.2. Схематски приказ главних чинилаца који утичу на M1/M2 поларизацију МФ.

* * *

Ако се резултати добијени у овој дисертацији, а који се односе на сигналне путеве којима МФ M1 и M2 функционалног фенотипа остварују свој утицај на експресију протеаза ЕСМ, uPA и MMP-9, анализирају у контексту података из литературе добиће се шири увид у механизам M1-M2 поларизације. Може се претпоставити да је дубоко у основи комплексног механизма поларизације МФ ка M1 или M2 функционалном фенотипу, главни прекидач NFkB транскрипциони фактор где његова активна форма p5/p50 активира про-инфламаторни сет гена и усмерава МФ ка M1 крају спектра, док увећана продукција p50 субјединице, кроз

разноврсне комбинације са различитим субјединицама NFκB система регулише експресију анти-инфламаторног сета гена и усмерава МФ ка супротном крају спектра M2 (Слика 5.2.). Описано истраживање, у сагласности са бројним налазима у литератури, потврђује да једну од кључних улога у регулацији поларизације МФ игра синтеза и активација протеаза ЕСМ. Овим и другим повезаним сазнањима, отвара се простор за разноврсна истраживања која би могла да детаљније расветле многобројне аспекте назначених процеса, као и да омогуће потенцијалну примену сазнања о чиниоцима који утичу на деликатну равнотежу дивергентних путева макрофагне активације и диференцијације, у циљу изналажења потенцијалних нових видова терапије за многа обољења која се одликују неадекватном регулацијом макрофагних функција.

6. Закључци

1. LPS на дозно-зависан начин инхибира продукцију uPA у култури RAW 264.7 ћелија.
2. P38 је главни сигнални пут којим LPS инхибира продукцију uPA, док ERK1/2 и JNK1/2 MAPK немају утицаја у култури RAW264.7 ћелија.
3. TGF- β стимулише продукцију uPA а инхибира продукцију MMP9 у култури RAW 264.7 ћелија.
4. Главни сигнални механизми стимулације продукције uPA у култури TGF- β -стимулисаних RAW 264.7 ћелија су Smad3 и ERK1,2.
5. Повећано присуство p105 прекурсора NF κ B у цитоплазми и повећана локализација p50 субјединице у једру TGF- β -стимулисаних RAW264.7 ћелија у култури може објаснити инхибиторни утицај TGF- β на продукцију MMP9 у овим ћелијама.
6. LPS делимично умањује стимулаторни ефекат TGF- β на продукцију uPA у култури RAW264.7 ћелија.
7. M1 (LPS и IFN- γ) и M2 (IL-4) стимулуси инхибирају продукцију uPA у култури RAW 264.7 ћелија.
8. M1 стимулус (LPS и IFN γ) инхибира продукцију uPA, а стимулише продукцију MMP9 у култури макрофага костне сржи миша.
9. M2 стимулус (IL-4) стимулише продукцију uPA, али не утиче на продукцију MMP9 у култури макрофага костне сржи миша.
10. Tax (самостално или у комбинацији са TGF- β) инхибира пролиферацију RAW264.7 ћелија у култури.
11. TGF- β стимулише миграцију RAW264.7 ћелија у култури. EP и Tax инхибирају стимулаторни ефекат TGF- β на миграцију.
12. EP и Tax инхибирају базалну и TGF- β -стимулисану продукцију uPA у културама RAW264.7 ћелија.

13. Тах и ЕР инхибира TGF- β -индуковану активацију Smad3 сигнала у RAW264.7 ћелијама у култури.
14. Дех дозно зависно инхибира продукцију uPA у култури RAW264.7 ћелија. У присуству LPS, снажан инхибиторни ефекат испољавају и најмање концентрације Дех.
15. Дех, као и LPS, активира p38 сигнални молекул у RAW264.7 ћелијама у култури. Примењени истовремено, ова два стимулуса (Дех и LPS) делују адитивно.
16. Дех нема утицаја на TGF- β -стимулисану продукцију uPA у култури RAW264.7 ћелија.

Сумарни закључак:

Продукција протеаза ванћелијског матрикса, uPA и MMP-9, је различито регулисана у макрофагима током инфламације. Про-имфламацијски М1 функционални фенотип одликује истовремена стимулација експресије MMP-9 и инхибиција експресије uPA, док про-резолуцијски М2 функционални фенотип одликује истовремена стимулација експресије uPA и инхибиција експресије MMP-9.

7. Литература

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015.*
- Abracham E, Gyetko MR, Kuhn K, Arcaroli J, Strassheim D, Park JS, Shetty S, Idell S. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. J Immunol. (2003) 170: 5644-51.*
- Ahmad R, Shihab PK, Jasem S, Behbehani K. FSL-1 induces MMP-9 production through TLR-2 and NF-kappaB / AP-1 signaling pathways in monocytic THP-1 cells. Cell Physiol Biochem (2014) 34: 929-42.*
- Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. J Leukoc Biol. (2002) 71:9-15.*
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. Experientia (1991) 47: 22-31.*
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. J. Exp. Med. (2007) 204: 1057–69.*
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science (2007) 317: 666-70.*
- Baldi A, Pecorini C, Rebucci R, Saccone F, Cheli F, Miranda-Ribera A, Lecchi C, Cecilian F. Effect of Escherichia coli lipopolysaccharide on u-PA activity and u-PA and u-PAR RNA expression in a bovine mammary epithelial cell line. Res Vet Sci. (2012) 93: 758-62.*
- Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? Matrix Biol (1997) 15: 519-26.*

- Beppu M, Ikebe T, Shirasuna K. The inhibitory effects of immunosuppressive factors, dexamethasone and interleukin-4, on NF- κ B-mediated protease production by oral cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1586: 11-22.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* (2009) 30: 475-87.
- Bjerner L, von Schoultz E, Norberg B, Henriksson R. Estramustine inhibits monocyte phagocytosis. *Prostate* (1988) 13: 49-55.
- Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol.* (2007) 212: 189-94.
- Bogdan C, Ding A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *J Leukoc Biol.* (1992) 52: 119-21.
- Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: An absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett.* (1998) 435: 29–34.
- Budinova IV, Perez P, Vaden VR, Spiegelman VS, Slaga TJ, Jorcano JL. Increased expression of p50-NF- κ B and constitutive activation of NF- κ B transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* (1999) 18: 7423-31.
- Busso N, Belin D, Faily-Crépin C, Vassalli JD. Glucocorticoid modulation of plasminogen activators and of one of their inhibitors in the human mammary carcinoma cell line MDA-MB-231. *Cancer Res.* (1987) 47: 364-70.
- Buttgereit F, Saag KG, Cutolo M, da Silva JA, Bijlsma JW. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* (2005) 34: 14-21.

- Caceres LC, Bonacci GR, Sanchez MC, Chiabrado GA. Activated $\alpha(2)$ macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF- κ B activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem* (2010) 111: 607-17.
- Carlson S, Helterline D, Asbe L, Dupras S, Minami E, Farris S, Stempien-Otero A. Cardiac macrophages adopt profibrotic/M2 phenotype in infarcted hearts: Role of urokinase plasminogen activator. *J Mol Cell Cardiol* (2016) pii: S0022-2828(16)30148-1. (у штампи)
- Carmeli E, Moas M, Reznik AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* (2004) 29: 191-7.
- Cassado AA, D'Imperio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology* (2015) 6: 225.
- Cassady AI, Stacey KJ, Nimmo KA, Murphy KM, von der Ahe D, Pearson D, Botteri FM, Nagamine Y, Hume DA. Constitutive expression of the urokinase plasminogen activator gene in murine RAW264 macrophages involves distal and 5' non-coding sequences that are conserved between mouse and pig. *Nucleic Acids Research* (1991) 19: 6839-47.
- Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Scientific World Journal*. (2011) 11: 2391-402.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. (2003) 198: 1875–86.
- Cheng YC, Chen LM, Chang MH, Chen WK, Tsai FJ, Tsai CH, Lai TY, Kuo WW, Huang CY, Liu CJ. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem*. (2009) 325: 15-23.

- Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Fuentes-Pananá EM.* Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. *J Oncol.* (2013) 2013: 835956.
- Choi SW, Oh SG, Debraj T, Ha JH, Kim DW, Lee SW, Jeong SY, Ahn BC, Lee J, Jeong SY.* Visualization of the biological behavior of tumor-associated macrophages in living mice with colon cancer using multimodal optical reporter gene imaging. *Neoplasia* (2016) 18: 133–41.
- Cooper MD, Alder MN.* The evolution of adaptive immune systems. *Cell* (2006) 124: 815-22.
- Crane MJ, Daley JM, van Houtte O, Brancato SK, Henry WL Jr, Albina JE.* The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One* (2014) 9: e86660.
- Crawford EK, Latham PS, Shah EM, Hasday JD.* Characterization of tumor binding by the IC-21 macrophage cell line. *Cancer Res.* (1990) 50: 4578-83.
- Crown J, O'Leary M, Ooi WS.* Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* (2004) 9 Suppl 2: 24-32.
- Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* (2002) 99:111-20.
- Dahmani A, de Plater L, Guyader C, Fontaine JJ, Berniard A, Assayag F, Beuzeboc P, Marangoni E, Némati F, Poupon MF, Pasik C, Oudard S, Decaudin D.* A preclinical therapeutic schedule optimizing docetaxel plus estramustine administration in prostate cancer. *Anticancer Drugs.* (2010) 21: 927-31.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR.* Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* (2013) 14: 986-95.

- de Forges H, Bouissou A, Perez F.* Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol.* (2012) 44: 266-74.
- Dong C, Li Z, Alvarez, R Jr., Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ.* Microtubule Binding to Smads May Regulate TGF β Activity. *Molecular Cell* (2000) 5: 27–34.
- Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S.* Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol.* (1994) 24: 1441-5.
- Driessler F, venstorm K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ.* Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* (2004) 135: 64-73.
- Duffy MJ.* Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans.* (2002) 30: 207-10.
- Dzik JM.* The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol* (2010) 57: 443–66.
- Ellis V.* Functional analysis of the cellular receptor for urokinase in plasminogen activation. Receptor binding has no influence on the zymogenic nature of pro-urokinase. *J Biol Chem.* (1996) 271: 14779-84.
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ.* Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* (2014) 41: 21-35.
- Eisenhauer EA, Vermorken JB.* The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* (1998) 55: 5-30.
- Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M.* Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* (1993) 155: 595-605.

- Falcone DJ, McCaffrey TA, Mathew J, McAdam K, Borth W.* THP-1 macrophage membrane-bound plasmin activity is up-regulated by transforming growth factor-beta 1 via increased expression of urokinase and the urokinase receptor. *J Cell Physiol.* (1995) 164:334-43.
- Farina AR, Tacconelli A, Vacca A, Maroder M, Gulino A, Mackay AR.* Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* (1999) 10: 353-67.
- Farina AR, Mackay AR.* Gelatinase B/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancers* (2014) 6: 240-96.
- Fernando O. Martinez, Siamon Gordon.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* (2014) 6:13.
- Fleetwood AJ, Achuthan A, Schultz H, Nansen A, Almholt K, Usher P, Hamilton JA.* Urokinase plasminogen activator is a central regulator of macrophage three-dimensional invasion, matrix degradation, and adhesion. *The Journal of Immunology* (2014) 192: 000–000.
- Fowles L, Stacey KJ, Marks D, Hamilton JA, Hume DA.* Regulation of urokinase plasminogen activator gene transcription in the RAW264 murine macrophage cell line by macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) is dependent upon the level of cell-surface receptor. *Biochem. J.* (2000) 347: 313-20.
- Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Pang B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ.* NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and Cellular Biology* (2004) 24: 7806–19.
- Ganguly A, Yang H, Cabral F.* Paclitaxel-Dependent Cell Lines Reveal a Novel Drug Activity. *Mol Cancer Ther* (2010) 9: 2914–23.

- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. (2003) 19: 71-82.
- Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anti cancer agents. *Frontiers in Pharmacology* (2015): 154.
- Gordon S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *J Innate Immun*. (2016) 8: 223-7.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. (2005) 5: 953-64.
- Gosselin D, Glass CK. Epigenomics of macrophages. *Immunol Rev* (2014) 262: 96-112.
- Green CE, Liu T, Montel V, Hsiao G, Lester RD, Subramaniam S, Gonias SL, Klemke RL. Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis, and neovascularization. *PLoS ONE* (2009) 4: e6713.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. (2010) 140: 883-99.
- Gross TJ, Sitrin RG. The THP-1 cell line is a urokinase-secreting mononuclear phagocyte with a novel defect in the production of plasminogen activator inhibitor-2. *J Immunol*. (1990) 144: 1873-9.
- Hald A, Rønø B, Leif R, Lund LR, Egerod KL. LPS counter regulates RNA expression of extracellular proteases and their inhibitors in murine macrophages. *Mediators of Inflammation* (2012): 157894.
- Harhaj EW, Maggirwar SB, Sun SC. Inhibition of p105 processing by NF-kappaB proteins in transiently transfected cells. *Oncogene* (1996) 12: 2385-92.
- Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. (2012) 2012: 948098.

- Hartley JW, Evans LH, Green KY, Naghashfar Z, Macias AR, Zerfas PM, Ward JM. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology* (2008) 5:1.
- Hassan F, Ren D, Zhang W, Gu XX. Role of c-Jun N-terminal protein kinase 1/2 (JNK1/2) in macrophage-mediated MMP-9 production in response to *Moraxella catarrhalis* lipooligosaccharide (LOS). *PLoS One* (2012) 7: e37912.
- Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, Flynn KC, Laskowski CJ, Umlauf M, Kapitein LC, Strikis D, Lemmon V, Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* (2011) 331: 928–31.
- Hildenbrand R, Jansen C, Wolf G, Böhme B, Berger S, von Minckwitz G, Hörlin A, Kaufmann M, Stutte HJ. Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Lab Invest.* (1998) 1: 59-71.
- Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med.* (2012) 209: 1167-81.
- Horwitz SB. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol.* (1994) 5 Suppl 6: S3-6.
- Hume DA. Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* (2012) 92: 433-44.
- Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, de Strihou CvY, Miyata. A small

- molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2013) 33: 935-42.
- Imai K, Takeshita A, Hanazawa S.* Transforming growth factor- β inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of Activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infection and Immunity*, (2000) 2418–23.
- Italiani P, Boraschi D.* From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology* (2014) 5: 514 (1-22).
- Jackson RK, Irving JA, Veal GJ.* Personalization of dexamethasone therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* (2016) 173:13-24.
- Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T, et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* (2013) 39: 599 - 610.
- Javeed A, Ashraf M, Riaz A, Ghafoor A, Afzal S, Mukhtar MM.* Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2009) 38: 283–90.
- Jenkins SJ, Hume DA.* Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol.* (2014) 35: 358-67.
- Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Kim NS, Yie SW, Byeon WH, Eom SH, Ha KS, Kim YM, Kim PH.* Mechanisms underlying TGF- β 1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol* (2007) 81: 557–66.
- Jin Y, Lin Y, Nelin LD.* Extracellular signal-regulated kinase mediates expression of arginase II but not inducible nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* (2015) 290: 2099 – 111.

Jo M, Takimoto S, Montel V, Gonias SL. The urokinase receptor promotes cancer metastasis independently of urokinase-type plasminogen activator in mice. *The American Journal of Pathology* (2009) 175: 190-200.

Kabanov DS, Prokhorenko IR. Relationships between physicochemical characteristics and biological activity of lipopolysaccharides. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* (2011) 5: 293–309.

Kaal EC, Vecht CJ. The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol.* (2004) 16: 593-600.

Kassi E, Moutsatsou P. Glucocorticoid receptor signaling and prostate cancer. *Cancer Lett.* (2011) 302: 1-10.

Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Bacterial endotoxin enhances colorectal cancer cell adhesion and invasion through TLR-4 and NF-kappaB-dependent activation of the urokinase plasminogen activator system. *Br J Cancer.* (2009) 100: 1589-602.

Kim JH, Park YM, Shin JS, Park SJ, Choi JH, Jung HJ, Park HJ, Lee KT.. Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (2009) 32: 1062–8.

Kim T, Yoon J, Cho H, Lee WB, Kim J, Song YH, Kim SN, Yoon JH, Kim-Ha J, Kim YJ. Downregulation of lipopolysaccharide response in Drosophila by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol* (2005) 6: 211-8.

Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, de Strihou CvY, Miyata T. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2013) 33: 935-42.

Kondoh N, Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto M, Oikawa T. Enhanced expression of the urokinase-type plasminogen activator gene and reduced colony

- formation in soft agar by ectopic expression of PUA in HT1080 human fibrosarcoma cells. *British Journal of Cancer* (1998) 78: 718-23.
- Konkel JE, Chen W. Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system. *Trends Mol Med.* (2011) 17: 668-76.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* (2007) 448: 484–7.
- Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem.* (1997) 272: 28563-7.
- Koutsilieris M, Bogdanos J, Milathianakis C, Dimopoulos P, Dimopoulos T, Karamanolakis D, Halapas A, Tenta R, Katopodis H, Papageorgiou E, Pitulis N, Pissimissis N, Lembessis P, Sourla A. Combination therapy using LHRH and somatostatin analogues plus dexamethasone in androgen ablation refractory prostate cancer patients with bone involvement: a bench to bedside approach. *Expert Opin Investig Drugs* (2006) 15: 795-804.
- Krstic J, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *The Scientific World Journal* (2014): 521754.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease. 9th edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Sounders, 2015.
- Kung SK, Lau HK. Modulation of the plasminogen activation system in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta.* (1993) 1176:113-22.
- Laing N, Dahllof B, Hartley-Asp B, Ranganathan S, Tew KD. Interaction of estramustine with tubulin isotypes. *Biochemistry* (1997) 36: 871–8.

- Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta* (2016) 1865: 23–34.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* (2014) 2014: 149185.
- Lavin Y, Merad M. Macrophages: Gatekeepers of Tissue Integrity. *Cancer Immunol Res.* (2013) 1: 201–9.
- Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11: 750-61.
- Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* (1997) 88: 213-22.
- Lee SW, Han SI, Kim HH, Lee ZH. TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF- κ B. *J. Biochem. Mol. Biol.* (2002) 35: 371–76.
- Lee YS, Tran HTL, Ta QV. Regulation of expression of matrix metalloproteinase-9 by JNK in Raw 264.7 cells: presence of inhibitory factor(s) suppressing MMP-9 induction in serum and conditioned media. *Experimental and Molecular Medicine* (2009) 41: 259-68.
- Ley K. The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. Version 2. *F1000Res* (2014) 3: 37.
- Liguori M, Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages as incessant builders and destroyers of the cancer stroma. *Cancers* (2011) 3: 3740-61.
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* (2008) 9: 632–40.

- Liu CC, Lu N, Cui Y, Yang T, Zhao ZQ, Xin WJ, Liu XG. Prevention of paclitaxel-induced allodynia by minocycline: Effect on loss of peripheral nerve fibers and infiltration of macrophages in rats. *Mol Pain*. (2010) 6: 76.
- López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle* (2009) 8: 3657-62.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. (2008) 42: 145-51.
- Lu G, Zhang R, Geng S, Peng L, Jayaraman P, Chen C, Xu F, Yang J, Li Q, Zheng H, Shen K, Wang J, Liu X, Wang W, Zheng Z, Qi CF, Si C, Cijang He J, Lira SA, Sikora AG, Li L, Xiong H. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nature Communications* (2015) 6: 6676.
- Lyamina SV, Kruglov SV, Vedenikin TYu, Borodovitsyna OA, Suvorova IA, Shimshelashvili ShL, Malyshev IYu. Alternative reprogramming of M1/M2 phenotype of mouse peritoneal macrophages in vitro with interferon- γ and interleukin-4. *Cell Technologies in Biology and Medicine* (2012) 4.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. (2004) 25: 677-86.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* (2008) 454: 436- 44.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarisation: *in vivo* veritas. *J Clin Invest*. (2012) 122: 787–95.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. (2014) 6:13.

- Mazar AP. Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy. *Clin Cancer Res.* (2008) 14: 5649-55.
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* (1996) 15: 5647–58.
- McWorther FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *PNAS* (2013) 110: 17253-8.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* (2008) 454: 428-35.
- Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol.* (2009) 9: 692-703.
- Medcalf RL, Richards RI, Crawford RJ, Hamilton JA. Suppression of urokinase-type plasminogen activator mRNA levels in human fibrosarcoma cells and synovial fibroblasts by anti-inflammatory glucocorticoids. *EMBO J.* (1986) 5: 2217-22.
- Mercurio F, Di Donato JA, Rosette C, Karin M. P105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- κ B-mediated signal transduction. *Genes Dev* (1993) 7: 705–18.
- Metchnikoff E. Leçons sur la Pathologie Comparée de l'inflammation faites à l'Institut Pasteur en 1891. *Paris: Masson* (1892).
- Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol.* (2011) 223: 205-18.
- Mezmarich J, Malchodi L, Helterine D, Ramsey SA, Bertko K, Plummer T, Plawman A, Gold E, Stempien-Otero A. Urokinase plasminogen activator induces pro-fibrotic/m2 phenotype in murine cardiac macrophages. *PloS One* (2013) 8: e57837.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* (2000) 164: 6166-73.

- Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun.* (2014) 6: 716-26.
- Mills CD. Anatomy of discovery: M1 and M2 macrophages. *Frontiers in Immunology* (2015) 6: 212.
- Ming XF, Rajapakse AG, Yepuri G, Xiong Y, Carvas JM, Ruffieux J, Scerri I, Wu Z, Popp K, Li J, Sartori C, Scherrer U, Kwak BR, Montani JP, Yang Z. Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. *J Am Heart Assoc.* (2012) 1: 000992.
- Mirzapioazova T, Kolosova IA, Moreno L, Sammani S, Garcia JG, Verin AD. Suppression of endotoxin-induced inflammation by paclitaxel. *Eur Respir J.* (2007) 30: 429–35.
- Mohan R, Panda D. Kinetic Stabilization of Microtubule Dynamics by Estramustine Is Associated with Tubulin Acetylation, Spindle Abnormalities, and Mitotic Arrest. *Cancer Res* (2008) 68: 6181–9.
- Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Ya-Fan Wang V, Vu D, Ghosh G. The 20S proteasome processes NF- κ B1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *The EMBO Journal* (2006) 25: 1945–56.
- Moos PJ, Fitzpatric FA. Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: Induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis. *PNAS* (1998) 95: 3896-901.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2016) 8: a021873.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* (1986) 136: 2348-57.

- Mullins DW, Martins RS, Burger CJ, Elgert KD. Tumor cell-derived TGF- β and IL-10 dysregulate paclitaxel induced macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* (2001) 69: 129–37.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* (2008) 8: 618-31.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* (2014) 41: 14-20.
- Mustjoki S, Tapiovaara H, Sirén V, Vaheri A. Interferons and retinoids enhance and dexamethasone suppresses urokinase-mediated plasminogen activation in promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* (1998) 12: 164-74.
- Muthukuru M, Cutler CW. Resistance of MMP9 and TIMP1 to endotoxin tolerance. *FEMS Pathogens and Disease* (2015) 73: 5.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* (2007) 204: 3037-47.
- Nakajima K, Tohyama Y, Kurihara T, Kohsaka S. Enhancement of urokinase-type plasminogen activator (uPA) secretion, but not that of substrate plasminogen (PGn), by rat microglia stimulated with neuronal conditioned medium. *Neurosci Lett.* (2005) 378: 13-7.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin B. Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *Journal of Experimental Medicine* (1983) 158: 670-89.
- Nathan C. Epidemic inflammation: pondering obesity. *Mol Med.* (2008) 14: 485-92.

Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* (2010) 140: 871-82.

Nguyen DH, Webb DJ, Catling AD, Song Q, Dhakephalkar A, Weber MJ, Ravichandran KS, Gonias SL. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells. *J Biol Chem.* (2000) 275: 19382-8.

Ning-Bo Hao, Mu-Han Lu, Ya-Han Fan, Ya-Ling Cao, Zhi-Ren Zhang, Shi-Ming Yang. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Developmental Immunology.* (2012): 948098.

Noh H, Hong S, Huang S. Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics* (2013) 3: 487-95.

Novak ML, Bryer SC, Cheng M, Nguyen MH, Conley KL, Cunningham AK, Xue B, Sisson TH, You JS, Hornberger TA, Koh TJ. Macrophage-specific expression of urokinase-type plasminogen activator promotes skeletal muscle regeneration. *J Immunol* (2011) 187:1448–57.

Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochem. J* (2004) 381: 413–22.

Ohta S, Niiya K, Sakuragawa N, Fuse H. Induction of urokinase-type plasminogen activator by lipopolysaccharide in PC-3 human prostatic cancer cells. *Thromb Res.* (2000) 97:343-7.

Page-McCaw A. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* (2008) 19: 14-23.

- Panda D, Miller HP, Islam K, Wilson L. Stabilization of microtubule dynamics by estramustine by binding to a novel site in tubulin: a possible mechanistic basis for its antitumor action. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94: 10560–4.
- Pansanit A, Park EJ, Kondratyuk TP, Pezzuto JM, Lirdprapamongkol K, Prasat Kittakoop P. Vermelhotin, an anti-inflammatory agent, suppresses nitric oxide production in RAW 264.7 cells via p38 inhibition. *Journal of Natural Products* (2013) 76: 1824-7.
- Passmore JS, Lukey PT, Ress SR. The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T-cell function. *Immunology* (2001) 102: 146-56.
- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2007) 8: 49-62.
- Perry CM, McTavish D. Estramustine phosphate sodium. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drugs Aging* (1995) 7: 49–74.
- Pixley FJ. Macrophage migration and its regulation by CSF-1. *International Journal of Cell Biology* (2012): 501962.
- Polioudaki H, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Theodoropoulos PA. Microtubule-interacting drugs induce moderate and reversible damage to human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* (2009) 42:434-47.
- Politis I, Zhao X, McBride BW, Burton JH, Turner JD. Plasminogen activator production by bovine milk macrophages and blood monocytes. *Am J Vet Res.* (1991) 52: 1208-13.
- Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B. *PNAS* (2009) 106: 14978–83.

- Rama D, Esendagli G, Guc D. Expression of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) on J744A.1 macrophages co-cultured with fibroblast and/or tumor cells: modeling the influence of microenvironment. *Cell Immunol.* (2011) 271:134-40.
- Randolph GJ. Proliferating macrophages prevail in atherosclerosis. *Nat. Med.* (2013) 19: 1094-5.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* (1978) 15: 261-7.
- Ravery V, Fizazi K, Oudard S, Drouet L, Eymard JC, Culine S, Gravis G, Hennequin C, Zerbib M. The use of estramustine phosphate in the modern management of advanced prostate cancer. *BJU Int.* (2011) 108: 1782-6.
- Reyes-Moreno C, Frenette G, Boulanger J, Lavergne E, Govindan MV, Koutsilieris M. Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta I expression in human PC-3 prostate cancer cells. *Prostate* (1995) 26: 260-9.
- Reichel CA, Kanse SM, Krombach F. At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade. *Trends Cardiovasc Med.* (2012) 22:192-6.
- Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder H, Frew AJ, Weyand CM. Clinical immunology: Principles and practice. 4th edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Sounders, 2013
- Ribechini E, Leenen PJ, Lutz MB. Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells. *Eur J Immunol.* (2009) 39: 3538-51.
- Rhee JW, Lee KW, Kim D, Lee Y, Jeon OH, Kwon HJ, Kim DS. NF-kappaB-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression by lipopolysaccharide in a macrophage cell line RAW 264.7. *J Biochem Mol Biol.* (2007) 40: 88-94.
- Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* (2015) 2015: 816460.

- Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* (2002) 3: 69–75.
- Saksela O, Hovi T, Vaheri A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J Cell Physiol.* (1985) 122: 125-32.
- Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* (2011) 121: 233–51.
- Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis—implications in skin cancer. *Dermatology* (2013): 597927.
- Savinova OV, Hoffmann A, Ghosh G. The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell.* (2009) 34: 591-602.
- Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm.* (2015) 2015: 437695.
- Sevko A, Michels T, Vrohling M, Umansky L, Beckhove P, Kato M, Shurin GV, Shurin MR, Umansky V. Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol.* (2013) 190: 2464-71.
- Shetty SK, Marudamuthu AS, Abernathy D, Shetty RS, Shetty P, Fu J, Idell S, Bhandary YP, Ji H, Liu MC, Shetty S. Regulation of urokinase expression at the posttranscription level by lung epithelial cells. *Biochemistry* (2012) 51: 205-13.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11: 762-74.

- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-b1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* (1992) 359: 693–9.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* (2012) 122: 787-95.
- Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunology Letters* (2009) 123: 97–102.
- Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* (2013) 342: 1242974.
- Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2010) 11: 23-36.
- Speicher LA, Barone L, Tew KD. Combined antimicrotubule activity of estramustine and Taxol in human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* (1992) 52: 4433–40.
- Stacey KJ, Nagamine Y, Hume DA. RNA synthesis inhibition stabilises urokinase mRNA in macrophages. *FEBS* (1994) 356: 311-3.
- Stearns ME, Wang M, Tew KD, Binder LI. Estramustine binds a MAP-1-like protein to inhibit microtubule assembly in vitro and disrupt microtubule organization in DU 145 cells. *J Cell Biol* (1988) 107: 2647–56.
- Stearns ME, Tew KD. Estramustine binds MAP-2 to inhibit microtubule assembly in vitro . *J Cell Sci* (1988) 89: 331–42.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* (1992) 176: 287-92.
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* (2004) 76: 509-13.
- Sugioka K, Kodama A, Yoshida K, Okada K, Mishima H, Aomatsu K, Matsuo O, Shimomura Y. The roles of urokinase-type plasminogen activator in leukocyte

- infiltration and inflammatory responses in mice corneas treated with lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2014) 55: 5338-50.
- Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *International Immunology* (2012) 24: 253–65.
- Sun L, Zhang D, L F, Xiang X, Ling G, Xiao L, Liu Y, Zhu X, Zhan M, Yang Y, Kondeti VK, Kanwar YS. Low-dose paclitaxel ameliorates fibrosis in the remnant kidney model by down-regulating miR-192. *J Pathol.* (2011) 225: 364–77.
- Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2003) 4: 897-901.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010) 140: 805-20.
- Tew KD, Stearns ME. Estramustine - a nitrogen mustard/steroid with antimicrotubule activity. *Pharmacol Ther* (1989) 43: 299–319.
- Torimoto Y, Shindo M, Ikuta K, Kohgo Y. Current therapeutic strategies for multiple myeloma. *Int J Clin Oncol.* (2015) 20: 423-30.
- Vairo G, Royston AK, Hamilton JA. Biochemical events accompanying macrophage activation and the inhibition of colony-stimulating factor-1-induced macrophage proliferation by tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide. *J Cell Physiol.* (1992) 151: 630-41.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* (2006) 24: 179–189.

- Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* (2013) 48: 222-72.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* (1972) 46: 845-52.
- van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* (1968) 128: 415-35.
- Verollet C, Charrière GM, Labrousse A, Cougoule C, Le Cabec, V, Maridonneau-Parini I. Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur J Immunol* (2011) 41: 2805-13.
- Virchow R. Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1863.
- Vo VA, Lee JW, Park JH, Kwon JH, Lee HJ, Kim SS, Kwon YS, Chun W. N-(p-Coumaryl)-tryptamine suppresses the activation of JNK/c-Jun signaling pathway in LPS-challenged RAW264.7 cells. *Biomol Ther* (2014) 22: 200-6.
- Walz PH, Bjork P, Gunnarsson PO, Edman K, Hartley-Asp B. Differential uptake of estramustine phosphate metabolites and its correlation with the levels of estramustine binding protein in prostate tumor tissue. *Clin Cancer Res* (1998) 4: 2079–84.
- Wan F, Lenardo MJ. Specification of DNA Binding Activity of NF- κ B Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2009) 1: a000067.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol.* (2012) 13: 753-60.
- Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology* (2014) 5: 614.

- Wiesner C, Le-Cabec V, El Azzouzi K, Maridonneau-Parini I, Linder S. Podosomes in space. Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adhesion & Migration* (2014) 8: 179–91.
- Woo CH, Lim JH, Kim JK. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 Cells. *The Journal of Immunology* (2004) 173: 6973–80.
- Wu SQ, Aird WC. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2005) 289: H873-85.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* (2013) 496: 445-55.
- Xiao G, Fu J. NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res* (2011) 1:192-221.
- Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G, Kouroumalis E. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci.* (2005) 50: 935-41.
- Xie B, Dong Z, Fidler IJ. Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol* (1994) 152: 3637–44.
- Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J BiolChem* (2000) 275: 20861-6.
- Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, Liao W, Chen Z, Liu Z, Su B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF κ B activation. *Nat. Immunol.* (2001) 2: 620–24.

- Yang YH, Li DL, Bi XY, Sun L, Yu XJ, Fang HL, Miao Y, Zhao M, He X, Liu JJ, Zang WJ. Acetylcholine inhibits LPS-induced MMP-9 production via the $\alpha 7$ nAChR-JAK2/STAT3 pathway in RAW264.7 cells. *Cell Physiol Biochem* (2015) 36: 2025-38.
- Yu HY, Kim KS, Lee YC, Moon HI, Lee JH. Oleifolioside A, a new active compound, attenuates LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression through the downregulation of NF- κ B and MAPK activities in RAW264.7 macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2012): 637512.
- Yuan F, Jie Chen² J, Sun P, Guan S, Xu J. Wedelolactone inhibits LPS-induced proinflammation via NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Biomedical Science* (2013) 20: 84.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* (2010) 116: e74-80.
- Zhang B, Wang J, Gao J, Guo Y, Chen X, Wang B, Gao J, Rao Z, Chen Z. Alternatively activated RAW264.7 macrophages enhance tumor lymphangiogenesis in mouse lung adenocarcinoma. *J. Cell. Biochem.* (2009) 107: 134-43.
- Zhang D, Yang R, Wang S, Dong Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy* (2014) 8: 279-84.
- Zhou J, Zhong DW, Wang QW, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF- β /Smad activity. *World J Gastroenterol.* (2010) 16: 3330-34.

Биографија аутора

Соња Мојсиловић је рођена 28. маја 1975. године у Загребу, Република Хрватска. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 1994/1995. године, група Молекуларна биологија и физиологија, а дипломирала 2001. године са просечном оценом 9,09. На истом факултету завршила је последипломске студије на групи Молекуларна биологија и биохемија. Магистарски рад под насловом „Неке особине мембранских моноклонских имуноглобулина Г у мултиплом мијелому“ одбранила је 2006. године. Од школске 2001/2002. године била је стипендиста Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије за последипломске студије. Запослена је у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду од 2003. године, где је у звање истраживач-сарадник изабрана 2006. године. Учествовала је на 5 пројеката Министарства Републике Србије надлежног за науку. Коаутор је 27 научних публикација.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Соња Мојсиловић _____

број индекса _____ - _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом „Утицај про- и анти-инфламцијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага”

- 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

Соња Мојсиловић

У Београду, 4. августа 2016. године

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Соња Мојсиловић _____

Број индекса _____ - _____

Студијски програм _____ - _____

Наслов рада

„Утицај про- и анти-инфламцијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага”

Ментори

др Хуан Франциско Сантибањез Домингез, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду и

др Милена Катарановски, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, научни саветник Института за биолошка истраживања Универзитета у Београду

Потписана _____ Соња Мојсиловић _____

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

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

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

Потпис докторанда

Соња Мојсиловић

У Београду, 4. августа 2016. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај про- и анти-инфламцијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

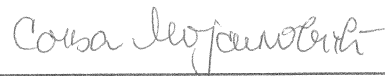
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 4. августа 2016. године