

THE EFFECT OF PHARMACOLOGICAL MODULATION OF AUTOPHAGY ON THE GENE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THP-1 CELLS

EFEKAT FARMAKOLOŠKE MODULACIJE AUTOFAGIJE NA EKSPRESIJU GENA ZA PROINFLAMATORNE CITOKINE U THP-1 ĆELIJAMA

Sara Milošević¹, Vladimir Trajković²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: sara020501@gmail.com

Abstract

Introduction: Autophagy is a process that cells use to eliminate old, unused, and damaged cytoplasmic components. The interaction between autophagy and cytokines could be one of the mechanisms that coordinate the activity of the innate and adaptive immune systems. Depending on the cell type and activation pathway, autophagy and pro-inflammatory cytokines have different mutual effects. Understanding the balance between these two processes is necessary to realize the therapeutic potential of autophagy regulation in various infectious, inflammatory, and autoimmune diseases.

Aim: The aim was to investigate the role of pharmacological modulation of autophagy on the transcription of mRNA for the proinflammatory cytokines TNF, IL-1, and IL-6 in the monocytic cell line THP-1.

Material and methods: The pharmacological modulation of autophagy by bafilomycin and trehalose was determined by measuring the autophagic flux, the conversion of LC3-II after blocking its degradation, by the immunoblot method. LC3 represents a marker of autophagy and LC3-II levels are thought to correlate with the number of autophagosomes. Using the RT-qPCR, it was determined if bafilomycin and trehalose, through the modulation of autophagy, affect the transcription of genes for proinflammatory cytokines TNF, IL-1, and IL-6 by measuring mRNA concentrations of these cytokines. For the statistical analysis, a One-Sample t-test was used.

Results: Immunoblot analysis confirmed that bafilomycin blocks autophagic flux by increasing intracellular levels of LC3-II. Trehalose increased the level of LC3-II, both in the presence and absence of bafilomycin, inducing LC3-II conversion in THP-1 cells. RT-qPCR analysis of THP-1 cells treated with trehalose showed a significant increase in transcription of the genes TNF, IL-1, and IL-6, whereas cells treated with bafilomycin exhibited a significant decrease in the transcription of these genes.

Conclusion: Based on the results obtained in the research, it can be concluded that autophagy activates the expression of pro-inflammatory cytokines by increasing the transcription of their genes.

Keywords:

autophagy,
proinflammatory
cytokines,
trehalose,
bafilomycin

Sažetak

Uvod: Autofagija predstavlja proces koji ćelije koriste kako bi eliminisale stare, neiskorišćene i oštećene citoplazmatske komponente. Interakcija između autofagije i citokina mogla bi da bude jedan od mehanizama koji koordinira aktivnost urođenog i adaptivnog imunskog sistema. U zavisnosti od vrste ćelije i puta aktivacije, autofagija i proinflamatorni citokini imaju različit uzajamni uticaj. Da bi se ostvario terapijski potencijal regulacije autofagije u različitim infektivnim, inflamatornim i autoimunskim bolestima potrebno je razumevanje ravnoteže između ova dva procesa u imunskim ćelijama.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je da se ispituje uloga farmakološke modulacije autofagije na transkripciju informacione RNK za proinflamatorne citokine faktor nekroze tumora (TNF), interleukin 1 (IL-1) i interleukin 6 (IL-6) u monocitnoj ćelijskoj liniji THP-1.

Materijal i metode: Uticaj farmakoloških modulatora bafilomicina i trehaloze određivan je merenjem autofagnog fluksa, tj. procenom konverzije LC3-II nakon prethodnog blokiranja njegove degradacije, pri čemu se nivo LC3-II analizira metodom imunoblota. Laki lanac 3 proteina povezanog sa mikrotubulima 1 (LC3) predstavlja marker autofagije i smatra se da nivoi LC3-II koreliraju sa brojem autofagozoma. Pomoću metode kvantitativne reverzne transkripcione lančane reakcije polimeraze (RT-qPCR) određivano je da li bafilomicin i trehaloza modulacijom autofagije utiču na transkripciju gena za proinflamatorne citokine TNF, IL-1 i IL-6, tako što su merene vrednosti koncentracije iRNK ovih citokina. Za statističku obradu podataka korišćen je *One-Sample t*-test.

Rezultati: Imunoblot analiza je potvrdila da bafilomicin blokira autofagni fluks tako što povećava intracelularne nivoe LC3-II, sprečavajući njegovu lizozomalnu degradaciju. Trehaloza je povećala nivo LC3-II, kako u prisustvu, tako i u odsustvu bafilomicina, što potvrđuje njenu sposobnost da indukuje konverziju LC3-I u LC3-II u THP-1 ćelijama. Analizom RT-qPCR uzoraka THP-1 ćelija tretiranih trehalozom dobijeno je značajno povećanje transkripcije gena TNF, IL-1 i IL-6, a kod tretiranih bafilomicinom značajno smanjenje transkripcije ovih gena u odnosu na kontrolne uzorke.

Zaključak: Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se zaključiti da autofagija aktivira ekspresiju proinflamatornih citokina (TNF, IL-1, IL-6) tako što povećava transkripciju njihovih gena u THP-1 ćelijama.

Ključne reči:

autofagija,
proinflamatorni
citokini,
trehaloza,
bafilomicin

Uvod

Termin autofagija odnosi se na grupu evolutivno očuvanih homeostatskih mehanizama koje eukariotske ćelije koriste da eliminišu stare, neiskorišćene i oštećene citoplazmatske komponente degradacijom u lizozomima. Tri glavna tipa autofagije, koja se razlikuju po mehanizmima isporuke supstrata u lizosome, nazivaju se mikroautofagija, autofagija posredovana šaperonima i makroautofagija (1). Makroautofagija (u daljem tekstu autofagija) odvija se kroz više visoko kontrolisanih koraka. Autofagna kaskada je aktivna konstitutivno na bazalnom nivou u različitim ćelijama, a dodatno se aktivira u uslovima stresa (npr. oksidativnog, metaboličkog, citotoksičnog, stresa endoplazmatskog retikuluma) pomoću različitih signalnih molekula i transkripcionih faktora. Pokretanje autofagije je praćeno transkripcijom gena povezanih sa autofagijom (ATG) i visoko orkestriranom sekvencijalnom aktivacijom posttranslaciono modifikovanih ATG proteina organizovanih u funkcionalne komplekse, što dovodi do nukleacije autofagozoma, elongacije, zatvaranja i, na kraju, fuzije sa lizozomom. Razgradnjom sadržaja vezikula pomoću hidrolitičkih enzima lizozoma obezbeđuje se uklanjanje oštećenih i potencijalno štetnih makromolekula i organela (kao što su mitohondrije koje proizvode reaktivne oblike kiseonika), dok se produkti razgradnje mogu reciklirati i

koristiti kao supstrat za ćelijski metabolizam tokom nedostatka hranljivih materija i energije. Shodno tome, smanjena ili blokirana autofagija može biti štetna za ćelije zbog narušene kontrole i uklanjanja štetnog ćelijskog sadržaja. S druge strane, produžena prekomerna aktivacija autofagolizozomalnog puta može da izazove autofagičnu smrt ćelije, što je poznato kao programirana ćelijska smrt tipa II, ili da podstakne apoptozu, nekrozu i nekroptozu (2, 3). Defektna autofagija je povezana sa patološkim stanjima kao što su maligniteti, autoimunske bolesti, neurodegenerativne bolesti i starenje.

U mehanizmima onkogeneze autofagija ima složenu ulogu koja zavisi od stadijuma razvoja, genetske osnove i mikrookruženja tumora. Može da ima tumor supresorsku ulogu uklanjanjem oštećenih ćelijskih komponenti i sprečavanjem akumulacije onkogenih faktora. Pored toga, autofagija može poboljšati imunološko prepoznavanje i eliminaciju tumorskih ćelija promovišući prezentaciju tumorskih antigena imunskim ćelijama. S druge strane, autofagija takođe može da omogući preživljavanje tumorskih ćelija i otpornost na lečenje suzbijanjem apoptoze i regulisanjem ravnoteže između glikolize i oksidativne fosforilacije (4-6).

Pored uloge u kancerogenezi, autofagija takođe ima značajan uticaj na infekcije i inflamatorne bolesti. Predstavlja kritičan proces u urođenoj imunosti i

učestvuje u odbrani od patogena, uključujući bakterije, viruse i parazite, i njihove razgradnje lizozomima (ksenofagija). Defektna autofagija je povezana sa povećanom osetljivošću na infekcije i smanjenim fagocitnim kapacitetom (7,8). Interakcija između autofagije i citokina mogla bi da bude jedan od mehanizama koji koordinira aktivnost urođenog i adaptivnog imunskog sistema. Nivo autofagije mogu da regulišu različiti citokini, dok autofagija istovremeno može da modulira proizvodnju i lučenje citokina utičući na aktivnost inflamazoma, obradu/prezentaciju antigena i razvoj, aktivaciju i funkciju T- i B-ćelija. U zavisnosti od vrste ćelije u kojoj se sama autofagija odvija, ali i od puta aktivacije ovog procesa, proinflamatorni citokini i autofagija imaju različit uzajamni uticaj (3,9).

Studije su pokazale da je mutacija gena *ATG16L1* povezana sa smanjenom autofagijom i povećanim rizikom od razvoja Kronove bolesti. Slično, patološka aktivacija autofagije je implicirana u sinovijalnoj hiperplaziji koja prati inflamatorno uništavanje zglobove hrskavice i kosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom. Polimorfizmi u intergenskom regionu povezanom sa povećanom ekspresijom *ATG5*, povezani su sa sistemskim eritematoznim lupusom. Kod multiple skleroze autofagija je disregulisana i u imunskim ćelijama i u neuronima, što dovodi do akumulacije oštećenih mitohondrija, povećane proizvodnje proinflamatornih citokina, ali i akumulacije pogrešno savijenih proteina i povećanog oksidativnog stresa koji doprinose razvoju bolesti (7,8,10).

Korišćenje ćelijskih kultura može da obezbedi kontrolisano okruženje za proučavanje molekularnih mehanizama određenih procesa i testiranje novih lekova. Ćelijsku liniju THP-1 čine ćelije humane akutne monocitne leukemije koje mogu da se diferenciraju u makrofagima slične ćelije. *Ex vivo* sistemi imaju prednost zbog veće sličnosti ćelijskih procesa sa onima u stvarnom organizmu. Postoje, međutim, brojni razlozi zbog kojih se u istraživanjima češće koriste *in vitro* modeli, poput linija poreklom iz humanih tumorskih ćelija, za proučavanje ćelijskih funkcija, mehanizama i odgovora, kao i signalnih puteva i transporta hranljivih materija i lekova. Prednosti korišćenja THP-1 ćelija u odnosu na monocite iz periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cell* - PBMC) jesu zahtevnost pronalaženja i održivosti donora, brzina rasta koja je znatno veća kod THP-1 ćelija, bezbednija i jednostavnija upotreba. Monociti iz periferne krvi zahtevaju dodatno tretiranje različitim inflamatornim medijatorima, genetska homogenost THP-1 minimizira stepen varijabilnosti fenotipa ćelija, dok velika individualna varijacija PBMC može učiniti analize i tumačenje rezultata neadekvatnim (11).

Laki lanac 3 proteina 1 povezan sa mikrotubulima (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3* - MAP1 LC3/Atg8/LC3) predstavlja protein koji se tokom procesa autofagije pomoću Atg4 cepa na C-terminalnom kraju kako bi se formirao LC3-I. Dalje se LC3-I kovalentno konjuguje sa fosfatidil-etanolaminom da bi se formirao LC3-II koji se specifično vezuje za membranu autofagozoma/autolizozoma. Kod viših eukariota LC3 je jedini poznati protein koji se specifično povezuje sa autofagozomima i

autolizozomima, zbog čega se smatra da nivoi LC3-II koreliraju sa brojem autofagozoma. Nivoi LC3-II mogu se povećati ako se autofagna degradacija supstrata pojača ili odloži. Slično tome, smanjeni nivoi LC3-II mogu biti povezani sa padom sinteze autofagozoma, povezanom sa smanjenim autofagnim fluksom, ali se takođe može javiti kada se autofagni fluks indukuje u određenim ćelijama. Kako bi se izveo ispravan zaključak iz različitih mogućih interpretacija povećanih ili smanjenih nivoa LC3-II, potrebno je da se nivo LC3-II određuje u prisustvu inhibitora lizozomalnih proteaza. Bafilomicin A1 inhibira autofagiju blokiranjem vakuolarne H⁺ adenozin-trifosfataze (ATP-aza), čime sprečava lizozomalnu degradaciju. Ukoliko dođe do povećanja vrednosti LC3-II u ćelijama tretiranim bafilomicinom A1 i specifičnom supstancom koja se testira, u poređenju sa ćelijama tretiranim samo bafilomicinom A1, to sugeriše da je stopa formiranja LC3-II autofagozoma povećana pri tretiranju datom supstancom, i obrnuto. Procenom konverzije LC3-I u LC3-II nakon prethodnog blokiranja njegove degradacije, pri čemu se nivo LC3-II analizira metodom imunoblota, moguće je ispitati „autofagni protok“ (engl. *autophagic flux*) i na taj način proceniti efekat neke supstance na autofagiju (12).

Trehaloza predstavlja prirodni disaharid koji se nalazi u različitim organizmima, uključujući bakterije, biljke, insekte, kvasnice i beskičmenjake. Ima ulogu da sprečava denaturaciju proteina i na taj način pruža zaštitu od različitih stresnih faktora. Smatra se da trehaloza ima modifikatornu ulogu na autofagiju tako što je indukuje povećavajući ekspresiju gena za autofagni receptor p62, koji obeležava ćelijski sadržaj za autofagnu degradaciju (13).

S obzirom na to da postoji sve više dokaza da autofagija ima važne efekte na indukciju i modulaciju inflamatorne reakcije, potrebno je razumevanje ravnoteže između ova dva procesa u imunskim ćelijama da bi se ostvario terapijski potencijal regulacije autofagije u različitim infektivnim, inflamatornim i autoimunskim bolestima (3,9,14).

Hipoteza postavljena na početku ovog istraživanja bila je da bafilomicin i trehaloza, kao farmakološki modulatori autofagije, utiču na ekspresiju proinflamatornih citokina faktora nekroze tumora (TNF), interleukina-1 (IL-1) i interleukina-6 (IL-6) u monocitnoj ćelijskoj liniji THP-1.

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uloga farmakološke modulacije autofagije na transkripciju informacione RNK za proinflamatorne citokine TNF, IL-1 i IL-6 u monocitnoj ćelijskoj liniji THP-1.

Materijal i metode

THP-1 ćelijska kultura

THP-1 ćelijska linija, izvedena iz perifernih mononuklearnih ćelija krvi jednogodišnjeg muškog donora obolelog od humane akutne monocitne leukemije (*Elabscience, Houston, TX*), održavane su na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida (CO₂) u HEPES (10 mM) puferisanom medijumu za ćelijsku kulturu RPMI 1640 sa 2 mM L-glutamina, dopunjen sa 5% fetalnog govedeg seruma, 1

mM natrijum-piruvata, 1% neesencijalnih aminokiselina, 0,05 mM β -merkaptetanola i 1% mešavine antibiotika/antimikotika (*Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Nemačka*).

THP-1 ćelije su inkubirane u pločama sa 6 bunara (1×10^6 ćelija po bunaru) i za polimeraznu lančanu reakciju (PCR) i za *Western blot* analizu. Ogledi su ponovljeni tri puta. Za PCR su rađeni duplikati u svakom ogledu, dok je za *blot* monoplakat po ogledu.

Za PCR analizu su formirane tri grupe ćelija. Prva grupa je predstavljala kontrolu. Druga grupa je inkubirana 10 nM bafilomicinom A1 tokom 24 h (*Merck, Darmstadt, Nemačka*) kao farmakološkim inhibitorom autofagije. Treća grupa je inkubirana 100 mM trehalozom (*Merck, Darmstadt, Nemačka*) tokom 24 h, kao farmakološkim aktivatorom autofagije.

Radi analize autofagnog fluksa *Western blot* metodom formirane su četiri grupe ćelija. Prva grupa ćelija je predstavljala kontrolu. Druga ispitivana grupa je inkubirana 100 nM bafilomicinom A1 (*Merck, Darmstadt, Nemačka*) tokom 6 h. Treća grupa je inkubirana 100 mM trehalozom (*Merck, Darmstadt, Nemačka*) tokom 24 h, dok je četvrta grupa tretirana i bafilomicinom A1 i trehalozom.

Analiza autofagnog fluksa imunoblot metodom

Ćelije su lizirane u RIPA puferu (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,5% natrijum-deoksiholat, 0,1% SDS i koktel inhibitora proteaze/fosfataze; *Merck, Darmstadt, Nemačka*). Lizirani uzorci su ostavljeni na ledu tokom 30 min, nakon čega su centrifugirani na 14.000 g tokom 15 min na 4°C. Supernatanti su sakupljeni za dalju analizu. Jednake količine proteina iz svakog uzorka razdvojene su SDS-PAGE elektroforezom na 12% gelovima, nakon čega su prenete na nitrocelulozne membrane (*Bio-Rad, Hercules, CA*) metodom polusuvog (engl. *semi-dry*) transfera. Membrane su blokirane sa 10% mleka u *Tris-Buffered Saline* (TBS) rastvoru sa 0,05% *Tween-20* (TBS-T), nakon čega su inkubirane primarnim antitelima za ispitivani LC3B (2775) i aktin (4968), kao referentni protein za procenu ukupne količine proteina u uzorcima (*Cell Signaling Technology, Beverly, MA*), razblaženim u 5% mleka u TBS-T rastvoru. Sledećeg dana uzorci su isprani i inkubirani sekundarnim peroksidaza konjugovanim antitelima tokom 2 h (*goat anti-rabbit IgG*, 11-035-144; *Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA*). Specifične proteinske trake su vizuelizovane i detektovane pojačanom hemiluminiscencijom pomoću *ChemiDoc MP Imaging* sistema (*Bio-Rad, Hercules, CA*), pri čemu je kao supstrat za reakciju korišćen vodonik-peroksid. Intenzitet proteinskih traka kvantifikovan je denzitometrijskom analizom, korišćenjem *Image Lab* softvera (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) (15).

Analiza kvantitativnom reverznom transkripcionom lančanom reakcijom polimeraze

RNK je ekstrahovana iz THP-1 ćelija korišćenjem *RNeasy Protect Mini Kita* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*) i, u

skladu sa preporukama proizvođača, reverzno transkribovana MuLV reverznom transkriptazom u prisustvu nasmučenih heksamera (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*). Kvantitativna reverzna transkripciona lančana reakcija polimeraza (RT-qPCR) izvedena je u *Realplex2 Mastercycleru* (*Eppendorf, Hamburg, Nemačka*) korišćenjem *MicroAmp®* optičkih reakcionih ploča sa 96 bunarića, *TaqMan Universal PCR Master Mix-a* i *TaqMan* prajmera (sve od *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) za TNF (*Hs00174128_m1*), IL-1 (*Hs01555410_m1*), IL-6 (*Hs00174131_m1*), i 18S rRNK (*RNA18S; Hs03928985_g1*), TATA-box-vezujući protein (*TBP; Hs00427620_m1*), i hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferazu-1 (*HPRT1; Hs02800695_m1*), koji su korišćeni kao geni domaćini (engl. *housekeeping genes*). Testovi su izvedeni u duplikatima korišćenjem uslova termičkog ciklusa koje je preporučio proizvođač. Geometrijska srednja vrednost, Ct (engl. *cycle of threshold*) *TRN18S/TBP/HPRT1* gena oduzeta je od Ct vrednosti ciljnih gena da bi se dobila vrednost ΔCt . Vrednosti $\Delta\Delta Ct$ su dobijene oduzimanjem ΔCt vrednosti kontrolnih uzoraka od ΔCt vrednosti ispitivanih uzoraka, da bi se relativna ekspresija gena izračunala kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

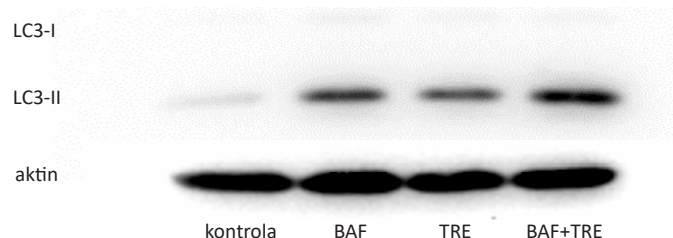
Statistička analiza

Statistička analiza je sprovedena pomoću *GraphPad Prism* programa. Za statističku analizu korišćen je *One-Sample t-test*, pri čemu je N označavao broj nezavisnih eksperimenata urađenih u duplikatu. Srednje vrednosti dobijenih podataka su poređene sa 1 kao arbitrarno postavljenom referentnom vrednosti. Statistički značajnim je smatrano $p < 0,05$. Rezultati analize su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija.

Rezultati

Trehaloza indukuje, a bafilomicin inhibira autofagni fluks u THP-1 ćelijama

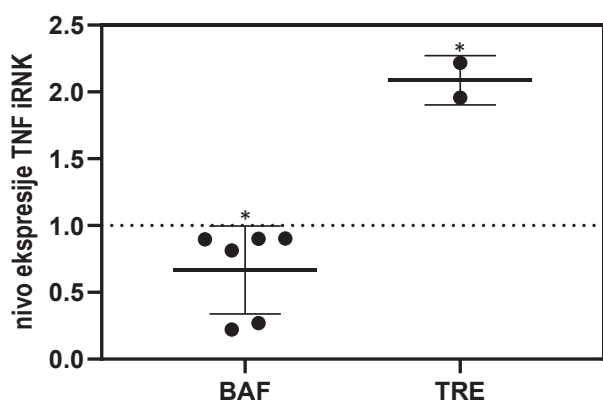
Kako bi se odredio uticaj trehaloze kao farmakološkog aktivatora autofagije određivan je autofagni fluks u prisustvu lizozomalnog inhibitora bafilomicina A1. Na **slici 1** prikazan je reprezentativni blot dobijen imunoblot metodom, kojim je analizirana ekspresija LC3 proteina u THP-1 ćelijama. Na osnovu *One-Sample t-testa* za vrednosti ekspresije LC3-II proteina, rezultati su pokazali statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) u odnosu na referentnu vrednost aktina (1,0). Na ovaj način je potvrđeno da bafilomicin A1 povećava intracelularne nivoe LC3-II, sprečavajući njegovu lizozomalnu degradaciju. Trehaloza je povećala nivo LC3-II, kako u prisustvu, tako i u odsustvu bafilomicina, što potvrđuje njenu sposobnost da indukuje konverziju LC3-I u LC3-II. Zajedno, ovi rezultati ukazuju na činjenicu da bafilomicin blokira, a trehaloza pojačava autofagni fluks u THP-1 ćelijama.



Slika 1. Imunoblot analiza LC3 konverzije u THP-1 ćelijama tretiranim bafilomicinom (BAF), trehalozom (TRE) i bafilomicinom i trehalozom zajedno (BAF+TREH)

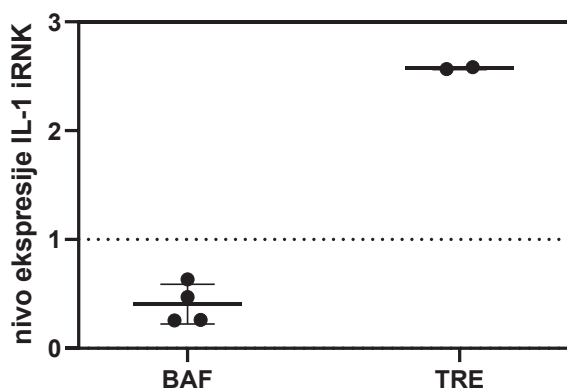
Inhibicija autofagije dovodi do smanjenja ekspresije glavnih proinflamatornih citokina

Pomoću RT-qPCR metode određivano je da li modulacija autofagije pomoću bafilomicina i trehaloze dovodi do promene ekspresije proinflamatornih citokina TNF, IL-1 i IL-6. Merene su vrednosti nivoa relativne genske ekspresije iRNK navedenih citokina. Analizom uzoraka THP-1 ćelija tretiranih trehalozom dobijeno je značajno ($p < 0,05$) povećanje transkripcije iRNK za TNF, IL-1 i IL-6 u odnosu na kontrolni uzorak ćelija koje nisu tretirane. Ćelijska linija tretirana bafilomicinom pokazala je značajno ($p < 0,05$) smanjenje transkripcije TNF, IL-1 i IL-6 u odnosu na kontrolu (grafikoni 1-3).



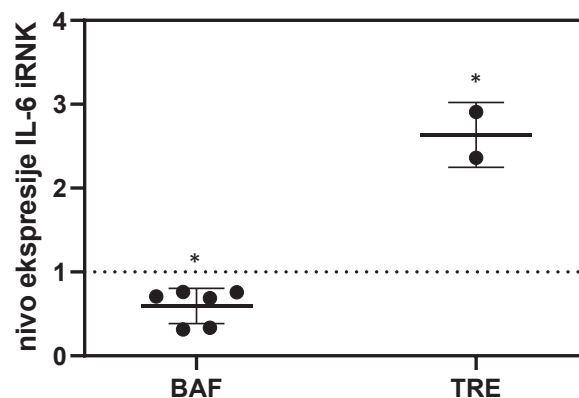
Grafikon 1. Relativna genska ekspresija TNF iRNK u THP-1 ćelijama tretiranim bafilomicinom (BAF) i trehalozom (TRE) (* $p < 0,05$; One-Sample t-test)

Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije. Isprekidana linija označava kontrolnu vrednost, koja je arbitrarno postavljena na 1



Grafikon 2. Relativna genska ekspresija IL-1 iRNK u THP-1 ćelijama tretiranim bafilomicinom (BAF) i trehalozom (TRE) (* $p < 0,05$; One-Sample t-test)

Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije. Isprekidana linija označava kontrolnu vrednost, koja je arbitrarno postavljena na 1



Grafikon 3. Relativna genska ekspresija IL-6 iRNK u THP-1 ćelijama tretiranim bafilomicinom (BAF) i trehalozom (TRE) (* $p < 0,05$; One-Sample t-test)

Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije. Isprekidana linija označava kontrolnu vrednost, koja je arbitrarno postavljena na 1

Diskusija

Uloga autofagije u inflamaciji je različita u zavisnosti od vrste ćelije u kojoj se odvija, ali i od puta aktivacije ovog procesa. Li (Lee) i sar. (2011) pokazali su da autofagija negativno reguliše inflamatorne odgovore u keratinocitima, što ukazuje na antiinflamatornu ulogu (16). Međutim, Ksi (Xi) i sar. (2015) pokazali su da autofagija u kontekstu hiperglikemijom indukovane vaskularne inflamacije ima proinflamatorni efekat (17). Prema istraživanju Zua (Zhou) i sar. (2020) autofagija u bakterijskoj infekciji može imati i antiinflamatorne efekte eliminacijom intracelularnih bakterija i oštećenih organela, ali takođe može promovisati inflamaciju aktivacijom određenih signalnih puteva (18).

Autofagija je neophodna za diferencijaciju i funkciju makrofaga, kao i za uklanjanje intracelularnih patogena. Inhibicija autofagije u makrofagima može dovesti do poremećaja sekrecije proinflamatornih citokina, perzistentnosti patogena i razvoja hroničnih infekcija. Ključna je za sazrevanje dendritskih ćelija i prezentaciju antigena. Promoviše prezentaciju antigena T-ćelijama, a neophodna je i za njihov opstanak i diferencijaciju u efektorske i memorijske ćelije. Takođe je važna za opstanak plazma ćelija. Defektna autofagija u B-ćelijama može dovesti do razvoja autoimunskih bolesti i limfoproliferativnih poremećaja (6-8, 19).

Poznato je da TNF indukuje autofagiju u različitim tipovima ćelija, uključujući hepatocite, kardiomiocite i epitelne ćelije. Pokazalo se da autofagija izazvana TNF igra zaštitnu ulogu u različitim inflamatornim stanjima, uključujući sepsu, akutnu povredu pluća i ishemijsko-reperfuzionu povredu. Interleukin-1 može da stimuliše autofagiju u različitim tipovima ćelija, uključujući makrofage i hondrocite. Autofagija indukovana IL-1 igra ulogu u uklanjanju oštećenih mitohondrija u hondrocitima i u regulaciji aktivacije inflamazoma u makrofagima. Interleukin-6 je plejotropni citokin za koji se pokazalo da reguliše autofagiju u različitim tipovima ćelija. Može da izazove autofagiju u hepatocitima, kardiomiocitima i endotelnim ćelijama. Pokazalo se da autofagija izazvana IL-6 igra ulogu u zaštiti od oštećenja jetre, apoptoze kardiomiocita i endotelne disfunkcije (3).

U ovom radu ispitivan je uticaj autofagije na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine TNF, IL-1 i IL-6 u THP-1 ćelijama humane akutne monocitne leukemije. Ova ćelijska linija može da se diferencira u ćelije nalik makrofaga, zbog čega predstavlja dobar model za proučavanje efekta različitih potencijalnih terapijskih supstanci na autofagiju. Bafilomicin je poznati inhibitor lizosomalne degradacije i negativno modulira proces autofagije, što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Inhibicijom autofagije bafilomicin dovodi do posledične inhibicije transkripcije gena za TNF, IL-1 i IL-6, što je potvrđeno značajnim smanjenjem koncentracije iRNK ovih citokina. Trehaloza se u literaturi navodi kao potencijalni induktor autofagije, što je i u THP-1 ćelijskoj liniji potvrđeno u ovom istraživanju *immunoblot* metodom. Aktivacija autofagije trehalozom dovela je do pojačane ekspresije ispitivanih citokina (TNF, IL-1, IL-6) u THP-1 ćelijama.

U literaturi nije pronađen podatak o uticaju autofagije na ekspresiju navedenih citokina u THP-1 ćelijskoj liniji i njihova povezanost sa opštom indukcijom i inhibicijom autofagije pomoću farmakološki aktivnih supstanci bafilomicina i trehaloze. Međutim, u poređenju sa drugim studijama, u kojima su dobijeni različiti rezultati koji sugerišu proinflamatorni ili antiinflamatorni efekat autofagije, može se uočiti da u ovom ćelijskom modelu ima proinflamatorni efekat.

Značajno je naglasiti ograničenje ove studije koje se odnosi na korišćenje modela imortalizovane THP-1 ćelijske linije dobijene od ćelija jednogodišnjeg dečaka. Imortalizovane ćelijske linije, iako korisne za proučavanje specifičnih ćelijskih procesa, ne odražavaju u potpunosti kompleksnost in vivo sistema, posebno uzimajući u obzir razlike u odgovorima koje se primećuju između muškaraca i žena, kao i u različitim postnatalnim fazama. Kao što Nun (*Nunes*) i sar. (2023) ističu, pol ćelijskih linija značajno može da utiče na rezultate pri istraživanju novih terapijski aktivnih agensa. Potrebna su dalja istraživanja sa različitim modelima kako bi se bolje razumeli odgovori u realnim biološkim uslovima (20).

Modifikovanjem procesa autofagije pomoću navedenih farmakološki aktivnih jedinjenja otvara se mogućnost za različite terapijske pristupe u regulisanju imunološkog odgovora i kontroli prekomerne inflamacije. Budući da je trehaloza netoksična i komercijalno dostupna supstanca, ona potencijalno može imati široku primenu u situacijama kada je potrebno stimulisati imunski odgovor, poput imunodeficijencija ili u terapiji maligniteta. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se omogućila adekvatna terapija jer, kao što je prethodno navedeno, autofagija može imati i stimulatívni i inhibitorni uticaj na proces onkogeneze.

Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se zaključiti da autofagija aktivira ekspresiju proinflamatornih citokina (TNF, IL-1, IL-6) tako što pozitivno reguliše transkripciju njihovih gena.

Literatura

1. Vucicevic L, Misirkic-Marjanovic M, Harhaji-Trajkovic L, Maric N, Trajkovic V. Mechanisms and therapeutic significance of autophagy modulation by antipsychotic drugs. *Cell Stress*. 2018; 2(11):282-91.
2. Ristic B, Harhaji-Trajkovic L, Bosnjak M, Dakic I, Mijatovic S, Trajkovic V. Modulation of cancer cell autophagic responses by graphene-based nanomaterials: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(16):4145.
3. Ge Y, Huang M, Yao Y ming. Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018; 43:38-46.
4. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(9):528-42.
5. Onorati A V., Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer*. 2018; 124(16):3307-18.
6. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(9):823-30.
7. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011; 469(7330):323-35.
8. Matsuzawa-Ishimoto Y, Hwang S, Cadwell K. Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2018; 36:73-101.
9. Paunovic V, Peric S, Vukovic I, Stamenkovic M, Milosevic E, Stevanovic D, et al. Downregulation of LKB1/AMPK Signaling in Blood Mononuclear Cells Is Associated with the Severity of Guillain-Barre Syndrome. *Cells*. 2022; 11(18):2897.
10. Clarke AJ, Simon AK. Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2019; 19(3):170-83.
11. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014; 23(1):37-45.
12. Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, et al. In search of an "autophagometer." *Autophagy*. 2009; 5(5):585-9.
13. Hosseinpour-Moghaddam K, Caraglia M, Sahebkar A. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts. *J Cell Physiol*. 2018; 233(9):6524-43.
14. Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*. 2016; 12(2):245-60.
15. Paunovic V, Vucicevic L, Misirkic Marjanovic M, Perovic V, Ristic B, Bosnjak M, et al. Autophagy Receptor p62 Regulates SARS-CoV-2-Induced Inflammation in COVID-19. *Cells*. 2023; 12(9):1282.
16. Lee HM, Shin DM, Yuk JM, Shi G, Choi DK, Lee SH, et al. Autophagy Negatively Regulates Keratinocyte Inflammatory Responses via Scaffolding Protein p62/SQSTM1. *J Immunol*. 2011; 186(2):1248-58.
17. Wu Y, Jin Y, Sun T, Zhu P, Li J, Zhang Q, et al. P62/SQSTM1 accumulation due to degradation inhibition and transcriptional activation plays a critical role in silica nanoparticle-induced airway inflammation via NF-κB activation. *J Nanobiotechnology*. 2020; 18(1):77.
18. Xi G, Shen X, Wai C, Vilas CK, Clemmons DR. Hyperglycemia stimulates p62/PKCζ interaction, which mediates NF-κB activation, increased Nox4 expression, and inflammatory cytokine activation in vascular smooth muscle. *FASEB Journal*. 2015; 29(12):4772-82.
19. Wu MY, Lu JH. Autophagy and Macrophage Functions: Inflammatory Response and Phagocytosis. *Cells*. 2019; 9(1):70.
20. Nunes LM, Robles-Escajeda E, Santiago-Vazquez Y, Ortega NM, Lema C, Muro A, et al. The gender of cell lines matters when screening for novel anti-cancer drugs. *AAPS Journal*. 2014; 16(4):872-4.