

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Goran D. Stegnjaić

**Uticaj fenetil estara ruzmarinske i galne
kiseline na tok bolesti i karakteristike
imunskih ćelija uključenih u etiopatogenezu
eksperimentalnog autoimunskog
encefalomijelitisa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Goran D. Stegnjaić

**The effect of the phenethyl esters of
rosmarinic and gallic acid on the course of
the disease and the characteristics of
immune cells involved in the
etiopathogenesis of experimental
autoimmune encephalomyelitis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI:

dr Bojan Jevtić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Marija Adžić Bukvić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Danijela Laketa, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Mirjana Nacka-Aleksić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije (INEP)

dr Milica Lazarević, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru aktivnosti finansiranih od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007 i 451-03-66/2024-03/200007).

Zahvaljujem se

dr Bojanu Jevtiću, mom mentoru, prijatelju i Biserki, na ogromnoj podršci i pomoći u izradi doktorske disertacije. Hvala na dugim razgovorima, smehu i jutarnjim kafama. Bok. Snađi se.

dr Mariji Adžić Bukvić, na savetima koji su doprineli izgledu doktorske disertacije. Hvala na primeru mladim ljudima kakav odnos prema nauci treba da imaju.

dr Danijeli Laketi, na korisnim sugestijama koje su uticale na kvalitet ove doktorske disertacije. Hvala pre svega na uvođenju u svet nauke tokom osnovnih akademskih studija i stvaranju ljubavi prema fiziologiji.

dr Mirjani Nacki-Aleksić, na ogromnoj posvećenosti prilikom čitanja doktorske disertacije. Hvala na svim sugestijama koje su umnogome poboljšale izgled doktorske disertacije i doprinele kritičkom razmišljanju tokom njenog pisanja.

dr Milici Lazarević, na ogromnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije. Hvala mom saborcu na lepoj atmosferi, smehu i podršci.

dr Đorđu Miljkoviću, na prilici da se uključim u rad grupe za Neuroimunologiju. Hvala na ažurnosti, prilici da učim, na osećaju pripadnosti i svim jutarnjim kafama. Hvala na svim sugestijama koje su doprinele poboljšanju doktorske disertacije.

Nedici, na uvođenju u osnove sterilnog rada (tvoj glas čujem kada radim u dvojci), razgovorima i uvek pozitivnoj atmosferi.

Suzi, na satima provedenim u operacionoj sali i svim razgovorima.

Tamarici i Dragici, na razgovorima, terasama i smehu.

Ivani, Nataši, Nataliji, Miri, Milji, Ivanu P i Ivanu K, na razgovorima, zajedničkom radu u labu, pićima i uvek pozitivnoj atmosferi.

dr Mariji Mostarici-Stojković, na podršci na samom početku ulaska u naučni svet i na doprinosu razvoja kritičkog promišljanja.

Onkolozima i Ekolozima, na uvek prijatnoj atmosferi u labu 66 i labu 2, zadovoljstvo je raditi sa vama.

dr Predragu Vujoviću, mom mentoru sa master akademskih studija, na stvaranju drugačije naučne perspektive, svim savetima i razgovorima (pogotovo na liniji 16).

Goranu Đmuri, na ogromnoj pomoći u životinjskom bloku i naučenim veštinama rukovanja sa životinjama.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima, na podršci i veri u mene. Sekici, mom Dimiju, mom Mati i zetu, na svim zajedničkim trenucima i ljubavi. Ogromnoj rodbini, na ogromnoj podršci. Hvala što ste uvek tu. Hvala i onima koji više nisu sa nama. Hvala (trenutno) najjačim ljudima u mom životu, Mići, JK, JJ, Sanji, Nataly, Imenu i Prezimenu, Ediju, Kumici Jali, Milijani, Gariju, Joxy i Maji. Hvala vam što ste tu. Nadam se da ću biti manji inhibitor zabave nakon ovoga i odazivati se na sve vaše pozive.

Uticaj fenetil estra ruzmarinske i galne kiseline na tok bolesti i karakteristike imunskih ćelija uključenih u etiopatogenezu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Sažetak

Ruzmarinska kiselina i galna kiselina su fenolna jedinjenja koja se nalaze u različitim vrstama biljaka i koja su poznata po svojim antioksidativnim i antiinflamacijskim svojstvima. U ovoj studiji su ispitivani fenetil estarski derivati ovih jedinjenja zbog prethodno zapažene povećane biodostupnosti i efikasnosti u odnosu na prekursorne supstance. Istraživanja su vršena *in vitro* i *in vivo* na modelu autoimunosti centralnog nervnog sistema (CNS), eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE). Fenetil estri ruzmarinske (PERA) i galne kiseline (PEGA) su smanjili produkciju encefalitogenih citokina, uključujući interferon (IFN)- γ i interleukin (IL)-17, u imunskim ćelijama i prečišćenim CD4⁺ ćelijama poplitealnih limfnih čvorova (PLČ) i imunskim ćelijama koje infiltriraju kičmenu moždinu (SCIC). Pored toga, oba derivata su pokazala sposobnost da suprimiraju produkciju NO od strane SCIC i BV2 ćelija mikroglije, dok su stimulisali produkciju NO u ćelijama PLČ. Takođe, ova jedinjenja su smanjila količinu proinflamacijskih citokina koje proizvode BV2 ćelije. PERA nije ostvario efekat na udeo regulatornih T-ćelija (Treg), pomoćničkih T ("T helper" - Th)1 ćelija i Th17 ćelija među SCIC. PEGA je smanjio procenat Th17 ćelija, ali ne i Treg i Th1. Oba jedinjenja su značajno smanjila udeo aktivisanih Th ćelija (CD25⁺) među CD4⁺ ćelijama SCIC. Konačno, primena bilo kog od derivata u EAE je dovela do ograničavanja neuroloških znakova bolesti, smanjenja broja infiltrata na preseku kičmene moždine, broja ćelija po infiltratu i područja demijelinizacije u kičmenoj moždini. Ovi rezultati ukazuju na potencijalna imunomodulacijska svojstva PERA i PEGA u kontekstu autoimunosti CNS, te ih preporučuju za dalja istraživanja u cilju terapijske primene.

Ključne reči: ruzmarinska kiselina, galna kiselina, fenetil-estarski derivati, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, encefalitogeni citokini, imunske ćelije, NO, BV2 ćelije, T-ćelije, imunomodulacijska svojstva

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

The effect of the phenethyl ester of rosmarinic and gallic acid on the course of the disease and the characteristics of immune cells involved in the etiopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis

Abstract

Rosmarinic acid and gallic acid are phenolic compounds found in various plants and are known for their antioxidant and anti-inflammatory properties. Due to the enhanced bioavailability and efficacy of ester compounds, phenethyl ester derivatives of rosmarinic and gallic acid were investigated *in vitro* and *in vivo* using an animal model of the central nervous system (CNS) autoimmunity - experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Phenethyl ester of rosmarinic acid (PERA) and phenethyl ester of gallic acid (PEGA) showed a remarkable ability to reduce the production of encephalitogenic cytokines, including interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-17, in immune cells from popliteal lymph nodes (PLN), CD4⁺ T cells from PLN, and spinal cord immune cells (SCIC). In addition, both derivatives showed the ability to suppress NO production by SCIC and microglial BV2 cells, while increasing its production in PLN. Also, PERA and PEGA decreased the amount of proinflammatory cytokines produced by BV2 cells. PERA had no effect on the proportion of regulatory T cells (Treg), helper T (Th) 1 cells, and Th17 cells among SCIC. PEGA decreased the percentage of Th17 cells, whereas proportion of Treg and Th1 cells was unaffected. Both PERA and PEGA significantly decreased proportion of CD25⁺ cells among CD4⁺ cells, *i.e.* activated Th cells in SCIC. Administration of PERA and PEGA significantly improved EAE symptoms, and decreased the number of infiltrates on spinal cord sections, the number of cells per infiltrate, and the demyelination area in the spinal cord. These results highlight the promising immunomodulatory properties of PERA and PEGA in the context of CNS autoimmunity, and position them as potential therapeutic candidates.

Key words: rosmarinic acid, gallic acid, phenethyl ester derivatives, experimental autoimmune encephalomyelitis, encephalitogenic cytokines, immune cells, NO, BV2 cells, T-cells, immunomodulatory properties

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunobiology

Lista skraćenica:

ADAM10 - *engl.* A disintegrin and metalloproteinase domain 10
Akt - *engl.* Protein kinase B
APC - alofikocijanin
APC-eFluor780 - alofikocijanin-eFluor780
APC - antigen-prezentujuća ćelija
BACE1 - *engl.* Beta-Site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
BSA - goveđi albumin iz seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin)
CAT - katalaza
CCL - (*engl.* C-C motif chemokine ligand)
CD - *engl.* cluster of differentiation
CFA - kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's Adjuvant)
CNPase - *engl.* 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
CNS - centralni nervni sistem
Cox-2 – ciklooksigenaza 2 (*engl.* cyclooxygenase-2)
CSF - cerebrospinalna tečnost (*engl.* cerebrospinal fluid)
CV - *engl.* Crystal Violet
CXCL - *engl.* C-X-C chemokine motif ligand
d.n.i - dan nakon imunizacije
DA - *engl.* Dark Agouti
DAF-FM - 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescin diacetat
DAMP - molekuli oštećenih ćelija i tkiva (*engl.* Damage associated molecular patterns)
DĆ - dendritske ćelije
DHR - dihidrorodamin
DMSO - dimetil-sulfoksid (*engl.* Dimethyl Sulfoxide)
DMT - terapija koja modifikuje tok bolesti (*engl.* disease modifying therapy)
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
EBV - Epštajn-Barov virus (*engl.* Epstein-Barr Virus)
EDTA - etilendiamin tetrasirćetna kiselina
ELISA - *engl.* Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
fAβ - fibrilarni amiloid beta (*engl.* fibrillar amyloid-beta)
FCS - serum fetusa govečeta (*engl.* Fetal Calf Serum)
FITC - fluorescin izotiocijanin
Foxp3 - *engl.* forkhead box P3 protein
GA - galna kiselina (*engl.* Gallic acid)
GCLC - *engl.* glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM - *engl.* glutamate-cystein ligase modifier subunit
GFAP - glijski fibrilarni kiseli protein (*engl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP)
GPx - glutation peroksidaza
GWAS - *engl.* Genome-Wide Association Studies
HKM - homogenat kičmene moždine
HLA – humani leukocitni antigen
HO-1 – hem-oksigenaza-1
i.f. - intenzitet fluorescence
IFN - interferon (*engl.* Interferon)
IκB - *engl.* inhibitor of κB
IL - interleukin (*engl.* Interleukin)
iNOS - inducibilne sintaze azot-monoksida (*engl.* Inducible Nitric Oxide Synthase)

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
k.o - klinička ocena
LFA-1 - *engl.* lymphocyte function-associated-1
LPS - lipopolisaharid
MAG - *engl.* Myelin-associated glycoprotein
MAPK - mitogenom-aktivirana protein kinaza
MBP - mijelin bazni protein
MCP-1 - *engl.* monocyte chemoattractant protein-1
MFI - *engl.* mean fluorescence intensity
MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex)
MIP-1 α - *engl.* macrophage inflammatory protein-1 alpha
MMP - *engl.* matrix metalloproteinase
MOBP - *engl.* Myelin-associated oligodendrocyte basic IgG - imunoglobulin G
MOG - mijelin oligodendrocitni glikoprotein
MPO – mijeloproteinaza
MS - multipla skleroza
MTT - (3-4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
NF-kB - nuklearni faktor kB
NK - urođenoubilačke (*engl.* Natural killer)
NO - azot monoksid
NOD - *engl.* NonObese Diabetic
NQO1 - NAD(P)H gvinon-oksidoireduktaza 1 (*engl.* NAD(P)H Quinon oxidoreductase 1)
Nrf2 - *engl.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OSP - *engl.* Oligodendrocyte-specific protein
PAMP - molekulski obrazce patogena (*engl.* Patogen associated molecular patterns)
PBS - *engl.* Phosphate Buffer Saline
PCR - reakcija lančanog umnožavanja (*engl.* Polymerase Chain Reaction)
PE - fikoeritrin (*engl.* phycoerythrin)
Pe-Cy-5 - PE-cijanin-5
PEGA - fenetil ester galne kiseline (*engl.* phenethyl ester of gallic acid)
PERA - fenetil ester ruzmarinske kiseline (*engl.* phenethyl ester of rosmarinic acid)
PerCP-Cy5.5 - peridin hlorofil protein-cijaninom 5.5 (*engl.* Peridin chlorophyll protein-Cyanine5.5)
PFA - paraformaldehid
PGE2 - prostaglandin E2 (*engl.* prostaglandin E2)
PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza (*engl.* phosphoinositide 3-kinase)
PLČ - poplitealni limfni čvor
PLP - proteolipidni protein
PMA - *engl.* Phorbol Miristate Acetate
PP-MS - primarno-progresivna multipla skleroza
RA - ruzmarinska kiselina (*engl.* Rosmarinic acid)
RNS - reaktivne vrste azota (*engl.* Reactive nitrogen species)
ROR γ t - *engl.* retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma T
ROS - reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive oxygen species)
RPMI - *engl.* Roswell Park Memorial Institute
RR-MS - relapsno-remitettna multipla skleroza
RS - serum pacova (*engl.* rat serum)
S1P - sfingozin 1-fosfat
SCIC - imunske ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu (*engl.* spinal cord immune cells)
SOD - super-oksid dismutaza
SP-MS - sekundarno-progresivna multipla skleroza
STAT3 - *engl.* signal transducer and activator of transcription 3

T1D – dijabetes tipa 1 (*engl.* Type 1 Diabetes)
TCR - T-ćelijski receptor (*engl.* T-cell receptor)
TGF- β – faktor transformacije rasta beta (*engl.* transforming growth factor beta)
Th - pomoćničke T ćelije (*engl.* T helper cells)
TIMP1 - *engl.* tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TLR - receptori slični Tollu (*engl.* Toll-like receptors)
TMEV - Tajlerov mišji virus encefalomijelitisa (*engl.* Theiler's murine encephalomyelitis virus)
TNF - faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor necrosis factor)
Treg - regulatorne T-ćelije (*engl.* regulatory T cells)
TUNEL - *engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling
VCAM-1 - *engl.* vascular cell adhesion molecule 1

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Multipla skleroza.....	2
1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelits	4
1.3. Imunske ćelije uključene u patogenezu MS i EAE	5
1.4. NO u inflamaciji.....	9
1.5. Terapijski pristupi multiploj sklerozi	10
1.6. Fenetil estri ruzmarinske i galne kiseline	11
2. Ciljevi	14
3. Materijal i metode	16
3.1. Reagensi i rastvori	17
3.2. Eksperimentalne životinje	19
3.3. EAE	19
3.3.1. Imunizacija pacova	19
3.3.2. Evaluacija kliničke slike	19
3.3.3. <i>In vitro</i> primena PERA i PEGA	19
3.4. Izolovanje i kultivacija ćelija	19
3.4.1. Izolovanje, kultivacija i tretmani PERA/PEGA ćelija PLČ DA pacova.....	19
3.4.2. Kultivacija i tretman BV2 ćelija mikroglije sa PERA/PEGA.....	21
3.4.3. Izolacija, kultivacija i tretman PERA/PEGA SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu bolesti.....	21
3.5. Određivanje broja ćelija metodom Tripan plavo.....	22
3.6. Prečišćavanje CD4 ⁺ ćelija magnetnom separacijom	22
3.7. Određivanje vijabilnosti ćelija testom Kristal violet.....	22
3.8. Određivanje vijabilnosti ćelija testom MTT	23
3.9. Merenje produkcije citokina metodom ELISA	23
3.10. Metoda reakcije lančanog umnožavanja	24
3.10.1. Izolovanje ukupne RNK.....	24
3.10.2. Reakcija reverzne transkripcije	24
3.10.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	25
3.11. Merenje produkcije NO.....	26
3.12. Citofluorimetrija.....	26
3.12.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula	26
3.12.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula	27
3.12.3. Merenje procenta apoptotičnih ćelija.....	28
3.12.4. Merenje procenta ćelija koje vrše fagocitozu	28

3.12.5. Merenje produkcije ROS	28
3.12.6. Analiza uzoraka dobijenih protočnom citometrijom	28
3.13. Analiza ćelija u realnom vremenu	29
3.14. Primena PERA/PEGA na pacovima <i>in vivo</i>	29
3.15. Histološka analiza preseka kičmene moždine	29
3.15.1. Priprema histoloških preseka kičmenih moždina u parafinu	29
3.15.2. Bojenje histoloških preseka kičmenih moždina H&E	29
3.15.3. Bojenje histoloških preseka kičmenih moždina bojom SBB	30
3.16. Statistička obrada podataka	30
4. Rezultati	31
4.1. Imunomodulacijski efekat <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na ćelije PLČ DA pacova imunizovanih za EAE	32
4.1.1. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE	32
4.1.2. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na nivo ekspresije gena <i>Tgfbβ</i> , <i>P40</i> , <i>P19</i> , <i>P35</i> i <i>Il-6</i> u ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih za EAE	33
4.1.3. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na funkcionalne i fenotipske karakteristike CD4 ⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE	35
4.1.4. Ispitivanje <i>in vitro</i> uticaja tretmana PERA/PEGA na sintezu NO od strane ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE	43
4.2. Imunomodulacijski efekat <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na aktivirane BV2 ćelije mikroglije	45
4.2.1. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na vijabilnost BV2 ćelija mikroglije i sintezu NO	45
4.2.2. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na produkciju inflamacijskih citokina od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije	46
4.2.3. Ispitivanje <i>in vitro</i> uticaja tretmana PERA/PEGA na aktivaciju BV2 ćelija mikroglije 48	
4.2.4. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na produkciju ROS i fagocitozu od strane BV2 ćelija mikroglije	49
4.2.5. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na fenotipske karakteristike aktiviranih BV2 ćelija mikroglije	52
4.3. Imunomodulacijski efekat <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE	54
4.3.1. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na vijabilnost i produkciju citokina SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE	54
4.3.2. Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na procenat apoptotičnih CD4 ⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE	56

4.3.3.	Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na procenat reaktivisanih CD4 ⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE	57
4.3.4.	Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE	58
4.3.5.	Ispitivanje uticaja <i>in vitro</i> tretmana PERA/PEGA na sintezu NO od strane SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE.....	60
4.4.	Efekat tretmana PERA/PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE indukovanog kod DA pacova	61
4.4.1.	Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE indukovanog kod DA pacova.....	61
4.4.2.	Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na preseccima kičmene moždine pacova kojima je indukovano EAE.....	63
4.4.3.	Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na demijelinizaciju u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE	65
5.	Diskusija	68
6.	Zaključci	79
7.	Literatura	81
	BIOGRAFIJA AUTORA	100
	Изјава о ауторству	101
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	102
	Изјава о коришћењу	103

1. Uvod

1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je hronična, inflamacijska, demijelinizujuća i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) sa izraženom autoimunskom komponentom (Murua i sar., 2022). MS je neurološko oboljenje sa većom učestalošću javljanja kod žena nego kod muškaraca. Najčešće pogađa mlade osobe, između 20. i 40. godine života, zbog čega predstavlja i veliki socioekonomski problem. Prema podacima Internacionalne federacije za multiplu sklerozu u 2023. godini u svetu je bilo 2.9 miliona ljudi obolelih od MS (preuzeto sa sajta www.atlasofms.org). Klinički pokazatelj bolesti su epizode neuroloških ispada koje su posledica razvoja lezija u različitim regionima CNS, a manifestuju se različitim motornim, senzornim, vizuelnim, kognitivnim i psihijatrijskim disfunkcijama (Javalkar i sar., 2016). Klinički tok bolesti varira među pacijentima obolelim od MS, na osnovu čega se klasifikuje nekoliko tipova ove bolesti: relapsno-remitentna MS (RR-MS), klinički izolovan sindrom, radiološki izolovan sindrom, primarno-progresivna MS (PP-MS) i sekundarno-progresivna MS (SP-MS) (Katz Sand, 2015). Najzastupljeniji tip MS je RR-MS i javlja se kod oko 85% pacijenata obolelih od MS. RR-MS se karakteriše smenjivanjem perioda neurološke disfunkcije (relapsa) i relativno stabilnih perioda u pogledu kliničkih simptoma (remisija). Iako se RR-MS inicijalno manifestuje kao bolest relapsno-remitentnog toka, kod jednog dela obolelih može nakon nekoliko godina da bude praćena progresivnom fazom bolesti te se tako izdvaja u drugi tip MS (SP-MS) (Lassmann i sar., 2007). PP-MS se javlja kod manjeg procenta osoba obolelih od MS (10-15%) i karakteriše se postepenim napredovanjem neuroloških poremećaja od samog početka bolesti, bez perioda remisije (Miller i Leary, 2007). Pored pomenutih tipova MS, postoji i kategorija benigne MS kod koje patološki procesi na nivou CNS ne dovode do ozbiljnih kliničkih simptoma (Ramsaransing i De Keyser, 2006).

Glavne histopatološke promene u MS su perivaskularne lezije u CNS koje predstavljaju mesto inflamacije i infiltracije imunskih ćelija, među kojima su najzastupljeniji T-limfociti i makrofagi. U lezijama se mogu javiti i druge ćelije i komponente imunskog sistema kao što su B-ćelije, plazma- i dendritske ćelije (DC), različita antitela i komponente komplekta (Henderson i sar., 2009). Lezije se kod pacijenata detektuju upotrebom magnetne rezonance i radiološki dokaz postojanja spacio-temporalno diseminovanih lezija u CNS predstavlja jedan od dijagnostičkih kriterijuma za MS (tzv. revidirani McDonald-ovi kriterijumi) (Absinta i sar., 2019). Lezije mogu nastati u beloj i sivoj masi, kako u mozgu tako i u kičmenoj moždini, i vrlo su heterogene prirode. Lezije u MS mogu se klasifikovati na aktivne, aktivne/neaktivne i neaktivne (Kuhlmann i sar., 2016), a pored njih postoji i četvrti tip označen kao remijelinizovan (Calvi i sar., 2022). Aktivne lezije se karakterišu visokom zastupljenosti ćelija koje vrše fagocitozu, a pokazuju fenotip aktivirane mikroglije ili makrofaga. Aktivirana mikroglija je naročito prisutna na ivicama demijelinizacionih lezija, dok su makrofagi više zastupljeni u centru lezije i karakterišu se prisustvom ostataka mijelinskog omotača i proteina mijelina u svojoj unutrašnjosti (Lassmann, 2018). Aktivne i neaktivne lezije se mogu razlikovati po tome da li je destrukcija mijelina u toku ili je prestala, ali su makrofagi prisutni i u aktivnim i u neaktivnim lezijama (Kuhlmann i sar., 2016). Karakteristika neaktivnih lezija je veoma mali broj T-ćelijskih infiltrata, makrofaga, mikroglije, zatim zrelih oligodendrocita, kao i oštećenje i gubitak aksona (Lassmann, 2011). Prisustvo imunskih ćelija i medijatora inflamacije u aktivnim lezijama dovodi do visokog stepena oksidativnih oštećenja posredstvom reaktivnih vrsta kiseonika (*engl.* Reactive oxygen species, ROS) i azota (*engl.* Reactive nitrogen species, RNS), što predstavlja jedan od glavnih mehanizama demijelinizacije i neurodegeneracije (Haider i sar., 2011). Lezije karakteristične za MS mogu se pojaviti na bilo kom mestu u mozgu, međutim postoje mesta koja su više sklona njihovom nastanku, kao npr. mesta sa velikom gustinom venskih krvnih sudova, koja predstavljaju oblasti izlaska imunskih ćelija iz krvotoka i ulaska u parenhim CNS. U progresivnoj formi MS, lezije nastaju i u ventrikularnoj beloj masi, i to na mestima sa niskim dopremanjem arterijske krvi, čime se dodatno povećavaju oksidativna oštećenja i histotoksična hipoksija usled smanjenog dopremanja kiseonika (Höftberger i sar., 2017).

Postoji nekoliko hipoteza o patogenezi MS, međutim najšire prihvaćena je ona koja zastupa gledište da je bolest autoimunske prirode i da nastaje na periferiji usled prekida tolerancije prema antigenima mijelina. Iako postoje i druga gledišta, samo učešće imunskog sistema u patogenezi MS je nedvosmisleno. Takođe, postoji mnoštvo podataka o uzrocima nastanka MS, ali etiologija MS je i dalje nepoznata, smatra se da su potencijalni faktori rizika veoma heterogeni, a mogu se podeliti u 2 kategorije: genetske i sredinske faktore. Smatra se da je etiopatogenetska heterogenost MS upravo posledica interakcije između različitih genetskih i sredinskih faktora kod svakog obolelog (Murua i sar., 2022).

Na važnost genetskih faktora u kontekstu MS ukazuje podatak da je njihov doprinos riziku nastanka bolesti 25 - 30%, kada su u pitanju monozigotni blizanci kod kojih je jedan oboleo od MS ili da rizik od razvijanja ove bolesti među rođacima prvog stepena iznosi oko 3%, dok je u opštoj populaciji taj rizik 0,1 - 0,3% (Patsopoulos, 2018). Studije genetskih asocijacija na čitavom genomu (*engl.* Genome-Wide Association Studies, GWAS) su detektovale preko 200 lokusa povezanih sa predispozicijom za nastanak MS (Baranzini i Oksenberg, 2017). Tako, humani leukocitni antigen (HLA) predstavlja region genoma uključen u regulaciju imunskog sistema kroz njegove proizvode (ligandi, receptori, proteini interakcije, signalni faktori i transkripcioni regulatori), obradu i prezentaciju antigena, kao i interakciju sa urođenoubilačkim (*engl.* Natural killer, NK) ćelijama i citokinima (Shiina i sar., 2009). Najranije studije su pokazale povezanost MS i HLA klase 1 alela A3 i B7, a zatim su kasnije studije pokazale asociiranost MS sa HLA klasom 2 polimorfizama Dw2 i DR2, naročito HLA DRB1*15:01, DQA1*01:02 i DQB1*06:02 haplotipova (Dyment i sar., 2004; Gourraud i sar., 2012). Takođe, pored HLA regiona, postoje i genski lokusi izvan HLA regiona koji su povezani sa razvojem MS, a ovi genski lokusi su uglavnom od značaja za regulaciju genske ekspresije. Genski lokusi izvan HLA su, na primer, povezani sa povećanjem ekspresije solubilnog receptora za faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor necrosis factor, TNF) ili sa povećanim vezivanjem interleukina (*engl.* Interleukin, IL)-22, što za posledicu ima neutralisanje njihovih regulatornih efekata (Waubant i sar., 2019).

Za razvoj MS bitni su i sredinski faktori među kojima virusne infekcije, parazitske infekcije, konzumiranje cigareta, izloženost sunčevom zračenju i snižen nivo vitamina D predstavljaju pretpostavljene faktore rizika za pojavu MS kod genetski predisponiranih osoba (Koch i sar., 2013). Kada govorimo o geografskoj distribuciji, bolest je neravnomerno raspoređena u svetu. Tako se javlja manje od pet slučajeva na 100.000 ljudi u tropskim oblastima i Aziji, i između 100 - 200 slučajeva u umerenim oblastima (Milo i Kahana, 2010). Naime, zastupljeno je mišljenje da učestalost pojave MS raste sa geografskom širinom, iako postoje izuzeci kao što su Sardinija sa visokom stopom učestalosti i sever Kanade sa niskom stopom (Milo i Kahana, 2010). Biološke efekte vitamin D ostvaruje preko receptora za vitamin D, koji pripada superfamiliji steroidnih receptora, a utiče na ekspresiju i prezentaciju antigena od strane HLA-DR molekula (Handunnetthi i sar., 2010). Na modelu EAE je pokazano da vitamin D imunomodulacijsku aktivnost ostvaruje kroz uspostavljanje tolerogenosti dendritskih ćelija, kao i porasta procenta regulatornih T-ćelija (*engl.* regulatory T cells, Treg) u limfnim čvorovima (Farias i sar., 2013). Zatim, studije su pokazale da se nizak nivo serumskog vitamina D (25-OH-D) može uočiti rano na početku bolesti kod velikog broja ljudi, što se pored smanjene izloženosti sunčevom zračenju dovodi u vezu sa nastankom MS, zbog njihove imunomodulacijske uloge (Ao i sar., 2021; Pierrot-Deseilligny i Souberbielle, 2017; Smolders i sar., 2009).

Pored konzumiranja cigareta, koje povećava predisponiranost za nastanak MS (Hedström i sar., 2013) i utiče na sam tok bolesti (Wingerchuk, 2012), infekcije predstavljaju najistraživaniji sredinski faktor u nastanku MS. Mnoštvo infektivnih agenasa je dovedeno u vezu sa etiologijom MS, među kojima su infekcije Epštajn-Barovim virusom (*engl.* Epstein-Barr Virus, EBV) (Ruprecht, 2020), varicela zoster virusom (Najafi i sar., 2016), gljivama iz roda Candida (Benito-León i Laurence, 2017). Naime, molekulska mimikrija se navodi kao mehanizam kojim dolazi do nastanka autoreaktivnih

pomoćničkih T-ćelija (*engl.* T helper cells, Th) u slučaju infekcije EBV i drugih infekcija (Ruprecht, 2020), a pored toga postoje i drugi mehanizmi kojima infektivni agensi mogu da dovedu do pokretanja autoimunskog odgovora, kao npr. posredna aktivacija i širenje epitopa, kao i direktno održavanje autorektivnih efektorskih T-ćelija ili antigen-prezentujućih ćelija (APC) i dr. (Kakalacheva i sar., 2011).

Pored svih navedenih faktora, važno je spomenuti ulogu crevne mikrobiote u kontekstu neuroloških poremećaja. Veza između CNS i crevne mikrobiote je bidirekciona, a važnost njihove interakcije se definiše terminom osa mikrobiota-creva-mozak. Bakterije crevne mikrobiote imaju ulogu u aktivaciji crevnih Th17 ćelija, koje su važne u autoimunosti, ali određene bakterije mogu ostvarivati i antiinflamacijski potencijal kroz efekte na Th1 i Treg ćelije (Grochowska i sar., 2019).

1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je inflamacijska bolest CNS indukovana u laboratorijskim životinjama. Ona se zasniva na autoimunskom odgovoru prema antigenima CNS koji dovodi do oštećenja nervnog tkiva. EAE je široko korišćen animalni model za MS zbog sličnosti na nivou mehanizama, kliničke slike i histopatologije između ove dve bolesti (Rao i Segal, 2012). EAE prema načinu indukcije klasifikujemo na aktivni, pasivni i spontani. Aktivna indukcija se izvodi imunizacijom emulzijom koja sadrži proteinske antigene poreklom iz CNS ili njihove peptide emulgovane u odgovarajućem adjuvansu, najčešće kompletnom Freundovom adjuvansu (*engl.* Complete Freund Adjuvant, CFA) (Weissert, 2016). Jedan od najšire korišćenih modela EAE je aktivno indukovani EAE kod C57BL/6 miševa upotrebom emulzije koja sadrži peptid - mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ u CFA uz primenu pertusis toksina (Contarini i sar., 2018). Aktivna imunizacija se može izvršiti i ubrizgavanjem homogenata kičmene moždine (HKM) bez adjuvansa DA (*engl.* Dark Agouti) pacovima. Ovim se eliminiše upotreba CFA, odnosno izbegava se odgovor imunskog sistema na antigene Mycobacterium, a time i uticaj CFA na tok imunskog odgovora (Lazarević i sar., 2021). Pasivna indukcija podrazumeva adoptivni transfer T-limfocita, izolovanih iz životinja koje su prethodno imunizovane antigenom CNS u zdrave primaocice, ili transfer CD4⁺ T-ćelija specifičnih za antigene CNS (Tanaka i sar., 2017). Spontani EAE se razvija kod transgenih C57BL/6 miševa, koji nastaju ukrštanjem miševa transgenih za T-ćelijski receptor (TCR) koji prepoznaje MOG₃₅₋₅₅ i miševa transgenih za antitela za MOG (IgH^{MOG}). Na taj način se dobijaju dvostruko transgene životinje koje razvijaju optikospinalni EAE (Krishnamoorthy i sar., 2006). Antigeni koji mogu indukovati autoimunski odgovor u EAE, a za koje se pretpostavlja da imaju ulogu i u patogenezi MS, uključuju antigene mijelina, kao što su mijelinski bazni protein (MBP) i proteolipidni protein (PLP), MOG, MOBP (*engl.* myelin-associated oligodendrocyte basic protein), MAG (*engl.* myelin-associated glycoprotein), OSP (*engl.* oligodendrocyte-specific protein), Nogo-A, CNPase (*engl.* 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase), antigene glije, kao što su glijski fibrilarni kiseli protein (*engl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP), S100β, αβ-kristalin i antigene neurona (kao što su neurofilament-L, neurofilament-M, β-sinuklein, kontaktin-2, neurofascin) (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009).

Kliničke manifestacije EAE su slabost repa, pareza ili paraliza zadnjih ekstremiteta, paraliza prednjih ekstremiteta, a kao krajnja manifestacija bolesti može nastupiti i smrt. Životinjski modeli mogu dati uvid u ćelijske i molekularne mehanizme koji stoje iza različitih tipova MS koje karakteriše različit klinički tok. Tako, kod C57BL/6j miševa imunizovanih peptidom MOG₃₅₋₅₅ se razvija hronični EAE (Kipp i sar., 2017), dok se u istom soju miševa aplikovanjem malih doza MOG₃₅₋₅₅ peptida ili adjuvansa može indukovati relapsno-remitentni tok EAE (Procaccini i sar., 2015). EAE kod SJL miševa indukovani aktivnom imunizacijom PLP₁₃₉₋₁₅₁ ili pasivnim transferom T-limfocita specifičnih za PLP₁₃₉₋₁₅₁, takođe ima relapsno-remitentni tok. Postoji i nekoliko modela EAE koji odgovaraju SP-MS, kao npr. onaj u Biozzi ABH miševima indukovani HMK, gde bolest prvo ima relapsno-remitentni tok koji zatim prelazi u progresivni tok. Konačno, najbliži PP-MS je EAE u NOD (*engl.*

Nonobese Diabetic) miševima indukovan niskim dozama MOG₃₅₋₅₅, koji ima hronično-progresivni tok, a koji može imati faze delimičnog oporavka (Simmons i sar., 2013). U ovoj doktorskoj disertaciji je korišćen model EAE indukovan aktivnom imunizacijom HKM bez Frojndovog adjuvansa kod DA pacova koji karakteriše tok bolesti koji nalikuje na hroničnu formu MS. Važno je istaći da se u ovom modelu istovremeno mogu identifikovati četiri različite kliničke forme, a to su akutna lakša, akutna teža sa oporavkom, teža hronična i letalna. Prednost ovog modela je ta što omogućava proučavanje različitih kliničkih tokova na istom modelu EAE koji odgovaraju kliničkim slikama koje se manifestuju u MS (Lazarević i sar., 2024). Pored toga, još jedna prednost EAE indukovanog u DA pacovima imunizacijom HKM je i ta da se u njemu detektuje infiltracija imunskih ćelija u mozak što je bitna odlika MS, pa time ovo predstavlja validan model za izučavanje inflamacije u mozgu (Stegnjaić i sar., 2024).

S obzirom na to da MS potencijalno ima i virusnu etiologiju, značajna je upotreba i modela demijelinizacije koja je izazvana infekcijom virusima. Među najviše korišćenim virusnim modelima je model indukovan Tajlerovim mišjim virusom encefalomijelitisa (*engl.* Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus, TMEV), koji karakteriše bifazna bolest, prvo se razvija akutni polioencefalomijelitis koji je zatim praćen hroničnom progresivnom demijelinizirajućom fazom (Pike i sar., 2022). Pored toga, postoje i hemijski modeli demijelinizacije indukovane toksičnim supstancama poput kuprizona, lizolecitina i etidijum bromida (Lassmann i Bradl, 2017). Tako npr., kuprizon dovodi do smrti oligodendrocita, aktivacije makrofaga i mikroglije, kao i do oštećenja aksona, a time predstavlja validan model za proučavanje procesa demijelinizacije, remijelinizacije, kao i testiranje terapeutika (Zendedel i sar., 2013).

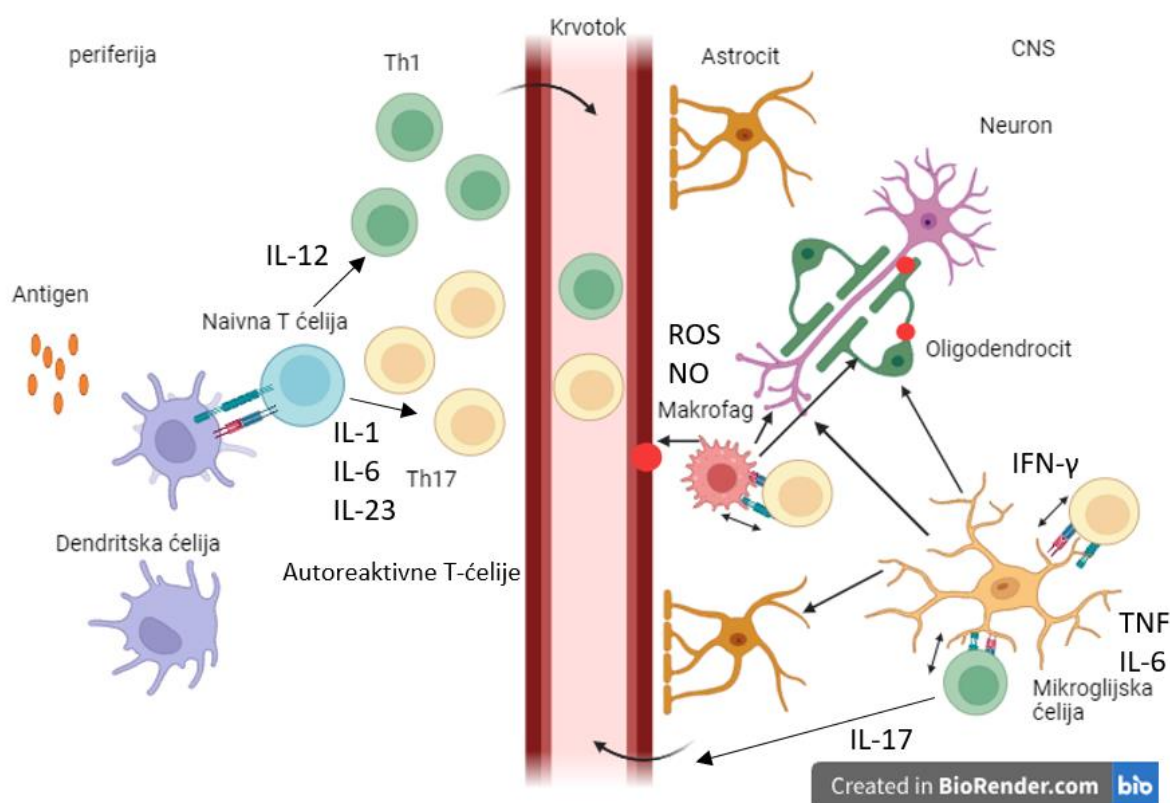
Uprkos širokoj upotrebi EAE u prekliničkim studijama, postoje i ograničenja ovog modela. Naime ističe se da je EAE bolest koja uglavnom zahvata kičmenu moždinu, dok MS pretežno zahvata mozak, kao i da režim imunizacije u EAE pokreće CD4⁺ T-ćelijski odgovor, dok je u MS dominantan CD8⁺ T-ćelijski odgovor. Sa druge strane, odabir režima imunizacije i soja nosi sa sobom dodatna ograničenja, tako npr. upotreba C57BL/6 miševa ograničava izučavanje relapsa (Ransohoff, 2012).

1.3. Imunske ćelije uključene u patogenezu MS i EAE

Najviše podataka o ulozi imunskog sistema u patogenezi MS je dobijeno iz studija na modelu EAE. Naime, i u MS i EAE, komponente urođene i stečene imunosti pokazale su se kao bitne u patogenezi bolesti. Smatra se da disregulacija u funkcionisanju jedne, druge ili obe komponente dovodi do nekontrolisanog autoimunskog odgovora (Sospedra i Martin, 2005). Ćelije urođene imunosti koje su bitne u patogenezi MS i EAE su mononuklearni fagociti (monociti, makrofagi i DĆ), NK ćelije, granulociti i mast ćelije. Pored pobrojanih, značajno mesto u patogenezi MS i EAE imaju i ćelije mikroglije, koje predstavljaju tkivno specifične ćelije urođene imunosti u CNS. Kada je u pitanju patogeneza MS postoje dokazi o doprinosu skoro svake od pobrojanih populacija. Međutim, najizučavanije među njima su DĆ kao inicijatori imunskog odgovora, zatim makrofagi i mikroglija kao populacije značajne i za inicijalnu i za efektorsku fazu imunskog odgovora. Takođe, bitno je napomenuti da se CNS smatra imunoprivilegovanim mestom zahvaljujući postojanju krvno-moždane barijere, čime je ograničen pristup imunskih ćelija u CNS, kao i tkivno specifičnih mehanizama tolerancije/izbegavanja imunskog odgovora (Galea i sar., 2006). Kroz CNS stalno prolaze i nadziru ga imunske ćelije, zajedno sa mikroglijom (Ousman i Kubes, 2012). Međutim, aktivacija imunskih ćelija bilo na periferiji, bilo unutar cerebrospinalne tečnosti (*engl.* cerebrospinal fluid, CSF) olakšava njihov ulazak u CNS. U EAE, kod određenih sojeva eksperimentalnih životinja i u zavisnosti od primenjenog antigena, autoantigen-reaktivne T-ćelije, koje su izbegle negativnu selekciju u timusu, aktiviraju se na periferiji neuropeptidom i pod uticajem mikrookruženja se njihov fenotip oblikuje, prelaze u cirkulaciju i migriraju u CNS (Kurchus, 2015). Ukoliko dođe do njihove reaktivacije u CNS, pojačava se produkcija citokina i hemokina, koja posledično dovodi do narušavanja krvno-moždane

barijere, a time i do amplifikacije infiltracije T-ćelija i drugih imunskih ćelija u moždani parenhim (Sospedra i Martin, 2016) (Slika 1).

Aktivacija urođenog imunskog odgovora se odvija preko TLR (*engl.* Toll-like receptors) koji prepoznaju molekulske obrasce patogena (*engl.* Patogen associated molecular patterns, PAMP), kao i preko receptora koji prepoznaju molekule oštećenih ćelija i tkiva (*engl.* Damage associated molecular patterns, DAMP) (Loma i Heyman, 2011). Kao odgovor na aktivaciju, ćelije urođene imunosti započinju niz biohemijskih i ćelijskih procesa. Nakon uspješne eradikacije infektivnog ili drugog stranog agensa, ćelije urođene imunosti učestvuju i u reparaciji oštećenog tkiva. Nakon aktivacije, APC, među kojima ključnu ulogu imaju DC, u perifernim limfnim organima prezentuju peptide antigena u sklopu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) I i/ili II klase naivnim T-limfocitima, subpopulaciji cirkulišućih zrelih T-ćelija koje prethodno nisu bile izložene relevantnom antigenu. Naivni T-limfociti prepoznaju kompleks MHC-peptid na APC pomoću svojih TCR, a dodatnom interakcijom između kostimulatornih molekula na APC i odgovarajućih receptora na naivnim T-ćelijama, a to su: CD3, CD28, LFA-1 (*engl.* lymphocyte function-associated-1) i CD2, nastaje tzv. imunološka sinapsa i dolazi do aktivacije ovih ćelija (Grigoriadis i sar., 2015). Nakon toga, aktivirane T-ćelije proliferišu, migriraju do mesta gde su prisutni antigeni, i ostvaruju svoje efektorske funkcije kroz ćelijski-posredovanu citotoksičnost i produkciju citokina (Broere i sar., 2011).



Slika 1. Šematski prikaz patogeneze eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE).

DC predstavljaju profesionalne APC koje patroliraju unutar mukoznih površina i čvrstih organa i učestvuju u odbrani od patogena kroz preuzimanje antigena, obradu i prezentovanje limfocitima na mestu samog inflamacijskog procesa ili u regionalnim limfnim čvorovima (Mohammad i sar., 2012). U kontekstu autoimunosti CNS, pokazano je da su konvencionalne DC koje se nalaze u leptomeningama (arhnoidea i pia) odgovorne za prezentaciju antigena CNS autoreaktivnim T-

limfocitima, kao i za njihov ulazak i otpočinjanje neuroinflamacije u modelu EAE (Mundt i sar., 2019). DĆ se smatraju jednim od ključnih faktora u indukciji i održavanju autoimunskih bolesti. Naime, studije ukazuju na veći broj DĆ u CSF pacijenata obolelih od MS, u poređenju sa zdravim kontrolama (Wu i Laufer, 2007). S obzirom na to da DĆ imaju važnu ulogu u održavanju balansa između T-ćelijske imunosti i T-ćelijske tolerance, tako promenjen broj ili aktivacioni status DĆ može narušiti ovaj balans (Nuyts i sar., 2013). Sve ovo nam ukazuje na važnu ulogu DĆ u imunopatogenezi MS, kao i na njihov potencijal da budu target za određene terapeutike ili potencijalni dijagnostički biomarkeri u MS.

Iako ćelije urođene imunosti, a posebno DĆ, imaju ključnu ulogu u započinjanju (auto)imunskog odgovora, MS i EAE se smatraju bolestima posredovanim CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima. Tokom procesa maturacije unutar timusa, nezrele T-ćelije na osnovu interakcije sa MHC II i MHC I, diferenciraju u CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelije, respektivno (Carpenter i Bosselut, 2010). Nakon stimulacije TCR, CD4⁺ T-ćelije mogu da se diferenciraju u pravcu Th2 i Treg fenotipa, ili u pravcu Th1 i Th17 fenotipa, u zavisnosti od citokinskog mikromiljea koji ih okružuje (Haase i Linker, 2021). APC proizvode brojne citokine neophodne za diferencijaciju naivnih T-ćelija ka nekoj od subpopulacija. Tako, nivo ekspresije receptora za interleukin IL-6 i nivo citokina IL-6 diktiraju da li će T-ćelijski odgovor biti proinflamacijski ili regulatorni. Pored toga, smer diferencijacije naivnih ćelija zavisi i od prisustva citokina IL-23 i IL-12. Naime, citokin IL-12 (subjedinica p35) usmerava diferencijaciju Th0 ćelija ka Th1 fenotipu, dok su citokini IL-6, IL-1 i IL-23 (subjedinica p19) značajni za diferencijaciju Th17 ćelija (Fletcher i sar., 2010). Pored toga, smatra se da različit citokinski milje određuje fenotip Th17 ćelija, tako prisustvo citokina IL-1β, IL-6 i IL-23 favorizuje patogeni fenotip Th17 ćelija (Sie i sar., 2014), dok s druge strane, prisustvo transformišućeg faktora rasta-beta (*engl.* transforming growth factor beta, TGF-β) i IL-6 usmeravaju nastanak Th17 ćelija koje proizvode antiinflamacijski citokin IL-10 i učestvuju u regulaciji autoimunskog odgovora (Wu i sar., 2018). Th1 i Th17 ćelije proizvode citokine kojima ostvaruju svoje efektorske funkcije i koji, u uslovima autoimunosti kakvi se sreću u MS i EAE, predstavljaju ključne medijatore u patogenezi bolesti. Glavne proinflamacijske CD4⁺ subpopulacije T-ćelija uključene u patogenezu MS i EAE su Th1 (CD4⁺ T-ćelije koje proizvode interferon (*engl.* Interferon, IFN)-γ i TNF-α), i Th17 (CD4⁺ T-ćelije koje proizvode IL-17, IL-21, i IL-22) (Kaskow i Baecher-Allan, 2018; Jadidi-Niaragh i Mirshafiey, 2011). Fenotip Th17 ćelija pokazuje izvesnu plastičnost (sposobnost da se menja u zavisnosti od citokinskog mikrokruženja), te neretko u inflamacijskim stanjima Th17 ćelije stiču sposobnost da proizvode IFN-γ, ili da simultano proizvode i IFN-γ i IL-17, i ove ćelije predstavljaju izrazito patogeni subpopulaciju Th17 ćelija (Cosmi i sar., 2014). Dominantna zastupljenost Th1 ćelija u ćelijskom sastavu lezija u CNS ukazuje na ključnu ulogu ovih ćelija u patogenezi EAE, dok Th17 ćelije učestvuju u interakciji sa epitelnim i endotelnim ćelijama u CNS gde dovode do narušavanja integriteta krvno-moždane barijere (Krishnarajah i Becher, 2022). Međutim, treba napomenuti da se ćelijski sastav lezija između MS i EAE razlikuje. Tako, u MS u lezijama dominiraju CD8⁺ T-ćelije u odnosu na CD4⁺ T-ćelije koje su po broju manje zastupljene ali više heterogene (Babbe i sar., 2000), dok u EAE dominiraju CD4⁺ T-ćelije (Lassmann i sar., 2007). Iako se smatra da su autoreaktivne proinflamacijske T-ćelije ključne za inicijaciju i propagaciju oštećenja tkiva CNS u MS, samo prisustvo T-ćelija reaktivnih na MOG, MBP ili PLP je nedovoljno da se objasni nastanak bolesti. Naime, encefalitogene autoreaktivne T-ćelijese mogu naći i kod zdravih ljudi (Goebels i sar., 2000), međutim, studije ukazuju da se aktivacioni status autoreaktivnih T-ćelija razlikuje između onih detektovanih u zdravim ljudima i pacijentima obolelim od MS. U prilog tome govore i podaci da T-ćelije reaktivne na MBP detektovane kod obolelih od MS ekspimiraju alfa lanac receptora za IL-2 (CD25), kao i da povećana ekspresija kostimulatornog molekula B7.1 (CD80) na APC korelira sa aktivnošću bolesti (Hughes i sar., 1998).

Za razliku od oštećujućih Th1 i Th17 ćelija, važnu ulogu u supresiji autoimunske neuroinflamacije imaju regulatorne CD4⁺CD25⁺ T-ćelije (Treg; čine približno 5-10% svih Th ćelija) (Beissert i sar., 2006). Treg se karakterišu ekspresijom CD25 i transkripcionog faktora Foxp3 (*engl.* Forkhead box

P3 protein). Treg imaju imunoregulacijsku funkciju i promovišu tolerancu usmerenu ka antigenima koje prepoznaju, obično autoantigenima (Krishnarajah i Becher, 2022), ali učestvuju i u održavanju homeostaze usled izloženosti mikrobioti i komponentama hrane na nivou creva (Tanoue i sar., 2016). U uslovima odsustva inflamacijskih signala, TGF- β kroz indukciju ekspresije Foxp3 učestvuje u održavanju Treg. Međutim, u inflamatornom okruženju koje karakteriše povećano oslobađanje IL-6 iz ćelija urođenog imunskog sistema, inhibicija produkcije TGF- β od strane Treg i dominacija Th17 ćelija (Oukka, 2007). Studije sprovedene u EAE modelu pokazuju da je smanjenje CD4⁺CD25⁺ Treg povezano i sa povećanom produkcijom IFN- γ i smanjenom produkcijom IL-10, kao i da primena anti-CD25 antitela dovodi do teškog oblika bolesti praćenog visokom stopom smrtnosti (Zhang i sar., 2004). Treg su uključene i u ograničavanje patogeneze MS, gde se njihova funkcija ogleda u regulaciji efektorskih Th1, Th2 i Th17 ćelija. U skladu s tim, pokazano je da je nepravilno funkcionisanje ili narušeno sazrevanje Treg udruženo sa pojavom MS (Zozulya i Wiendl, 2008).

Zbog bitne uloge makrofaga i mikroglije u inicijalnoj i efektorskoj fazi MS i EAE, važno je istaći fenotipske i funkcionalne karakteristike ovih ćelija u fiziološkim i inflamacijskim uslovima, kakva su MS i EAE. Makrofagi i mikroglija održavaju homeostazu u CNS putem održavanja nesmetanog prenosa signala između sinapsi, promovisanja neurogeneze, čišćenja ćelijskog debris, i prevencije ulaska medijatora i patogena sa periferije u CNS. Distribucija makrofaga i mikroglije unutar CNS se razlikuje, te su makrofagi prisutni u meningama i horoidnom pleksusu (McMenamin i sar., 2003), dok je mikroglija uglavnom homogeno raspoređena unutar moždanog parenhima (Mosser i sar., 2017). U inicijalnoj fazi EAE, makrofagi sa periferije infiltriraju CNS i zajedno sa rezidentnim ćelijama mikroglije dovode do imunske inflamacije u nervnom tkivu. U akutnoj fazi inflamacije, klasična aktivacija makrofaga/mikroglije putem TLR na površini ovih ćelija, posebno izazvana IFN- γ koji predstavlja najpotentniji aktivator makrofaga/mikroglije, dovodi do indukcije citotoksičnog M1 fenotipa mikroglije i makrofaga. Ovaj fenotip karakteriše povećana sinteza i oslobađanje proinflamacijskih citokina (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, i IL-23) i hemokina (CCL (*engl.* C-C motif chemokine ligand) 4, CCL5, CCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL2, i CXCL4). Pored toga, M1 makrofagi/mikroglija imaju povećan kapacitet prezentacije neuroantigena encefalitogenim T-ćelijama (Bogie i sar., 2014). Aktivacija makrofaga/mikroglije dovodi i do povećane ekspresije kostimulatornih molekula CD86, CD40 i MHC II na ovim ćelijama (Lynch, 2009). Među njima, CD40 molekul je značajan u kontekstu patogeneze EAE, što je pokazano prilikom transfera encefalitogenih T-ćelija u CD40 deficijentne miševе, gde je uočeno da kod takvih miševa dolazi do razvoja slabijih kliničkih simptoma (Becher i sar., 2001). Naime, interakcija CD40 i njegovog liganda CD154 je od velikog značaja za razvoj EAE jer učestvuje u infiltraciji leukocita u CNS (Becher i sar., 2001). U skladu sa tim, blokada CD40 odgovarajućim antitelima dovodi do smanjenja kliničkih simptoma EAE (Jiang i sar., 2014; Vaitaitis i sar., 2019). Pored citokina, aktivirana mikroglija i M1 makrofagi oslobađaju i niz drugih neurotoksičnih molekula (azot-monoksid (NO), reaktivne vrste kiseonika, glutamat, aktivirane komponente komplemента, TNF) koji se nalaze u lezijama i učestvuju u demijelinizaciji. *In vitro* studije su pokazale da M1 mikroglija remeti procese remijelinizacije kroz produkciju TNF, dok je pretretman M1 makrofaga sa IL-4 značajno smanjio produkciju tipičnih toksičnih M1 molekula, TNF i NO (Cao i He, 2013). Na modelu EAE kod Lewis pacova je pokazana uloga ROS oslobođenih iz mikroglije i makrofaga u patogenezi ove bolesti. Pored toga, smatra se da mikroglija i makrofagi predstavljaju najveće producere ROS i RNS i u MS (Lassmann i van Horsen, 2011), i da ovi molekuli imaju važnu ulogu u demijelinizaciji i oštećenju aksona (Grigoriadis i sar., 2015). S druge strane, makrofagi/mikroglija alternativno aktivirani citokinima IL-4, IL-13, IL-33 i drugim, poprimaju tzv. M2 fenotip koji preovladava u kasnijoj EAE. Ove ćelije karakteriše produkcija antiinflamacijskih citokina (IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 i TGF- β) i ekspresija molekula CD206 (Chu i sar., 2018).

Pored CD4⁺ T-ćelija, DC i makrofaga/mikroglije čija je uloga naročito važna u EAE i koje su bile u fokusu ove doktorske disertacije, važno je spomenuti i druge ćelije koje učestvuju u patogenezi MS. Naime, CD8⁺ T-ćelije dominiraju u lezijama u zavisnosti od stadijuma MS uz visoku ekspresiju MHC

molekula I klase u mozgu (Lassmann i sar., 2007) na astrocitima, oligodendrocitima i neuronima unutar lezija, što ukazuje na direktnu vezu sa aktivacijom CD8⁺ T-ćelija, koje pokazuju povećanu ekspresiju aktivacionih molekula unutar CNS i CSF MS pacijenata (Huseby i sar., 2012). CD8⁺ T-ćelije posredstvom citotoksičnih molekula (granzim, perforin), Fas - FasL interakcija i produkcijom proinflamacijskih citokina (TNF, IFN- γ) ostvaruju svoj patogeni efekat u MS (Saxena i sar., 2011). Za razliku od većine modela EAE u kojem glavne efektorske ćelije predstavljaju CD4⁺ T-ćelije, CD8⁺ T-ćelije u MS su daleko zastupljenije unutar lezija u poređenju sa CD4⁺ T-ćelijama (Hohlfeld i sar., 2016).

Oligoklonalne trake (detektovane intratekalno i u moždanom parenhimu) predstavljaju jedno od glavnih patoloških obeležja MS i time ukazuju na značajnu ulogu B-ćelija u njenoj patogenezi (Disanto i sar., 2012). B-ćelije proizvode autoantitela koja učestvuju u oštećenjima neurona i aksona posredstvom makrofaga. Nakon vezivanja autoantitela za neurone, aksone ili mijelin, makrofagi ih prepoznaju, aktiviraju se, fagocituju i vrše degradaciju tih struktura, kao i produkciju proinflamacijskih citokina (Wanleenuwat i sar. 2019), a sve ovo vodi nastanku lezija i demijelinizaciji (Franciotta i sar., 2008). B-ćelije imaju različite funkcije u kontekstu autoimunosti, kao što su produkcija autoantitela, modulacija obrade i prezentacije antigena, prezentacija autoantigena, produkcija proinflamacijskih citokina, i nastanak ektopičnih germinativnih centara, koji strukturno podsećaju na germinativne centre limfoidnih organa i imaju funkciju prezentacije antigena, aktivacije B-ćelija i produkcije antitela (Hampe, 2012).

1.4. NO u inflamaciji

NO nastaje aktivnošću enzima iz familije NO sintaza koje uz prisustvo O₂ prevode aminokiselinu L-arginin u L-citrulin i NO (Calabrese i sar., 2007). Histohemijski i imunohistohemijski podaci ukazuju na postojanje tri izoforme NO sintaze: endotelna, nervna i inducibilna sintaza (Paakkari i Lindsberg, 1995). U fiziološkim uslovima, NO ima značajnu ulogu u neurotransmisiji, neurosekreciji i neuroprotekciji, međutim, u neurodegenerativnim stanjima dolazi do povišene produkcije NO što vodi ka aktivaciji enzima ciklooksigenaza i neuroinflamaciji (Calabrese i sar., 2007). Naime, ciklooksigenaze su ključni enzimi u prevođenju arahidonske kiseline do prostaglandina i drugih lipidnih proizvoda koji učestvuju u inflamaciji, kao i u neuroinflamaciji, i to kroz aktivaciju mikroglije i dodatno oslobađanje inflamacijskih signala (Choi i sar., 2009). U neuroinflamaciji koja karakteriše MS ili EAE, dolazi do pojačane aktivnosti inducibilne sintaze azot-monoksida (*engl.* Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) i time povećane produkcije NO, koji se u ovakvim uslovima ponaša neurotoksično (Danilov i sar., 2003). U takvim stanjima stimulator produkcije NO je npr. citokin IL-17, koji u kooperaciji sa drugim citokinima može potencirati produkciju NO kroz povećanu ekspresiju iNOS na nivou astrocita (Trajkovic i sar., 2001). O relevantnosti izučavanja NO u ovom kontekstu ukazuju podaci da su proizvodi NO detektabilni u serumu i CSF osoba obolelih od MS, kao i u makrofagima i mikrogliji aktivnih lezija u MS i EAE, a njihov nivo korelira sa težinom bolesti kod životinja. NO i njegovi derivati dovode do oštećenja permeabiliteta krvno-moždane barijere, oštećenja oligodendrocita, mijelina i aksona, kako kod ljudi, tako i kod životinja kod kojih je indukovano EAE (Hendriks i sar., 2005; Guix i sar., 2005). Takođe, ROS produkovani od strane aktivirane mikroglije i makrofaga dovode do oksidativnih oštećenja i mitohondrijalne disfunkcije, što je praćeno demijelinizacijom, neuronskim i glijskim oštećenjima (Grigoriadis i sar., 2015). Dodatno, reakcijom između NO i ROS nastaje peroksinitrit, koji dalje učestvuje u oksidativnom oštećenju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i posledično njenoj fragmentaciji, a dovodi i do nitrozilacije tirozina čime onemogućava njegovu forforilaciju, bitnu za regulaciju ćelijskih i biohemijskih procesa (Torreilles i sar., 1999). Međutim, pored oštećujućeg, citotoksičnog efekta, NO, može imati i protektivno dejstvo (npr. reguliše imunski odgovor, neurotransmisiju i dr). Studije ispitivanja uticaja NO na diferencijaciju Th1 ćelija su pokazale da visok nivo NO može da suprimira nastajanje Th1 fenotipa, dok niska koncentracija NO promoviše nastanak Th1 ćelija (Ibiza i Serrador, 2008). Zatim, pokazano je da NO može da ograničava imunski odgovor na periferiji posredstvom IFN- γ podstičući

produkciju NO u makrofagima, koji suprimira proliferaciju autoreaktivnih T-limfocita (Willenborg i sar., 1999). Slično, NO dovodi i do inhibicije proliferacije i funkcije Th17 ćelija (Niedbala i sar., 2011). Osim toga, primena inhibitora iNOS u induktivnoj fazi EAE dovodi do pogoršanja bolesti, što potvrđuje ulogu NO u ograničavanju imunskog odgovora na periferiji (Gold i sar., 1997). U CNS NO utiče na signalni put mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) i to na nivou astrocita, pri čemu dovodi do snižavanja ekspresije CXCL12, hemokina zaslužnog za ograničavanje infiltracije imunskih/inflamatornih ćelija u CNS i, sledstveno, ograničenu neuroinflamaciju u EAE. Tako, tretman aminoguanidinom tokom progresivne faze bolesti dovodi do inhibicije produkcije NO i do povećanja ekspresije ekspresije CXCL12 (Petković i sar., 2013), a time i do smanjenja simptoma EAE, što sve potkrepljuje dalja istraživanja modulacije bolesti posredstvom modulacije nivoa NO.

1.5. Terapijski pristupi multiploj sklerozi

Kada je reč o MS, terapijski modaliteti podrazumevaju terapiju koja se koristi za ublažavanje simptoma (simptomatska terapija) i terapiju koja modifikuje tok bolesti (*engl.* disease modifying therapy, DMT). Trenutno, jedino kombinacijom ova dva pristupa pacijentima se može poboljšati i olakšati svakodnevni život. Jedna od prvih odobrenih DMT za MS je tretman interferonima (IFN- β -1b i IFN- β -1a) i glatiramer acetatom (Hart i Bainbridge, 2016; Hauser i Cree, 2020). Imunomodulacijski efekat IFN- β -1b (Betaferon) se ogleda u interferenciji sa aktivacijom T-ćelija, smanjenju produkcije proinflamacijskih citokina, smanjene prezentacije antigena od APC i inhibiciji infiltracije T-limfocita u CNS (Plosker, 2011). Glatiramer acetat je sintetski aminokiselinski kopolimer (Copaxone) koji čine glutaminska kiselina, lizin, alanin i tirozin, a indikovani su za lečenje relapsnih oblika MS (La i sar., 2010). Zbog svoje sličnosti sa MBP, glatiramer acetat deluje posredstvom nekoliko mehanizama i to: kompeticijom sa MBP za vezivanje za MHC molekule, kompeticijom prilikom vezivanja kompleksa MBP/MHC za TCR T-ćelija, delimičnom aktivacijom i smanjenjem reaktivacije T-ćelija na MBP, indukcijom nastanka Th2 ćelija koje imaju regulatornu funkciju i dr. (Neuhaus i sar., 2001). Zatim, dimetil-fumarat (Tecfidera) predstavlja oralni terapeutik za lečenje relapsne MS. Svoje dejstvo ostvaruje kroz indukciju transkripcionog faktora Nrf-2 (*engl.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) ključnog proteina uključenog u antioksidativni odgovor. Takođe, dimetil-fumarat inhibira diferencijaciju dendritskih ćelija, Th1 i Th17 ćelija, a dovodi i do značajnog smanjenja infiltracije makrofaga i mikroglije unutar lezija (Xu i sar., 2015). Natalizumab (Tysabri) je rekombinantno humanizovano monoklonsko antitelo, i predstavlja prvi α 4 integrin antagonist napravljen za tretman MS. Natalizumab deluje na upostavljanje veze između α 4 i VCAM-1 (*engl.* vascular cell adhesion molecule 1), koja inače omogućava čvrsto povezivanje limfocita i endotela, i time njihov ulazak u CNS (Brandstadter i Katz Sand, 2017). Fingolimod (FTY720) koji pripada klasi malih molekula oralni je terapeutik koji se vezuje visokim afinitetom za sfingozin 1-fosfat (S1P) receptor na limfocitima, čime dolazi do funkcionalnog antagonizma, internalizacije i degradacije ovog receptora. Tako limfociti postaju neosetljivi na gradijent S1P, što za posledicu ima onemogućavanje izlaska limfocita iz limfnih čvorova (Chun i Hartung, 2010). Dalje, zbog značajne uloge humoralne imunosti u patogenezi MS posebna pažnja u poslednjih nekoliko godina je posvećena terapiji usmerenoj ka depleciji B-ćelija (Greenfield i Hauser, 2018). Tako okrelizumab, kao jedina odobrena terapija u lečenju PP-MS, predstavlja humanizovano monoklonsko antitelo koje deluje posredstvom 4 različita mehanizma deplecije B-ćelija, a to su apoptoza, ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela, ćelijska fagocitoza zavisna od antitela i citotoksičnost zavisna od komplementa (Gelfand i sar., 2017).

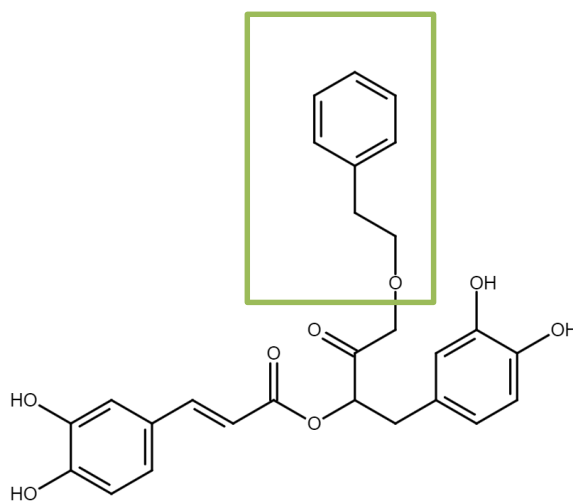
1.6. Fenetil estri ruzmarinske i galne kiseline

Biljke i biljni derivati se tradicionalno koriste u tretmanu različitih metaboličkih ili neuroloških poremećaja. Zbog svojih bioaktivnih svojstava, biljni derivati se često koriste kao osnova za razvoj novih terapeutika (tzv. fitofarmaceutici ili fitoterapeutici) (Mtewa i sar., 2021). S obzirom na to da biljni produkti pokazuju izvesna antiinflamacijska, imunomodulacijska, neuroprotektivna i neuroreparatorna svojstva, kao i da pomažu u očuvanju integriteta krvno-moždane barijere (Yu i sar., 2019), njihova upotreba u prevenciji i terapiji oštećenja u MS se sve više ispituje (Riccio, 2011). Među važnim jedinjenjima poreklom iz biljaka, a koja imaju antiinflamacijski potencijal su fenil propanoidi, terpeni i alkaloidi. U okviru fenil propanoida, najvažnije grupe su hidroksi cimetna kiselina i njeni derivati, zatim polifenoli i stilbenoidi (Bernstein i sar., 2018). Tako polifenoli imaju imunomodulacijski efekat u autoimunskim bolestima, i to inhibirajući autoimunske T-ćelijsku proliferaciju i smanjujući produkciju proinflamacijskih citokina (IL-6, IL-1 i IFN- γ) (Shakoor i sar., 2021). Hidroksi cimetna kiselina i njeni derivati sa jakim biološkim dejstvom su kiseline poput: kafeinske, hlorogene, sinapinske, ferulinske, galne (*engl.* Gallic acid, GA), p-hidroksi-cimetne, p-kumarinske i ruzmarinske kiseline (*engl.* Rosmarinic acid, RA), kao i eugenola (Bernstein i sar., 2018). Ova jedinjenja se nalaze u svakodnevnoj dijeti i neškodljiva su u umerenim koncentracijama, te tako ukoliko se uzme u obzir njihovo delovanje na mikrobiotu kao i uloga mikrobiote u MS, dijetarne intervencije posredstvom ovih jedinjenja su posebno interesantne danas (Riccio i Rossano, 2018). Literaturni podaci ukazuju da derivati RA i GA, poput estarskih derivata, ostvaruju bolji efekat od samih kiselina ili drugih derivata. Tako je npr. pokazano da estri kafeinske kiseline ostvaruju bolju zaštitu ćelija od same izvorne komponente (Kitsati i sar., 2012), kao i da fenetil ester kafeinske kiseline ostvaruje inhibitorni efekat na angiogenezu i invaziju tumora (Liao i sar., 2003). Te je tako, pored prethodno navednog, polazna osnova za sintezu estara RA i GA bila i dobro okarakterisana funkcija same RA i GA u kontekstu različitih inflamacijskih i oksidativnih stanja, što je pokazano u nizu studija.

RA je prvi put kao čista komponenta izolovana 1958. godine iz Ruzmarina (lat. *Rosmarinus officinalis*). Struktura RA je okarakterisana kao ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenil-mlečne kiseline. RA je prisutna u porodici Boraginaceae (Porečnice), Lamiaceae (Usnatice) (i to u podfamiliji Nepetoideae), Blechnaceae i drugim familijama biljaka (Petersen, 2013). Pokazano je da RA ostvaruje brojne biološke efekte, poput antivirusnih, antibakterijskih, antikancerskih, antioksidativnih, geroprotektivnih, antidijabetskih, kardioprotektivnih, hepatoprotektivnih, nefroprotektivnih, antidepresijskih, antialergijskih i antiinflamacijskih efekata (Nadeem i sar., 2019). Pokazano je da upotreba RA deluje povoljno u različitim inflamacijskim stanjima, kao što su artritis, kolitis, atopijski dermatitis, astma, alergijski rinitis, periodontalne bolesti, akutni pankreatitis, mastitis i dr. (Luo i sar., 2020). Pored toga, terapeutsko dejstvo RA pokazano je i u bolestima nervnog sistema, poput epilepsije, Alchajmerove bolesti, depresije, Hantingtonovoj bolesti, Parkinsonovoj bolesti, amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi, cerebralnoj ishemiji/reperfuzijskoj povredi CNS, povredi kičmene moždine, stresu, anksioznosti i bolu (Ghasemzadeh Rahbardar i Hosseinzadeh, 2020). U kontekstu neurodegenerativnih bolesti najvažnije biološke aktivnosti RA su antiinflamacijska i antioksidativna, koje ostvaruje kroz prevenciju oksidativnog oštećenja neurona i modulaciju proinflamacijskih citokina i drugih signalnih molekula (Fachel i sar., 2019). Dodatno, u *in vitro* i *in vivo* modelima Alchajmerove bolesti smanjuje formiranje fibrilarnog amiloida beta (*engl.* fibrillar amyloid-beta, fA β), smanjuje sinaptičku disfunkciju i aktivaciju mikroglije, kao i inflamacijske odgovore (ekspresiju COX-2 i koncentraciju PGE2) i produkciju peroksinitrita (ONOO-) (Ghasemzadeh Rahbardar i Hosseinzadeh, 2020). U *in vitro* i *in vivo* modelima Parkinsonove bolesti inhibira apoptozu neurona, modulira dejstvo pro-oksidantnog enzima hem-oksigenaze 1, helira slobodno gvožđe, smanjuje taloženje α -sinukleina u mozgu (Ghasemzadeh Rahbardar i Hosseinzadeh, 2020). Takođe, u pacovskom modelu neuropatskog bola pokazano je da RA ima antiinflamacijski i antioksidativni efekat smanjujući nivo/aktivnost NO, ciklooksigenaze 2 (*engl.* cyclooxygenase-2,

COX-2), IL-1 β , PGE-2 i MMP- (*engl.* matrix metalloproteinase) 2 (Ghasemzadeh Rahbardar i sar., 2017).

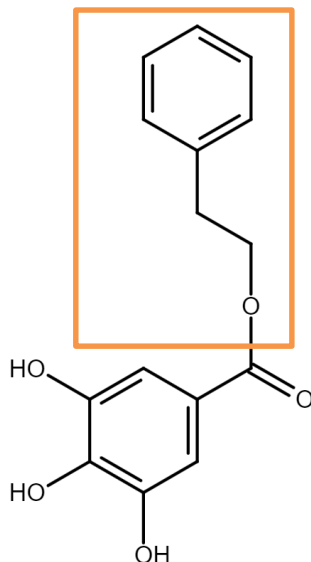
U skladu sa prethodnim navodima, u komparativnoj *in vitro* studiji efekta RA i njenih derivata na humanim Jurkat ćelijama, fenetil estra RA (*engl.* phenethyl ester of rosmarinic acid, PERA) (Slika 2) i fenetil amida RA, pokazano je da su ova jedinjenja potentnija od izvorne supstance. Naime, studija je pokazala da PERA ima veći genoprotektivni efekat od oštećenja izazvanih vodonik peroksidom (H₂O₂) (Gerogianni i sar., 2018). Zbog posedovanja negativno naelektrisane karboksilne grupe ograničen je ulazak RA u ćeliju, a taj problem je prevaziđen esterifikacijom karboksilne grupe. Time je poboljšana biodostupnost RA unutar ćelije gde protektivni efekat ostvaruje kroz smanjenje koncentracije slobodnog gvožđa čime se vrši prevencija oštećenja DNK indukovano H₂O₂ i apoptoze ćelija (Gerogianni i sar., 2018).



Slika 2. Hemijska struktura fenetil estra ruzmarinske kiseline (PERA). Polje uokvireno zelenom bojom predstavlja fenetil grupu fenetil estra ruzmarinske kiseline.

GA (3,4,5 trihidroksi-benzoeva kiselina) je prvi put identifikovana 1786. godine (Fernandes i Salgrado, 2016). GA je sekundarni metabolit prisutan u većini biljaka i javlja se u slobodan ili u formi tanina (Zhao i sar., 2011). Neke od biljaka iz kojih je izolovana GA su *Bergia suffruticosa*, *Ceratonia siliqua* (Rogač), *Tectona grandis*, *Casuariana equisetifolia* (Nayeem i SMB, 2016). Savremena istraživanja ukazuju da GA može imati antigljivične, antivirusne, antioksidativne i antikancerske efekte (Zhao i sar., 2011). Pokazano je da GA ostvaruje antiinflamacijski efekat u različitim vrstama oboljenja: animalnom modelu nazalne inflamacije kod miševa (Fan i sar., 2019), modelu inflamacije kod pacova izazvanog ubrizgavanjem karagenana (Wu i sar., 2022), modelu emfizema kod pacova (Sohrabi i sar., 2021), modelu ulceroznog kolitisa kod miševa (Zhu i sar., 2018). Takođe, pokazano je da GA može delovati pozitivno u različitim neurodegenerativnim stanjima. Tako je u modelu Alchajmerove bolesti pokazano poboljšanje memorijskih funkcija, zatim poboljšana aktivnost antioksidativnih enzima, super-oksida dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) (Bhuia i sar., 2023), kao i smanjena ekspresija nuklearnog faktora kB u mozgu, regulatornog proteina uključenog u započinjanje imunskog odgovora (NF-kB) (Kim i sar., 2011). Na modelu Parkinsonove bolesti je pokazan protektivni efekat GA na dopaminske neurone i to kroz delovanje na molekule uključene u važne ćelijske procese, uključujući odgovor na oksidativni stres, apoptozu i neuroprotekciju (Bhuia i sar., 2023). S obzirom da određeni stepen neuroinflamacije karakteriše gotovo sve neurološke poremećaje, svoju zaštitnu ulogu u ovim patologijama GA ostvaruje i smanjujući ekspresiju inflamacijskih medijatora poput TNF, IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 i NF-kB (Bhuia i sar., 2023). Antioksidativni potencijal GA ostvaruje vezujući slobodne radikale čime se

smanjuje lipidna peroksidacija i posledično oštećenje ćelijskih struktura (Badhani i sar., 2015). Uzimajući u obzir da kao i kod RA, i kod GA negativno naelektrisana karboksilna grupa ograničava njen prolazak kroz ćelijsku membranu i njenu biodostupnost unutar ćelije, urađena je esterifikacija GA prema studiji u kojoj su poređeni efekti RA i njenih derivata (Gerogianni i sar., 2018), te je za potrebe istraživanja opisanih u ovoj disertaciji, sintetisan fenetil ester GA (*engl.* phenethyl ester of gallic acid, PEGA) (Slika 3).



Slika 3. Hemijska struktura fenetil estera galne kiseline (PEGA). Polje uokvireno narandžastom bojom predstavlja fenetil grupu fenetil estera galne kiseline.

Shodno prethodno navedenom, predmet ove doktorske disertacije bio je da se ispituju efekti *in vitro* tretmana PERA i PEGA na imunske ćelije poplitealnih limfnih čvorova (PLČ) (limfni čvorovi koji dreniraju mesto imunizacije HKM) i CD4⁺ ćelije prečišćene iz PLČ DA pacova imunizovanih HKM ili emulzijom peptida MOG₃₅₋₅₅ u CFA, kao i na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine (*engl.* spinal cord immune cells, SCIC) DA pacova na vrhuncu bolesti, a imunizovanih HKM. Pored toga, ispitivani su *in vitro* efekti PERA i PEGA na ćelijsku liniju mikroglije C57/BL6 miševa, BV2. Na kraju, rađeno je *in vivo* ispitivanje efekata ovih estara na tok bolesti EAE kod DA pacova imunizovanih HKM, kao i histološka analiza preseka kičmenih moždina tretiranih pacova.

2. Ciljevi

Na osnovu dosadašnjih podataka o antiinflamacijskom, antioksidativnom, neuroprotektivnom dejstvu RA i GA, kao i podataka o povećanoj biodostupnosti PERA i PEGA, postavljen je osnovni cilj ovog istraživanja - da se ispita uticaj PERA i PEGA na tok bolesti, težinu neurološkog deficita i karakteristike imunskih ćelija uključenih u patogenezu EAE.

Kako bi se realizovao ovaj osnovni cilj, postavljena su tri specifična cilja:

I Da se ispita *in vitro* efekat tretmana PERA/PEGA na ćelijama izolovanim iz PLČ u induktivnoj fazi bolesti, BV2 ćelijama mikroglije i ćelijama izolovanim iz kičmene moždine na vrhuncu bolesti, i to:

(i) Na imunskim ćelijama PLČ izolovanim u induktivnoj fazi bolesti iz DA pacova imunizovanih HKM ili MOG₃₅₋₅₅ u CFA, određivanjem:

- Vijabilnosti
- Produkcije inflamacijskih citokina koji su ključni za patogenezu EAE (IFN- γ i IL-17)
- Relativne promene ekspresije gena relevantnih za (auto)imunski odgovor (*Tgf β* , *P40*, *P19*, *P35* i *Il-6*)
- Produkcije citokina IFN- γ i IL-17 od strane CD4⁺ ćelijske frakcije dobijene prečišćavanjem ukupnih imunskih ćelija PLČ
- Zastupljenost apoptotičnih i proliferišućih CD4⁺ ćelija
- Aktivacionog statusa CD4⁺ ćelija
- Zastupljenosti Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija
- Produkcije NO

(ii) Aktivirane BV2 mikroglijske ćelije, i to određivanjem njihove:

- Vijabilnosti
- Produkcije NO
- Produkcije proinflamacijskih citokina (TNF i IL-6) i ROS
- Adhezivnih svojstava
- Sposobnosti za fagocitozu
- Fenotipskih karakteristika

(iii) Na imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA pacova na vrhuncu EAE indukovanog HKM, određivanjem:

- Njihove vijabilnosti
- Produkcije encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17
- Apoptotičnih CD4⁺ ćelija
- Aktivacionog statusa CD4⁺ ćelija
- Zastupljenosti Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija
- Produkcije NO

II Da se ispita *in vivo* efekat tretmana PERA/PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita kod DA pacova obolelih od EAE indukovanog imunizacijom HKM

III Da se histološkim metodama ispita efekat *in vivo* tretmana PERA/PEGA na infiltraciju imunskih ćelija u kičmenu moždinu i demijelinizaciju kod DA pacova obolelih od EAE indukovanog imunizacijom HKM

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi i rastvori

U izvođenju eksperimenata za potrebe ove doktorske disertacije su korišćeni sledeći reagensi i rastvori:

- PBS (*engl.* Phosphate Buffer Saline), dobijen rastvaranjem u dejonizovanoj vodi: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,76mM KH₂PO₄ (svi iz Lachner, Neratovice, Češka), pH 7,4;
- Serum fetusa govečeta (*engl.* Fetal Calf Serum, FCS, , Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), u kome su komponente komplementa inaktivirane inkubacijom na 56°C u vodenom kupatilu tokom 30 min;
- Osnovni ćelijski medijum koji predstavlja RPMI (*engl.* Roswell Park Memorial Institute)-1640 sa 25 mM-HEPES i 2 mM-L glutaminom (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Izrael), uz dodatak 5% FCS, 1% Pen/Strep koktela antibiotika (Biological Industries);
- Medijum za imunske ćelije PLČ koji sadrži: RPMI-1640 (sa 25 mM HEPES i 2 mM-L glutaminom), 1% Pen/Strep koktela antibiotika, uz dodatak 2% pacovskog seruma (*engl.* Rat Serum, RS);
- Medijum za SCIC koji sadrži RPMI-1640 (sa 25 mMHEPES i 2 mM-L glutaminom), 1% Pen/Strep koktela antibiotika, uz dodatak 5% FCS;
- Medijum za BV2 ćelije koji sadrži RPMI-1640 (sa 25 mM HEPES i 2 mM-L glutaminom), 1% Pen/Strep koktela antibiotika, uz dodatak 10 % FCS
- Goveđi albumin iz seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA, frakcija V, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD);
- Kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's Adjuvant, CFA; Difco, Detroit, MI, USA); *M.tuberculosis* H37Ra (Difco);
- MBP (dobijen ljubaznošću prof. Aleksandra Flugela, Univerzitet u Getingenu, Nemačka);
- MOG₃₅₋₅₅ (SB-Peptide, Saint Egrève, France);
- Dimetil-sulfoksid (*engl.* Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX);
- Susamovo ulje (Linum, Čonoplja, Srbija);
- Lipopolisaharid (LPS, Sigma Aldrich);
- Rekombinantni IFN- γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ);
- Pufer za magnetne kuglice koji predstavlja 0,5% rastvor BSA i 2 mM rastvor etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA, Sigma-Aldrich) u PBS; Magnetne kuglice obeležene streptavidinom (ImagSAv kuglice, BD Biosciences, San Dijego, SAD);
- Pufer za imunofluorescentno bojenje ćelijskih markera - Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience, Waltham, Masačusets, SAD), puferi za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija - Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience), pufer za permeabilizaciju 10x (Permeabilization Buffer 10x, eBioscience), koktel za stimulaciju ćelija koji sadrži i inhibitore unutarćelijskog transporta proteina i sastoji se od: forbol-miristat-acetata (PMA, *engl.* Phorbol Miristate Acetate), jonomicina, brefeldina A i monensina (eBioscienceTM Cell Stimulation Cocktail);
- Pufer za vezivanje aneksinaV (5 x ABB, 5 x Annexin V Binding Buffer, Biotium, Hayward, SAD), Aneksin V-FITC (BD Pharmingen, San Dijego, Kalifornija, SAD);
- Rastvor Kristal violeta (*engl.* Crystal Violet - CV), (3-4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT, Sigma Aldrich);
- Rastvor fluorescentno obeleženih kuglica za fagocitozu (Sigma Aldrich);
- Dihidrorodamin 123 (DHR, Sigma-Aldrich);

- Perkol (Sigma-Aldrich); Tripan plavo (BDSL, Velika Britanija);
- PFA (paraformladehid, Zorka, Šabac, Srbija), parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska), Majerov hematoksin (BioOptica, Milano, Italija), eozin (Molar, Budapest, Mađarska), Sudan-crno B (*engl.* Sudan black B, SBB, Carl ROTH, Karlsruhe, Nemačka), Fluoromount-G™ (eBioscience), DPX;
- Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), Supstrat za peroksidazu 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB; eBioscience);
- Hlorovodonična kiselina (HCl), sirćetna kiselina (CH₃COOH), svi dobavljeni od Zorka, Šabac, Srbija);
- Reagens za izolovanje RNK (TRI Reagent; Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD), hloroform (Merck, Darmstadt, Nemačka), izopropanol (Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, UK), etanol, nasumični heksamerni prajmeri, komercijalni pufer za reverznu transkripciju, dezoksiribonukleotid-trifosfati, reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije, inhibitor RNaze (svi od Fermentas, Vilnius, Litvanija), komercijalna smeša za RT-PCR (SYBR Green PCR Master Mix), voda bez nukleaza (*engl.* RNase Free Water; Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija), prajmeri za gene od interesa koji su navedeni u tabeli 1 (Metabion, Martinsried, Germany).

3.2. Eksperimentalne životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su ženke i mužjaci pacova genetički visokosrodnog soja DA, starosti od 6 - 8 meseci. Životinje su uzgajane u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, (Br. 323-07-12374/2021-05).

3.3. EAE

3.3.1. Imunizacija pacova

Za indukciju EAE korišćen je HKM homogenizovan u PBS (50% w/v). Imunizacija pacova vršena je HKM ili MOG₃₅₋₅₅ (0.25 mg/ml) u CFA. Imunizacija je izvršena intradermalnim injiciranjem 200 µl HKM ili 100 µl emulzije peptida MOG₃₅₋₅₅ u CFA u plantarni deo zadnje desne šape, ili u obe šape za eksperimente u kojima su izolovane ćelije iz PLČ.

3.3.2. Evaluacija kliničke slike

Praćenje neuroloških znakova EAE je vršeno svakodnevno od 6. dana nakon imunizacije (d.n.i) i trajalo je do 40. d.n.i. Težina bolesti ocenjivana je prema skali: 0 - bez neuroloških znakova; 1 - atonija repa; 2 - pareza zadnjih ekstremiteta; 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta; 4 - paraliza prednjih i zadnjih ekstremiteta, moribundno stanje ili smrt životinje. U prirodnom toku EAE se razlikuje nekoliko faza bolesti: početak bolesti sa kliničkom ocenom 1 (8. - 10. d.n.i); vrhunac bolesti sa kliničkom ocenom 2 - 4 (11. - 14. d.n.i); oporavak sa kliničkom ocenom 1 ili manje (18. - 20. d.n.i). Pojedine životinje mogu imati teži neurološki deficit i nakon 28. d.n.i. U slučaju kada se neurološki simptom ne može jasno pripisati određenom stepenu bolesti, korišćene su i intermedijarne vrednosti (0,5; 1,5; 2,5; 3,5).

3.3.3. *In vitro* primena PERA i PEGA

PERA i PEGA su sintetisani na Ioannina Univerzitetu u Grčkoj, i dobijeni su ljubaznošću prof. Andreas G. Tzacos. Proces sinteze PERA je opisan u studiji ispitivanja efekta PERA na EAE (Stegnjaić i sar., 2022), dok je proces sinteze PEGA opisan u studiji ispitivanja efekta PEGA na EAE (Stegnjaić i sar., 2022). Za potrebe *in vitro* eksperimenata PERA/PEGA su rastvoreni u koncentraciji od 50 mM u dimetil-sulfoksidu (*engl.* Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Iz rastvora date koncentracije su pravljena međurazblaženja u medijumu za gajenje ćelija do finalne koncentracije primene PERA/PEGA od 5 i 10 µM. U eksperimentima su korišćeni samo sveže napravljene rastvori PERA/PEGA. Koncentracije PERA i PEGA za *in vitro* primenu su odabrane na osnovu pilot studije ispitivanja ovih estara u velikom rasponu koncentracija na vijabilitet ćelija peritonealnog eksudata, uz adekvatan kontrolni tretman rastvorom DMSO.

3.4. Izolovanje i kultivacija ćelija

3.4.1. Izolovanje, kultivacija i tretmani PERA/PEGA ćelija PLČ DA pacova

Za potrebe ispitivanja efekta *in vitro* tretmana PERA/PEGA na ćelije PLČ pacovi su imunizovani HKM ili MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) u CFA (5 mg/ml) (nadalje će biti posebno naznačeno čime su životinje imunizovane). Životinje su žrtvovane 6. d.n.i. u komori sa visokom koncentracijom CO₂ (u induktivnoj fazi bolesti) i ćelije su izolovane iz PLČ mehaničkom homogenizacijom tkiva. Homogenizacija je vršena protiskivanjem ćelija kroz najlonsku mrežicu promera 70 µm. Nakon centrifugiranja ćelijske suspenzije (500 g, 5 min), ćelije su resuspendovane u 2% RS RPMI (medijum za kultivaciju pacovskih ćelija PLČ) i prebrojane.

Za potrebe ispitivanja efekta tretmana PERA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ, životinje su imunizovane HKM, dok su za potrebe određivanja efekta tretmana PEGA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ, životinje imunizovane sa MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) u CFA (5 mg/ml). Ćelije su gajene na temperaturi od 37°C, u vlažnoj sredini sa koncentracijom CO₂ od 5% (u daljem tekstu označeno kao inkubacija). Ćelije su gajene u ploči sa 24 bunara u koncentraciji 5 x 10⁶ ćelija/ml u svakom bunaru. Za ispitivanje efekta PERA (5 i 10 μM) ćelije su restimulisane MBP (10 μg/ml). Za ispitivanje efekta PEGA (5 i 10 μM) ćelije su restimulisane MOG₃₅₋₅₅ (15 μg/ml). Nakon inkubacije od 24 h sakupljeni su supernatanti, i dalje su korišćeni za određivanje koncentracije citokina metodom ELISA (*engl.* Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), a ćelije su korišćene za procenu vijabilnosti usled delovanja tretmana PERA/PEGA (5 i 10 μM).

Za potrebe ispitivanja efekta tretmana PERA na produkciju citokina na nivou CD4⁺ ćelija životinje su imunizovane sa HKM, dok su za potrebe određivanja efekta tretmana PEGA na produkciju citokina na nivou CD4⁺ ćelija životinje imunizovane MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) u CFA (5 mg/ml). Za dobijanje CD4⁺ ćelija korišćene su ćelije izolovane iz PLČ. CD4⁺ ćelije su prečišćene iz ukupne populacije ćelija PLČ metodom magnetne separacije i inkubirane 24 h u prisustvu PERA/PEGA (5 i 10 μM). Ćelije su gajene u koncentraciji od 5 x 10⁶ ćelija/ml u ploči sa 24 bunara. U prisustvu PERA ćelije su stimulisane anti-CD3 (1 μg/ml) i anti-CD28 antitelima (1 μg/ml), dok su ćelije u prisustvu PEGA stimulisane PMA (100 ng/ml) i jonomicinom (400 ng/ml). Koncentracija citokina je određivana u supernatantima CD4⁺ ćelija metodom ELISA.

Za potrebe ispitivanja efekta tretmana PERA/PEGA na nivo ekspresije gena u ćelijama PLČ životinje su imunizovane HKM. Ćelije PLČ su gajene u koncentraciji od 5 x 10⁶ ćelija/ml u ploči sa 24 bunara. Ćelije su tretirane sa PERA/PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h i stimulisane sa MBP (10 μg/ml). Nakon toga, ćelije su sakupljene i stavljene u reagens za izolovanje RNK (TRI Reagent; Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD)

Za potrebe ispitivanja efekta PERA/PEGA na procenat apoptotičnih, proliferišućih i aktiviranih CD4⁺ ćelija, kao i procentualnu zastupljenost Treg, Th1 i Th17 ćelija, životinje su imunizovane HKM. Ćelije su gajene u koncentraciji od 1 x 10⁶ ćelija u 200 μl medijuma u ploči sa 96 bunara. Za potrebe ispitivanja efekta PERA/PEGA (5 i 10 μM) na procenat apoptotičnih, proliferišućih i aktiviranih CD4⁺ ćelija, kao i procentualnu zastupljenost Treg, ćelije su gajene 24 h u prisustvu PERA/PEGA i stimulisane MBP (10 μg/ml). Za potrebe ispitivanja efekta PERA/PEGA (5 i 10 μM) na procenat Th1 i Th17 ćelija, ćelije PLČ su gajene 24 h u prisustvu PERA/PEGA bez stimulacije. Nakon toga, ćelije su stimulisane komercijalnim koktelom za stimulaciju ćelija (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail) 4 h pre bojenja.

Za potrebe ispitivanja efekta tretmana PERA na produkciju NO, životinje su imunizovane HKM, dok su za potrebe određivanja efekta tretmana PEGA na produkciju NO imunizovane MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) u CFA (5 mg/ml). Ćelije su gajene u koncentraciji od 25 x 10⁴ ćelija u 200 μl RPMI 1640 bez crvenog fenola (*engl.* Roswell Park Memorial Institute no phenol red), u optičkoj ploči (Nunc, Roskilde, Danska) sa 96 bunara. Ćelije su stimulisane (za tretman PERA MBP (10 μg/ml), za tretman PEGA MOG₃₅₋₅₅ (15 μg/ml), u prisustvu PERA/PEGA (5 i 10 μM) i DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescin diacetat) (2 μM). Nakon 20 h je očitana intenzitet fluorescence na SynergyH1 (BioTek, Winooski, VT) čitaču mikroploča.

3.4.2. Kultivacija i tretman BV2 ćelija mikroglije sa PERA/PEGA

BV2 ćelije predstavljaju mišju ćelijsku liniju mikroglije imortalizovanu infekcijom v-raf/v-myc rekombinantnim retrovirusom. Ove ćelije predstavljaju validan model za *in vitro* studije mikroglije, zato što imaju funkcionalne i fenotipske karakteristike primarne mikroglije. To podrazumeva njihovu sposobnost da odgovore na različite inflamacijske stimuluse, poseduju sposobnost fagocitoze i eksprimiraju većinu markera mikroglije (Henn i sar., 2009). BV2 ćelije su dobijene ljubaznošću dr. Alba Minelli, Univerzitet u Perudi, Italija. Ćelije su gajene i propagirane u medijumu za BV2 ćelije.

Za potrebe određivanja vijabilnosti i merenje produkcije NO, BV2 ćelije su sađene u gustini od 15×10^4 ćelija u 200 μ l RPMI 1640 bez crvenog fenola suplementiranim sa 10% FCS, u optičkoj ploči sa 96 bunara i ostavljene 90 min da adheriraju za površinu ploče pre tretmana PERA/PEGA. Zatim, u ćelije su dodati PERA/PEGA (5 i 10 μ M), uz istovremeno dodavanje DAF-FM DA (2 μ M) i stimulaciju LPS (10 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml). Intenzitet fluorescence je očitao na SynergyH1 čitaču mikroploča nakon 20 h.

BV2 ćelije su za potrebe određivanja produkcije citokina i ROS, procenta ćelija koje vrše fagocitozu, fenotipskih karakteristika, procenta APC, sađene u gustini od 5×10^5 ćelija/ml u ploče sa 24 bunara. Pre primene PERA/PEGA ćelije su inkubirane 90 min. Nakon toga, za određivanje produkcije citokina, procenta ćelija koje vrše fagocitozu, fenotipskih karakteristika i procenta APC, ćelije su tretirane sa PERA/PEGA (5 i 10 μ M), i simultano stimulisane sa LPS (10 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) 24 h. Za merenje produkcije citokina metodom ELISA uzet je supernatant BV2 ćelija, a ćelije su korišćene za određivanje procenta ćelija koje vrše fagocitozu i fenotipskih karakteristika BV2 ćelija. Za određivanje produkcije ROS ćelije su nakon inkubacije u trajanju od 90 min, tretirane PERA/PEGA (5 i 10 μ M) bez dodatne stimulacije preko noći (detaljno opisano u odeljku - **Određivanje produkcije ROS**).

3.4.3. Izolacija, kultivacija i tretman PERA/PEGA SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu bolesti

SCIC su izolovane iz kičmenih moždina pacova imunizovanih HKM. Životinje su žrtvovane na vrhuncu bolesti (11. - 14. d.n.i) i perfundovane hladnim fiziološkim rastvorom, kako bi se uklonile ćelije prisutne u krvnim sudovima kičmene moždine. Nakon perfuzije, iz životinja su izolovane kičmene moždine i homogenizovane u rastvoru PBS suplementiranim sa 3% FCS, protiskivanjem kroz metalne mrežice, a zatim kroz najlonske mrežice promera 70 μ m. Dobijena suspenzija je centrifugirana (900 g, 5 min), supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 3 ml 30% Perkola i pažljivo naliven na 2,5 ml 70% Perkola. Za pravljenje izotoničnih koncentracija Perkola je korišćen početni koncentrovani rastvor Perkola (100%), koji je dobijen mešanjem Perkola i 10x koncentrovanog PBS (odnos zapremina je 10:1). Nakon centrifugiranja u trajanju od 50 min na 850 g, bez ubrzanja i kočnice, uočavaju se imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine u vidu belog prstena na površini dodira dva perkola različitih gustina. Ćelije iz prstena su pažljivo sakupljene, a zatim oprane od ostatka perkola u PBS. Nakon centrifugiranja na 900 g, 10 min, ćelije su resuspendovane u medijumu RPMI suplementiranim sa 5% FCS i prebrojane.

Za potrebe određivanja efekta PERA/PEGA na vijabilnost i produkciju citokina, ćelije su gajene u ploči sa 96 bunara, u koncentraciji $2,5 \times 10^6$ ćelija/ml u prisustvu PERA/PEGA (5 i 10 μ M) 24 h, bez dodatne stimulacije. Nakon inkubacije, sakupljeni su supernatanti, koji su iskorišćeni za određivanje koncentracije citokina metodom ELISA.

Za potrebe određivanja efekta PERA/PEGA na procenat apoptotičnih i aktivisanih CD4⁺ ćelija, procentualnu zastupljenost Treg, Th1 i Th17 ćelija, SCIC su gajene u koncentraciji 5×10^5 (za određivanje procenta apoptotičnih i aktivisanih CD4⁺ ćelija) ili 1×10^6 ćelija (za određivanje

procenta Treg, Th1 i Th17). Čelije su gajene u 200 μ l medijuma za gajenje ćelija u ploči sa 96 bunara, u prisustvu PERA/PEGA (10 μ M) 24 h, bez dodatne stimulacije. Nakon toga, za određivanje Th1 i Th17, ćelije su stimulisane komercijalnim koktelom za stimulaciju 4 h pre bojenja.

Za potrebe određivanja efekta PERA/PEGA na produkciju NO, SCIC su gajene u koncentraciji od 2×10^5 ćelija u 200 μ l medijuma bez crvenog fenola suplementiranog sa 5% FCS u ploči sa 96 bunara. Čelije su gajene u prisustvu PERA/PEGA (5 i 10 μ M) i DAF-FM DA jedinjenja (2 μ M) narednih 20 h, bez dodatne stimulacije.

3.5. Određivanje broja ćelija metodom Tripan plavo

Broj ćelija je određivan brojanjem živih ćelija na hemocitometru, korišćenjem vitalne boje Tripan plavo. Izolovane ćelije su resuspendovane u rastvoru PBS sa 0,1% tripan plave boje u odnosu 1:10, nanasene na komoru po Burker-Turk-u i brojane pod mikroskopom. Žive ćelije su od mrtvih razlikovane na osnovu toga što boja tripan plava boja prolazi kroz ćelijsku membranu narušenog integriteta, na taj način bojeći mrtve ćelije plavom bojom, dok žive ćelije ostaju nebojene. Broj živih ćelija je određivan po sledećoj formuli: broj ćelija/broj polja \times 2,5, koja daje broj ćelija po ml suspenzije.

3.6. Prečišćavanje CD4⁺ ćelija magnetnom separacijom

Za potrebe određivanja efekta PERA/PEGA na produkciju citokina na nivou CD4⁺ ćelija iz populacije imunskih ćelija izolovanih iz PLČ, CD4⁺ ćelije su dobijene metodom magnetne separacije. Izolovane imunске ćelije PLČ su nakon brojanja prebačene u plastične tube od 2 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka), oprane u PBS i resuspendovane u hladnom puferu za obeležavanje ćelija antitelima (3% FCS PBS). Ukoliko je dobijen dovoljan broj ćelija, 70×10^6 ćelija je resuspendovano u 800 μ l pufera za obeležavanje ćelija antitelima i dodato je 10 μ l anti-CD4 antitela obeleženog biotinom (eBioscience, San Dijego, SAD). Ukoliko je dobijeno manje od 70×10^6 ćelija, zapremina pufera i antitela je proporcionalno prilagođena broju ćelija. Čelije su inkubirane 15 min na ledu uz povremeno mešanje rastvora i ćelija. Nakon toga, ćelije su jednom oprane sa 1 ml hladnog PBS i jednom sa 1 ml hladnog pufera za magnetne kuglice (0,5% BSA, 2 mM EDTA, PBS). Čelije su potom finalno resuspendovane u 800 μ l pufera za magnetne kuglice i dodato im je 40 μ l magnetnih kuglica obeleženih streptavidinom (ukoliko je početni broj ćelija bio manji od 70×10^6 , zapremina pufera i magnetnih kuglica je proporcionalno prilagođena). Čelije su inkubirane sa magnetnim kuglicama 30 min, na ledu, uz povremeno mešanje. Potom je ćelijska suspenzija izlagana magnetnom polju u trajanju od 8 min. Nakon isteka ovog vremena, magnetne kuglice se, usled delovanja magnetnog polja, prilepljuju za zidove plastične tube, povlačeći sa sobom i CD4⁺ ćelije obeležene antitelom, koje su vezane za kuglice interakcijom streptavidin-biotin. Rastvor iz plastične tube se pažljivo odstrani dok je tuba još u magnetnom polju, a magnetne kuglice koje se nalaze prilepljene uz zidove tube se ponovo resuspenduju u 800 μ l pufera za magnetne kuglice. Inkubacija u magnetnom polju je ponavljana još dva puta u trajanju od 6 min, kako bi se dobio veći stepen čistoće CD4⁺ ćelija. Čelije su zatim oprane jednom u 5% FCS RPMI, finalno resuspendovane u istom medijumu i prebrojane. CD4⁺ ćelije su potom inkubirane u prisustvu odgovarajuće stimulacije (prethodno navedena) i PERA/PEGA (5 i 10 μ M) 24 h, a dobijeni supernatanti su korišćeni za merenje produkcije citokina.

3.7. Određivanje vijabilnosti ćelija testom Kristal violet

Vijabilnost adherentnih BV2 ćelija je određivana testom Kristal violet (*engl.* Cristal Violet, CV). Ovaj test se koristi za procenu vijabiliteta ćelija zbog sposobnosti boje da se veže za DNK i proteine u živim ćelijama. Test je rađen u ploči sa 96 bunara u kojoj su gajene ćelije, 20 h nakon tretmana PERA/PEGA (5 i 10 μ M) uz simultanu stimulaciju. Nakon očitavanja intenziteta fluorescencije koja potiče od DAF-FM DA bojenja, bunari su jednom oprani 200 μ l PBS, u cilju uklanjanja mrtvih,

neadheriranih ćelija. Fiksiranje ćelija za dno bunara je obavljeno dodavanjem po 100 μ l 100% metanola. Nakon 10 min, metanol je odliven, a ploča ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi (10 min). Zatim je u bunare dodavano po 100 μ l 0,1% rastvora CV i inkubirano 10 min, na sobnoj temperaturi. Ploča je potom dobro isprana od viška boje u hladnoj vodi i ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Dodavanjem 50 μ L 33% rastvora sirćetne kiseline u svaki bunar dolazi do rastvaranja boje. Apsorbanca je očitana na SynergyH1 čitaču mikroploča, na talasnoj dužini od 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Izmerene apsorbance su odgovarale intenzitetu boje, a intenzitet boje je odgovarao relativnom broju živih ćelija koje su adherirane za podlogu. Na osnovu očitanih apsorbanci se može zaključiti o relativnom broju vijabilnih ćelija.

3.8. Određivanje vijabilnosti ćelija testom MTT

Određivanje vijabilnosti ćelija kolorimetrijskim testom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) se zasniva na proceni metaboličkog vijabiliteta kroz obrazovanje jedinjenja formazana, tj. nerastvornih ljubičastih kristala, nastalih redukcijom tetrazolijumove soli MTT delovanjem mitohondrijskih oksidoreduktaza. Za potrebe određivanja metaboličke vijabilnosti testom MTT, ćelije su kultivisane u pločama sa 96 bunara ili 24 bunara i inkubirane u prisustvu odgovarajuće stimulacije/bez stimulacije i u prisustvu PERA/PEGA (5 i 10 μ M) 24 h. Nakon toga, supernatanti su sakupljeni i sačuvani za određivanje koncentracije citokina (ćelije PLČ, SCIC).

Ukoliko su ćelije gajene u ploči od 96 bunara (za SCIC), dodavano je 100 μ l 0,5 mg/ml rastvora MTT (MTT rastvoren u medijumu za kultivisanje ćelija) u svaki od bunara sa ćelijama. Ploče su inkubirane 30 min - 1h na 37°C, odnosno do formiranja ljubičaste boje. Nakon ponovnog taloženja ćelija centrifugiranjem (850 g, 5min) rastvor MTT je odliven, a kristali formazana su rastvoreni dodavanjem 50 μ l DMSO. Intenzitet boje rastvorenih kristala odgovara vijabilnosti ćelija. Apsorbanca je očitana na SynergyH1 čitaču mikroploča, na talasnoj dužini od 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao A540.

Ćelije PLČ su za potrebe testa MTT sakupljene u plastične tube od 1,5 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) i centrifugirane (500 g, 3 min). Supernatant je potom odliven, a ćelije resuspendovane u 300 μ l 0,5 mg/ml rastvora MTT (MTT rastvoren u medijumu za kultivisanje ćelija). Nakon inkubacije u trajanju od 30 min - 1h na 37°C, i formiranja kristala formazana, ćelijska suspenzija je ponovo centrifugirana (500 g, 3 min). Nakon toga, odliven je supernatant, a obojeni ćelijski talog resuspendovan u 200 μ l DMSO i razliven u triplikatima (po 50 μ l) u ploču sa 96 bunara. Apsorbanca je očitana na SynergyH1 čitaču mikroploča, na talasnoj dužini od 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao A540.

3.9. Merenje produkcije citokina metodom ELISA

ELISA ili enzimski imunosorbentni test je metoda koja se koristi za detekciju molekula, obično proteina (citokini, antitela, antigeni) u različitim vrstama uzoraka (supernatanti ćelijskih kultura i homogenata tkiva, krvni serum i dr). Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura je određivana metodom ELISA. ELISA je rađena u mikrotitar MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska) pločama sa 96 bunara, a za određivanje koncentracije citokina su korišćeni komercijalni parovi sledećih antitela: mišjeg IL-6 (dobavljen od Abcam, Kembridž, Masačusets, SAD), mišjeg TNF (eBioscience), pacovskog IFN- γ (eBioscience), mišjeg/pacovskog IL-17 (eBioscience). ELISA je obavljena u skladu sa protokolima datim od strane proizvođača. Prvi korak je podrazumevao oblaganje bunarića ploča primarnim antitelom rastvorenim u PBS, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača. Nakon prekonoćne inkubacije u primarnom antitelu, bunarići ploča su tri puta ispirani sa 0,05% rastvorom Tween 20 u PBS (tPBS). Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela za ploču postignuto je inkubacijom bunarića u sledećim rastvorima: PBS 1% BSA, 5% saharoza (pacovski IFN- γ), PBS 10% FCS (mišji/pacovski IL-17, mišji TNF) ili PBS 1% BSA (mišji IL-6).

Inkubacija u rastvorima za blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela trajala je 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja ploča 3 x tPBS, u bunariće su u duplikatima nalivani supernatanti ćelijskih kultura i standardi (50 µl po bunariću) i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi. Inkubacija u rastvoru sekundarnog antitela je trajala 1 h, nakon čega su bunarići ponovo ispirani (3 x tPBS). Sledeći korak je podrazumevao dodavanje avidina konjugovanog sa HRP, rastvorenog u odgovarajućem rastvoru za blokiranje. Posle inkubacije od 30 min u rastvoru avidina, ploče su ponovo oprane (3 x tPBS), a zatim je u bunariće dodato po 50 µl TMB (pretemperiranog na sobnoj temperaturi), supstrata peroksidaze. Enzimska reakcija transformacije supstrata dovodi do formiranja plave boje, koja je predstavljala signal za prekid reakcije dodavanjem po 50 µl 1M rastvora HCl u bunariće. Dodavanjem HCl dolazi do formiranja žute boje. ApSORBANCA je očitana na SynergyH1 čitaču mikroploča, na talasnoj dužini od 450 nm, uz korekciju na 690 nm. Koncentracija citokina (ng/ml) u supernatantima je izračunata pomoću standardnih krivi koje su konstruisane na osnovu rastvora poznatih koncentracija odgovarajućih rekombinantnih citokina (standarda). Donji limit detekcije je bio 30 pg/ml, dok je gornji limit bio 10 ng/ml.

3.10. Metoda reakcije lančanog umnožavanja

3.10.1. Izolovanje ukupne RNK

Za potrebe izolacije ukupne RNK iz ćelija PLC⁴ inkubiranih preko noći uz stimulaciju i tretman PERA/PEGA, uzorci ćelija su resuspendovani u 500 µl trizola i čuvani na -20°C do izolacije. Prvi korak u izolaciji ukupne RNK je dodavanje 100 µl hladnog hloroforma u svaki uzorak, blago mešanje do formiranja mlečne suspenzije, a zatim centrifugiranje (12000 g, 15 min, +4°C). Od ovog koraka uzorci su sve vreme držani na ledu. Nakon centrifugiranja su se mogle uočiti tri faze: donja organska koja je sadržala proteine uzorka, srednji beličasti prsten koji je sadržao DNK uzorka i gornja bezbojna faza u kojoj se nalazila ukupna RNK uzorka. Bezbojna faza je sakupljena (približno 200 µl) i prebačena u plastične tube od 1,5 ml, u koje je zatim dodavano 250 µl izopropanola. Nakon inkubacije na -20°C, 30 min, uzorci su ponovo centrifugirani (12000 g, 20 min, +4°C), supernatant odliven, a precipitirani talog RNK odvojen od zida tube uz dodavanje 500 µl 75% etanola i blago mešanje. Usledilo je centrifugiranje na 7400 g, 15 min i odlivanje etanola, dok je talog RNK sušen i finalno resuspendovan u 12 µl vode bez nukleaza (*engl.* RNase-Free Water). Koncentracija RNK (µg/µl) u uzorcima je određivana očitavanjem na spektrofotomeru (Nanophotometer, IMPLen, SAD) Nanodrop, a na osnovu ove koncentracije je određivana ukupna količina (µg) RNK u uzorcima. Takođe, meren je i odnos apsorbanca A260/A280, koji ukazuje na čistoću uzoraka.

3.10.2. Reakcija reverzne transkripcije

Reakcijom reverzne transkripcije se izolovana RNK prevodi u cDNK. Za ovu reakciju su korišćene jednake količine RNK (1 µg) iz svakog uzorka, koje su rastvorene u finalnoj zapremini od 11,5 µl. U svaki uzorak je zatim dodat po 1 µl nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Viljus, Litvanija) i inkubiran 5 min na 70°C. Nakon toga su uzorci 2 min držani na ledu, a potom je u svaki uzorak dodavano po 7,5 µl rastvora koji je po uzorku sadržao: 4 µl koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju, 0,5 µl inhibitora RNaza, 2 µl smeše dNPT (10 mM) i 1 µl enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (svi dobavljeni od Fermentas). Finalna zapremina smeše je bila 20 µl. Reakcija reverzne transkripcije je nastavljena inkubacijom 10 min na 25°C, a potom 60 min na 42°C. Reakcija je prekinuta inkubacijom 10 min na 70°C i 3 min na 95°C. Uzorci cDNK su razblaženi 5 x u dejonizovanoj vodi i do dalje upotrebe čuvani na +4°C.

3.10.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*engl.* Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time qPCR) omogućava analizu relativne promene nivoa transkripcije informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) gena od interesa. U ploče sa 96 bunarića za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, SAD) je nalivano po 8 µl reakcione smeše za PCR. Reakcione smeše su nalivane u duplikatu za svaki uzorak, pri čemu su postojale dve različite reakcione smeše za svaki uzorak: jedna za gen od interesa, a druga za referentni gen (*Gapdh*). Reakcione smeše za kvantitativni PCR su po uzorku sadržale: 5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 1 µl specifičnih prajmera za gen od interesa ili za referentni gen (Forward i Reverse, Metabion, Štajnkirhen, Nemačka, sekvence prikazane u Tabeli 1) i 2 µl dejonizovane vode. Nakon nalivanja reakcionih smeša, u svaki bunarić je naliveno po 2 µl odgovarajućeg uzorka cDNK. Ploča je zatim pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, SAD), centrifugirana (1000 g, 1 min) i prenošena u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije su bili sledeći: 10 min na 95°C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali korake od 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Analiza dobijenih rezultata vršena je pomoću odgovarajućeg kompjuterskog programa (7500 System software), obezbeđenog od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Vrednosti relativnih promena ekspresije gena su određivane u odnosu na referentni gen *Gapdh* i iskazane kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između C_t vrednosti gena od interesa i referentnog gena.

Tabela 1. Sekvence prajmera korišćenih u kvantitativnoj reakciji lančanog umnožavanja u realnom vremenu

	Sekvenca (5'-3')
<i>Il-6</i>	5'-GCC CTT CAG GAA CAG CTA TGA-3'
	5'-TGT CAA CAA CAT CAG TCC CAA GA-3'
<i>P19</i>	5'-GGG AGA CTC AAC AGA TGC CT-3'
	5'-GCA CTA AGG GCT CAG TCA GA-3'
<i>P35</i>	5'-CAT CAC ACG GGA CAA AAC CA-3'
	5'-AGG CAC AGG GTC ATC ATC AA-3'
<i>P40</i>	5'-CAC ATC TGC TGC TCC ACA AG-3'
	5'-CAA GTC CGT GTT TCT GTG CA-3'
<i>Tgf-β</i>	5'-CCC TGC CCC TAC ATT TGG A-3'
	5'-ACG GTG ATG CGG AAG CAC-3'
<i>Gapdh</i>	5'- ACA TCA TCC CTG CAT CCA CT-3'
	5'-GGG AGT TGC TGT TGA AGT CA-3'

3.11. Merenje produkcije NO

Za detekciju i kvantifikaciju NO u ćelijskim kulturama korišćeno je DAF-FM DA jedinjenje koje je neobojeno, dok u reakciji sa NO obrazuje fluorescentno jedinjenje, benzotriazol. DAF-FM DA može pasivnom difuzijom da prođe u ćeliju, a unutar ćelije dolazi do delovanja esteraza i oslobađanja DAF-FM. Nakon toga, dolazi do reakcije između DAF-FM i NO, što se detektuje kao promena intenziteta fluorescence. Ćelije su gajene u optičkoj ploči sa 96 bunara, a fluorescenca je očitana nakon 20 h na SynergyH1 čitaču mikroploča. Ekscitacija je podešena na 510 nm, a emisija na 540 nm.

3.12. Citofluorimetrija

3.12.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula

Ekspresija površinskih molekula na ćelijama izolovanim iz PLČ, BV2 ćelijama, i SCIC je određivana metodom određivanja imunofluorescencije pomoću protočnog citofluorimetra. Na ćelijama izolovanim iz PLČ i SCIC je ispitivana ekspresija molekula CD4, CD25 i OX40. Na BV2 ćelijama je ispitivana ekspresija molekula CD40, CD206, MHC II i CD86.

Nakon inkubacije preko noći u prisustvu PERA/PEGA, ćelije PLČ, SCIC i BV2 ćelije, su sakupljene u epruvete za protočnu citofluorimetriju. Ukoliko su, pored površinskih molekula, određivani citokini IFN- γ i IL-17, ćelije su stimulisane komercijalnim koktelom za stimulaciju ćelija 4 h pre imunofluorescentnog bojenja površinskih molekula. Ćelijska suspenzija je centrifugirana (800 g, 3 min) i resuspendovana u 50 μ l rastvora odgovarajućeg antitela ili izotipske kontrole, koncentracije preporučene od strane proizvođača (korišćena antitela su prikazana u Tabeli 2 i 3). Antitela su rastvarana u komercijalnom puferu za imunofluorescentno bojenje ćelijskih molekula (*engl.* Flow Cytometry Staining Buffer, eBioscience). Nakon inkubacije 45 min na +4°C, ćelije su dva puta oprane u PBS. BV2 ćelije su centrifugirane (800 g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Ćelije izolovane iz PLČ i SCIC su dalje ili resuspendovane u 1 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru ili imunofluorescentno bojenje na unutarćelijske molekule, prema protokolu opisanom u nastavku.

Tabela 2. Antitela korišćena u imunofluorescentnom bojenju površinskih molekula BV2 ćelija

Anti-pacovsko antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
CD206	PE	IgG2b, kappa lanac iz pacova	eBioscience
CD86	PE-Cy-5	IgG2b, kappa lanac iz pacova	eBioscience
CD40	APC	IgM, kappa lanac iz Jermenskog hrčka	eBioscience
MHC II	APC-eFluor780	IgG2b, kappa lanac iz pacova	eBioscience

Tabela 3. Antitela korišćena u imunofluorescentom bojenju površinskih molekula

Anti-pacovsko antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
CD4	FITC/PE	IgG2a, kappa lanac iz miša	eBioscience
CD25	PE	IgG1, kappa lanac iz miša	eBioscience
CD134 (OX40)	APC	IgG2b, kappa lanac iz miša	BD Pharmingen

3.12.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula

U imunskim ćelijama izolovanim iz PLČ i kičmenih moždina je određivana ekspresija sledećih unutarćelijskih molekula: nuklearnog proteina Ki-67, transkripcionog faktora FOXP3, citokina IFN- γ i IL-17. Ukoliko je određivana ekspresija nuklearnog proteina Ki-67 ili transkripcionog faktora Foxp3, ćelije su nakon imunofluorescentnog bojenja za površinske markere, oprane 2 x u PBS i preko noći inkubirane u 100 μ l komercijalnog rastvora za fiksaciju i permeabilizaciju (Puferi za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija - Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience)). Zatim su isprane 2 x u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju (Permeabilization Buffer 10x, eBioscience), pa inkubirane 1 h na +4°C u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju uz odgovarajuću koncentraciju antitela za Ki-67 ili Foxp3. Potom su ćelije ponovo oprane 1 x u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju (800 g, 3 min), zatim 1 x u PBS i centrifugirane (800 g, 3 min). Posle toga su resuspendovane u 1 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

Ukoliko je određivana ekspresija IFN- γ i IL-17, ćelije su nakon imunofluorescentnog bojenja za površinske markere, oprane 2 x PBS i inkubirane preko noći u 100 μ l komercijalnog rastvora za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija. Narednog dana su isprane 2 x u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju (800 g, 3 min) i inkubirane 1 h na +4°C u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju, uz odgovarajuću koncentraciju antitela za IFN- γ i IL-17. Potom su ćelije ponovo isprane 1 x u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju (800 g, 3 min), a zatim centrifugirane 1x u PBS (800 g, 3 min). Pre analize na protočnom citofluorimetru, resuspendovane su u 1 ml PBS. Za imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula korišćena antitela su rastvarana u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju (Tabela 4).

Tabela 4. Antitela korišćena u imunofluorescentom bojenju unutarćelijskih molekula

Anti-pacovsko/mišje antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
Foxp3	PerCP-Cy5.5	IgG2a, kappa lanac iz pacova	eBioscience
IFN- γ	FITC	IgG1, kappa lanac iz pacova	eBioscience
IL-17	PerCP-Cy5.5	IgG2a, kappa lanac iz pacova	BD Pharmingen

Ki-67	FITC	IgG2a, kappa lanac iz pacova	eBioscience
-------	------	------------------------------	-------------

3.12.3. Merenje procenta apoptotičnih ćelija

Procenat apoptotičnih ćelija određivan je na nivou CD4⁺ ćelija PLČ i CD4⁺ ćelija među SCIC metodom protočne citofluorimetrije, pomoću proteina aneksina V konjugovanog bojom FITC. Aneksin V se specifično vezuje za fosfatidilserin koji se ispoljava na spoljnoj površini membrane ćelija u početnoj fazi apoptoze. Ćelije PLČ i SCIC su nakon inkubacije od 24 h uz stimulaciju (za ćelije PLČ) ili bez stimulacije (SCIC) i uz tretman PERA/PEGA, imunofluorescentno obeležene na molekul CD4 (prema prethodno navedenom protokolu za imunofluorescentno bojenje površinskih molekula). Nakon toga, ćelije su oprane 2 x PBS i resuspendovane u 100 µl ABB sa odgovarajućom koncentracijom aneksina V-FITC. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodato još 900 µl ABB, i zatim su analizirani na protočnom citofluorimetru.

3.12.4. Merenje procenta ćelija koje vrše fagocitozu

Za potrebe određivanja procenta ćelija koje vrše fagocitozu metodom protočne citofluorimetrije, BV2 ćelije su inkubirane preko noći uz tretman PERA/PEGA. Pre dodavanja ćelijama, fluorescentno obeležene kuglice su preopsonizovane inkubacijom u 50% FCS PBS, 1 h na 37°C. Nakon toga, ćelijama je u ploče od 24 bunara dodavano 500 µl rastvora fluorescentno obeleženih kuglica od lateksa za fagocitozu, u odgovarajućoj koncentraciji. Ćelije su zatim inkubirane 1 h u ovom rastvoru. Nakon isteka inkubacije ćelija u rastvoru kuglica za fagocitozu, rastvor je uklonjen, a ćelije su oprane 2 x PBS i inkubirane u 300 µl 2 x razblaženog rastvora tripan plavog u cilju gašenja fluorescence koja potiče od kuglica koje su se zalepile na površinu ćelija. Nakon 2 min inkubacije u rastvoru tripan plavog, rastvor je odliven, a ćelije su oprane 2 x PBS. Zatim su ćelije skinute s podloge, i finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

3.12.5. Merenje produkcije ROS

Merenje produkcije ROS od strane BV2 ćelija je rađeno upotrebom boje DHR (dihidrorodamin 123). Prema prethodno navedenom, ćelije su inkubirane 24 h u prisustvu PERA/PEGA bez dodatne stimulacije. Sutradan, ćelije su preinkubirane u prisustvu PERA/PEGA i DHR 20 min, a zatim stimulisane LPS (100 ng/ml) u trajanju od 1,5 h. Ćelije su resuspendovane u 1 ml PBS, i nakon toga analizirane na protočnom citofluorimetru.

3.12.6. Analiza uzoraka dobijenih protočnom citometrijom

Intenzitet fluorescencije imunofluorescentno obeleženih ćelijskih markera korišćenih u izradi ove doktorske disertacije, detektovan je pomoću protočnog citofluorimetra Partec CyFlow Space i analiziran FlowMax softverom (Partec, Gerlic, Nemačka) ili BD FACSCalibur i BD FACSAria III protočnim citofluorimetrima (BD Biosciences) i analiziran FlowMax ili FlowJo (Treestar, Ešlend, Oregon, SAD) softverom. U cilju razlikovanja živih od mrtvih ćelija i debrisa dobijeni signal je ograničavan korišćenjem Forward scatter - FSC i Side scatter – SSC optičkim detektorima, a u cilju isključivanja dubleta i multiplleta iz analize korišćen je FSC-W (width) signal. Granice pozitivnosti ćelijskih markera su određivane na osnovu odgovarajućih izotipskih kontrola, kao i negativnih kontrola, koje su predstavljale odgovarajuće ćelije inkubirane bez prisustva antitela. Procenat ćelija koje su bile obojene antitelima izotipske kontrole bio je manji od 1%. Rezultati su prikazivani kao procenat pozitivnih ćelija za specifične molekule.

3.13. Analiza ćelija u realnom vremenu

Promene u aktivacionom statusu, morfologiji, proliferaciji i vijabilnosti ćelija se manifestuje kroz promene u interakciji ćelija s podlogom i detektuju se kao promena otpora pomoću xCELLigence RTCA DP analizatora (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Za potrebe ovakve analize ćelija u realnom vremenu (*engl.* Real-time cell analysis, RTCA), BV2 ćelije su postavljene u koncentraciji od $2,5 \times 10^4$ ćelija/bunaru u ploče E-Plate 16 (Roche Diagnostics) i nakon 24 h inicijalne adherencije, primenjeni su PERA/PEGA (5 i 10 μM) i stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) i LPS (10 ng/ml). Nakon dodavanja PERA/PEGA u kulturu ćelija, merenje otpora vršeno je na svakih 5 min tokom prvih 2 h kultivacije i zatim na svakih 15 min preko noći. Detektovane promene otpora su izražene kao ćelijski indeks.

3.14. Primena PERA/PEGA na pacovima *in vivo*

Za potrebe *in vivo* eksperimenata, PERA/PEGA su rastvoreni u DMSO u koncentraciji od 500 mg/ml. Iz datog rastvora je pripreman radni rastvor u susamovom ulju. Ovako pripremljeni radni rastvori (100 μl) su davani subkutano, u donji deo leđa pacova, i to PERA od 7-22.d.n.i, a PEGA od 7-15. d.n.i. Pacovi su tretirani PERA u dozi od 30 mg/kg telesne mase, dok je doza PEGA koju su pacovi primali bila 20 mg/kg. Ove doze su izabrane na osnovu literaturnih podataka o primeni RA (Rocha i sar., 2015; Seo i sar., 2015) i GA (Maurya i sar., 2014; Stanley Mainzen Prince i sar., 2011) *in vivo*. Kontrolne grupe su primale istu zapreminu DMSO koju su primale životinje tretirane PERA/PEGA rastvorenog u susamovom ulju.

3.15. Histološka analiza preseka kičmene moždine

3.15.1. Priprema histoloških preseka kičmenih moždina u parafinu

Za histološku analizu inflamacijskih infiltrata i demijelinizacije u KM, preseci tkiva KM su bojeni sa hematoksilinom i eozinom (H&E) i SBB, respektivno. Životinje tretirane sa PERA/PEGA kod kojih je indukovana EAE imunizacijom HKM su žrtvovane na vrhuncu bolesti kontrolnih (netretiranih) životinja (između 11. - 14. d.n.i). Izolovano je 1 cm lumbosakralnog dela kičmene moždine, koji je ostavljen preko noći u rastvoru 4% PFA (paraformaledhid) na +4°C. Sutradan je urađena dehidracija tkiva, tako što je tkivo ostavljano u rastućim koncentracijama etanola, počevši od 30 %, zatim 50 % i 70 % etanola (u svakom 2 x 30 min), i, konačno, 2 x 1 h u 96 % i apsolutnom etanolu. Parafinizacija tkiva je započeta prebacivanjem tkiva u ksilol (2 x 3 min), nakon čega je tkivo ostavljeno prethodno otopljenom parafinu 1 h na 56 °C. Zatim je tkivo prebačeno u posudicu sa svežim parafinom u kojem su uzorci ostavljani preko noći u termostatu. Postupak je ponovljen još jednom, posle čega su tkiva ukalupljena i kalupi čuvani na sobnoj temperaturi do dalje obrade. Tkiva su sečena na Leica RM2265 mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka), a preseci debljine 5 μm stavljani su na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, Braunšvajg, Nemačka).

3.15.2. Bojenje histoloških preseka kičmenih moždina H&E

Neposredno pred bojenje tkivnih preseka kičmene moždine vršena je deparafinizacija potapanjem predmetnih stakala u ksilol 2 x 3 min, a potom i rehidracija potapanjem u rastvore etanola, počevši od apsolutnog, zatim 96 % i na kraju 70 % etanola (svaki po 5 min), nakon čega su uzorci potapani u destilovanu vodu. Bojenje ćelijskih jedara vršeno je potapanjem tkiva u Majerov hematoksilin tokom 8 min. Nakon ispiranja destilovanom vodom, bojenje eozinom trajalo je 3 min, u cilju bojenja citoplazme ćelija. Nakon ispiranja destilovanom vodom, predmetna stakla pokrivana su pokrovnim staklima uz korišćenje DPX. Preseci su posmatrani i fotografisani digitalnom kamerom Leica DFC295 (Leica, Heerbrugg, Švajcarska) povezanom sa svetlosnim mikroskopom Leica DM4000 B LED (Leica, Veclar, Nemačka).

3.15.3. Bojenje histoloških preseka kičmenih moždina bojom SBB

Neposredno pred bojenje tkivnih preseka kičmene moždine vršena je deparafinizacija potapanjem predmetnih stakala u ksilol 2 x 3 min, a potom i rehidracija potapanjem u rastvore etanola, počevši od apsolutnog, zatim 96 % i na kraju 70 % etanola (svaki po 5 min), nakon čega su uzorci potapani u destilovanu vodu. SBB predstavlja blago baznu boju koja se vezuje za kisele grupe lipida i fosfolipida mijelina. Nakon rastvaranja SBB u propilen glikolu na 100°C, rastvor je ohlađen i profiltriran kroz filter papir. Neposredno pre upotrebe rastvor SBB je temperiran na 60°C. Tkiva su nakon deparafinizacije potopljena u destilovanu vodu u trajanju od 3 min. Zatim su tkiva potapana u propilen-glikol 2 x 5 min, i prebačena u rastvor SBB u trajanju od 7 min uz konstantno mešanje na mešalici. Nakon toga, preseci su potopljeni u 85% rastvor propilen-glikola u trajanju od 3 min. Na kraju su predmetna stakla prebačena u destilovanu vodu, a potom pokrivena pokrovnim staklima uz korišćenje Fluoromount-GTM (eBioscience). Preseci su posmatrani i fotografisani digitalnom kamerom Leica DFC295 (Leica, Heerbrugg, Švajcarska) povezanom sa svetlosnim mikroskopom Leica DM4000 B LED (Leica, Veclar, Nemačka). Preseci su analizirani u softveru ICY (BioImage Analysis Lab, Institut Pasteur, Paris, France) obeležavanjem regiona od interesa (bele mase), kvantifikovanjem regiona od interesa, tj. intenziteta boje koji je predstavljen kroz brojčanu vrednost (svetla polja predstavljaju polja demijelinizacije, dok tamna predstavljaju delove koji nisu podlegli demijelinizaciji), i finalno, poređenjem tretirane i kontrolne grupe.

3.16. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i/ili kao srednja vrednost (SV) ± standardna devijacija (SD), dobijene u više nezavisnih eksperimenata. Analiza statističke značajnosti razlika između eksperimentalnih grupa utvrđivana je Studentovim t-testom ili jednofaktorijska univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje. Vrednost parametra *p* manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom razlikom između eksperimentalnih grupa. Za statističku analizu korišćen je GraphPad Prism 8 i 9 softverski program (GraphPad Software, Inc., La Hoja, Kalifornija, SAD).

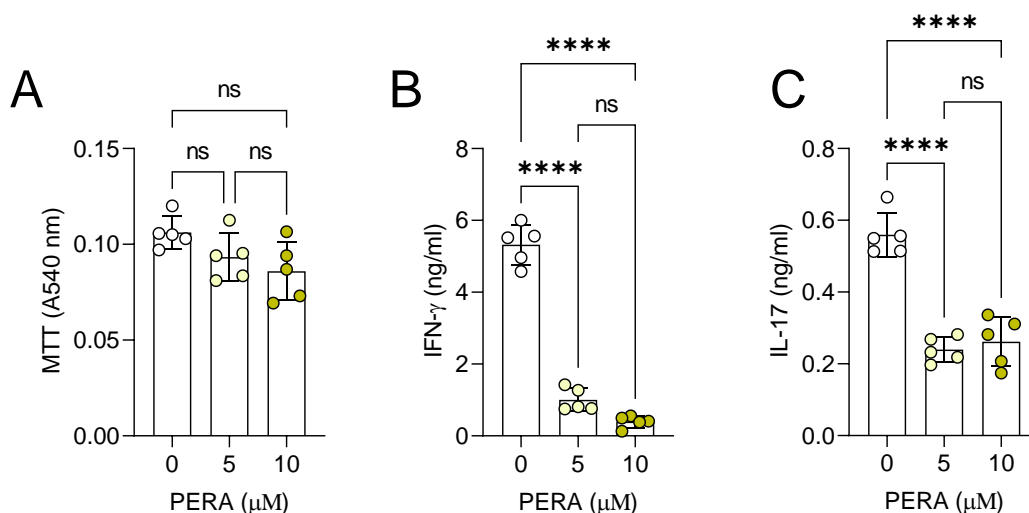
4. Rezultati

4.1. Imunomodulacijski efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na ćelije PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

4.1.1. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

Za potrebe ispitivanja *in vitro* tretmana PERA i PEGA na generisanje imunskog odgovora na različite antigene, jedna grupa životinja je imunizovana HKM (sadrži smešu encefalitogena), a druga encefalitogenim peptidom MOG₃₅₋₅₅ u CFA (sadrži encefalitogen, mikobakterijske antigene i mineralno ulje). Prilikom imunizacije pacova u zadnju šapu, periferne dendritske ćelije preuzimaju i prezentuju antigene poreklom iz CNS naivnim T-ćelijama unutar PLČ (limfni čvorovi koji dreniraju mesto imunizacije). Ove ćelije se zatim diferenciraju u Th1 i Th17 subpopulacije ćelija koje imaju vodeću ulogu u patogenezi EAE. Th1 i Th17 subpopulacije ćelija predstavljaju glavni izvor encefalitogenih citokina, IFN- γ i IL-17. S obzirom na to da PLČ predstavljaju mesto generisanja imunskog odgovora na encefalitogene u EAE, imunomodulacijski efekat PERA/PEGA je prvo ispitan na imunskim ćelijama izolovanim iz PLČ.

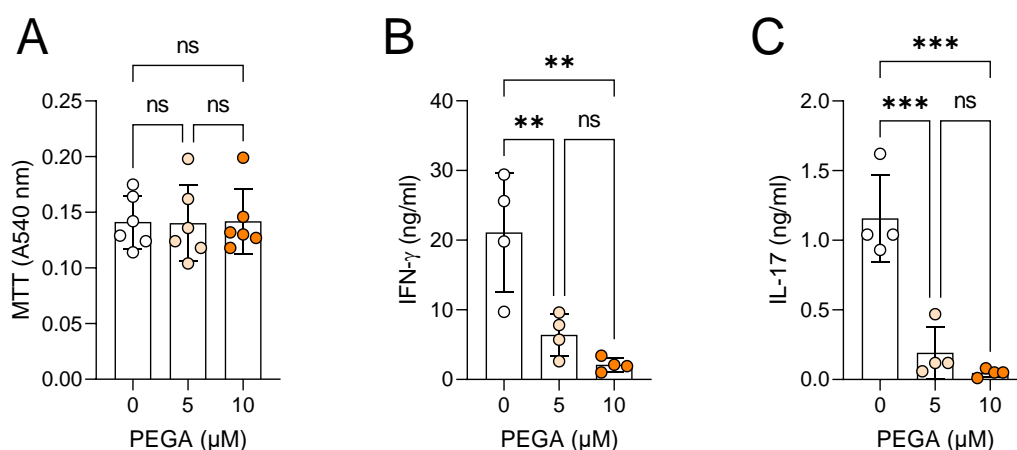
Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* tretmana PERA na imunске ćelije PLČ, životinje su imunizovane HKM, a PLČ izolovani u induktivnoj fazi bolesti (6. d.n.i). Ćelije PLČ su restimulisane MBP i tretirane PERA. Pokazano je da nijedna od ispitanih koncentracija PERA (5 i 10 μ M) nije ostvarila statistički značajan uticaj na vijabilnost ćelija (Slika 4A). Međutim, obe koncentracije PERA su značajno snizile koncentraciju IFN- γ (Slika 4B) i IL-17 (Slika 4C) u supernatantima kulture PLČ, što ukazuje da PERA ostvaruje imunomodulacijski efekat u ćelijama PLČ restimulisanih encefalitogenom, inhibitorno delujući na produkciju/oslobađanje citokina IFN- γ i IL-17.



Slika 4. Efekat *in vitro* tretmana PERA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. Izdvojene imunске ćelije PLČ su stimulisane MBP (10 μ g/ml), u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (5 i 10 μ M), u trajanju od 24 h. Testom MTT je određena vijabilnost ćelija (A). U supernatantima kultura imunskih ćelija izolovanih iz PLČ je određena koncentracija citokina IFN- γ (B) i IL-17 (C) metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns - nema statističke značajnosti. **** p < 0,0001. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti ćelija i

koncentraciji IFN- γ i IL-17, korišćena je jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* tretmana PEGA na vijabilnost imunskih ćelija PLČ i koncentraciju efektorskih citokina u kulturama ovih ćelija, životinje su imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, a imunске ćelije iz PLČ su izolovane u induktivnoj fazi bolesti (6. d.n.i). Zatim, imunске ćelije PLČ su restimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ i tretirane PEGA. Dobijeni rezultati pokazuju da PEGA u ispitanim koncentracijama (5 i 10 μ M) nije uticao na vijabilnost imunskih ćelija izolovanih iz PLČ (Slika 5A), ali je značajno smanjio koncentraciju IFN- γ (Slika 5B) i IL-17 (Slika 5C) u supernatantima kultivisanih ćelija PLČ. Dobijeni rezultati ukazuju da PEGA ostvaruje imunomodulacijski efekat u ćelijama PLČ restimuliranih encefalitogenom, i to inhibitorno delujući na produkciju/oslobađanje citokina IFN- γ i IL-17.



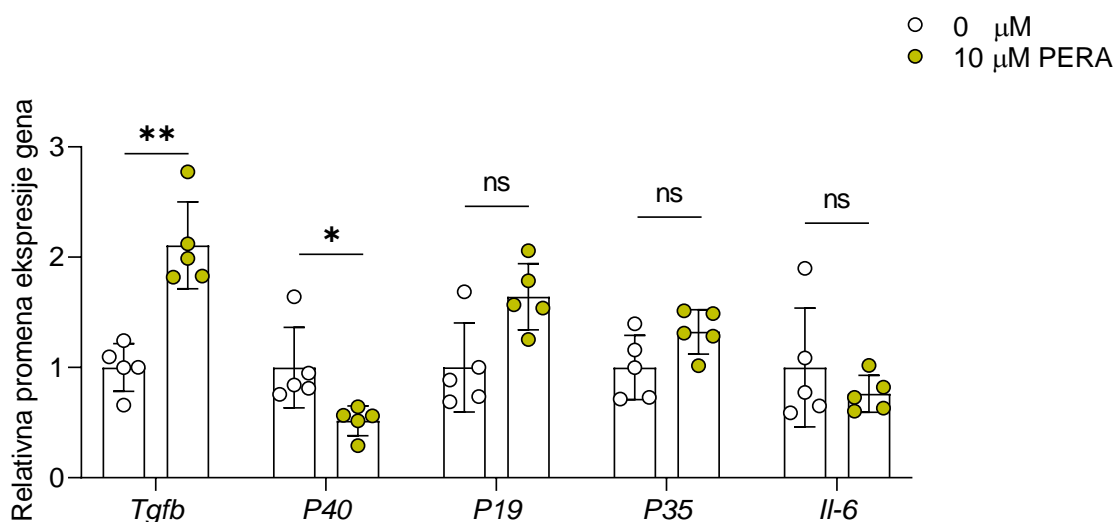
Slika 5. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na vijabilnost i produkciju citokina ćelija PLČ DA pacova imunizovanih peptidom MOG₃₅₋₅₅. Pacovi su imunizovani peptidom MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) + CFA (5 mg/ml) i PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su restimulisane MOG₃₅₋₅₅ (15 μ g/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Nakon toga, urađen je test MTT za procenu vijabilnosti ćelija PLČ (A). Metodom ELISA u supernatantima kultura ćelija PLČ je određena koncentracija citokina IFN- γ (B) i IL-17 (C). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD šest (A) i četiri (B, C) uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti ćelija i koncentraciji IFN- γ i IL-17, korišćena je jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.1.2. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na nivo ekspresije gena *Tgfb β* , *P40*, *P19*, *P35* i *Il-6* u ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

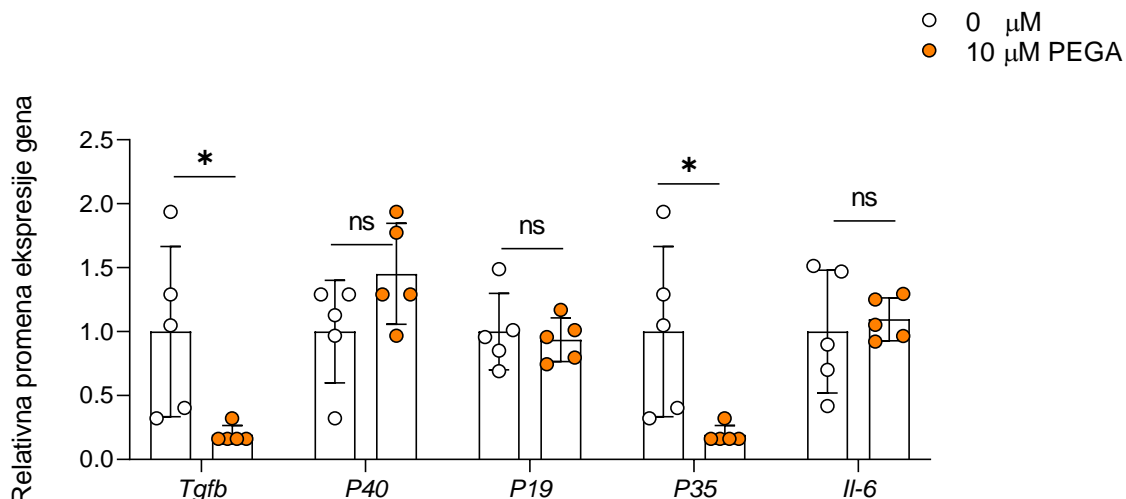
Citokinski milje unutar limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije utiče na diferencijaciju naivnih T-ćelija (Th0) ka Treg, Th1 i Th17 ćelijama. Tako, citokin TGF- β je potreban za usmeravanje Th0-ćelija ka Treg ćelijskom fenotipu (Oukka, 2007), IL-12 za Th1, a citokini IL-23, TGF- β i IL-6 za diferencijaciju Th17 ćelijskog fenotipa (Fletcher i sar., 2010). U skladu s tim, ispitan je efekat PERA/PEGA na relativnu ekspresiju gena koji kodiraju ove proteine. Citokini IL-12 i IL-23 predstavljaju heterodimerne proteine izgrađene od različitih subjedinica, među kojima je subjedinica p40 zajednička. Tako, ispitan je efekat PERA/PEGA na relativnu ekspresiju gena *Tgfb β* i *Il-6*, zatim gena *P40* i *P35* koji kodiraju proteinske subjedinice p40 i p35 koje izgrađuju IL-12, kao i na *P19*

koji kodira subjedinicu p19, koja zajedno sa subjedinicom p40 ulazi u sastav IL-23 (Brahmachari i Pahan, 2008; Grifka-Walk, 2015).

Za potrebe ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na relativnu ekspresiju navedenih gena u ćelijama izolovanih iz PLČ, životinje su imunizovane HKM, a ćelije su izolovane u induktivnoj fazi bolesti (6 d.n.i). Ćelije PLČ su restimulisane MBP i tretirane PERA/PEGA. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 μ M) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. Pokazano je da je PERA u ispitanoj koncentraciji (10 μ M) doveo do značajnog povećanja relativne ekspresije *Tgfb* (Slika 6) i smanjenja relativne ekspresije *P40* (Slika 6), dok nije uočen značajan efekat na relativnu ekspresiju gena *P19*, *P35* i *Il-6* (Slika 6). Ovi rezultati ukazuju na to da je relativna ekspresija gena za proteinske subjedinice koje ulaze u sastav IL-12 (p35+p40) i IL-23 (p19+p40), glavnih citokina koji su neophodni za diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija, smanjena usled delovanja PERA. Sa druge strane, PEGA (10 μ M) je smanjio relativni nivo ekspresije gena *P35* (Slika 7), kao i gena *Tgfb* (Slika 7), dok nije ostvario uticaj na ekspresiju gena *P40*, *P19* i *Il-6* (Slika 7). Ovo ukazuje da bi PEGA svoj uticaj na Th1 ćelije mogao ostvarivati smanjenjem koncentracije subjedinice p35, što bi dovelo do smanjene koncentracije IL-12, odnosno na Th17 ćelije smanjenjem koncentracije TGF- β .



Slika 6. Efekat *in vitro* tretmana PERA na nivo ekspresije gena *Tgfb*, *P40*, *P19*, *P35* i *Il-6* u ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i., a ćelije iz PLČ su postavljene u kulturu i restimulisane MBP (10 μ g/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (10 μ M) u trajanju od 24 h. Relativni nivo ekspresije iRNK navedenih gena je određen metodom RT-qPCR. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. Srednjoj vrednosti ekspresije iRNK u odsustvu PERA je arbitrarno data vrednost 1. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u ekspresiji navedenih gena u ćelijama PLČ je korišćen Studentov t-test.



Slika 7. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na nivo ekspresije gena *Tgfb*, *P40*, *P19*, *P35* i *Il-6* u ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su restimulirane MBP (10 μg/ml) u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (10 μM), u trajanju od 24 h. Relativni nivo ekspresije iRNK navedenih gena je određen metodom RT-qPCR. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV±SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. Srednjoj vrednosti ekspresije iRNK u odsustvu PEGA je arbitrarno data vrednost 1. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u ekspresiji navedenih gena u ćelijama PLČ je korišćen Studentov t-test.

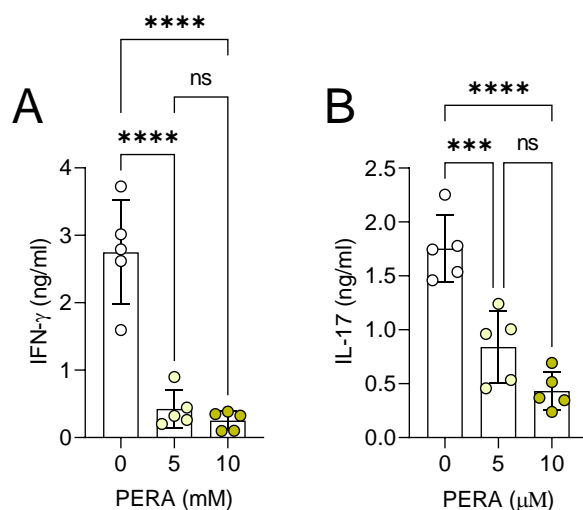
4.1.3. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na funkcionalne i fenotipske karakteristike CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

CD4⁺ populacija T-ćelija predstavlja vodeću populaciju efektorskih ćelija u patogenezi EAE, a unutar nje se izdvajaju dve glavne encefalitogene subpopulacije ćelija - Th1 i Th17 (Kaskow i Baecher-Allan, 2018; Jadidi-Niaragh i Mirshafiey, 2011). Prema tome, ispitan je *in vitro* efekat PERA/PEGA na produkciju citokina IFN-γ i IL-17 od strane CD4⁺ ćelija prečišćenih iz PLČ pacova koji su prethodno imunizovani HKM ili peptidom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Za potrebe stimulacije CD4⁺ ćelija prilikom tretmana ovim estrima korišćeni su različiti režimi stimulacije. Anti-CD3/CD28 omogućava aktivaciju CD4⁺ limfocita preko T-ćelijskog receptora i kostimulatora, dok PMA+jonomicin direktno aktivira unutarćelijske signalne puteve CD4⁺ limfocita. Pored toga, ispitan je i uticaj PERA/PEGA na apoptozu (AnnV⁺), proliferaciju (Ki-67⁺) i aktivacioni status (CD25⁺, OX40⁺) CD4⁺ ćelija, kao i na CD25⁺Foxp3⁺ ekspimirajuće (Treg), IFN-γ-produkujuće (Th1) i IL-17-produkujuće (Th17) CD4⁺ ćelije.

4.1.3.1. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na koncentraciju citokina u supernatantima kultura CD4⁺ ćelija separisanih iz PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

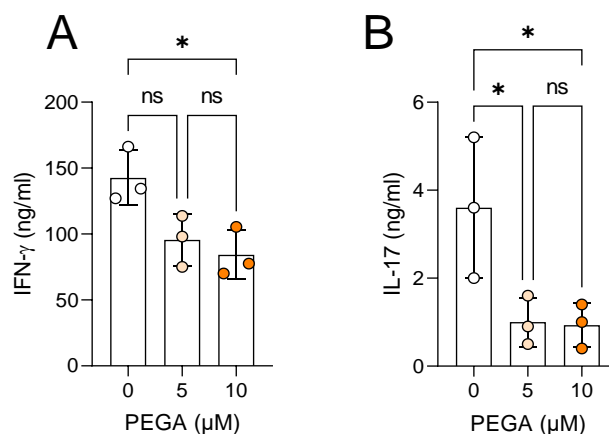
U cilju ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA na funkcionalne karakteristike CD4⁺ ćelija životinje su imunizovane HKM, a 6. d.n.i. su izolovani PLČ iz kojih su magnetnom separacijom prečišćene CD4⁺ ćelije. Ćelije su restimulirane anti-CD3 + anti-CD28 antitelima i tretirane PERA (5 i 10 μM). Tretman ćelija PERA doveo je do značajnog smanjenja koncentracije citokina IFN-γ (Slika 8A) i IL-17 (Slika 8B) u supernatantima kulture CD4⁺ ćelija. Na osnovu ovih rezultata, moglo bi se zaključiti

da PERA ostvaruje supresivni efekat na CD4⁺ ćelije, inhibirajući njihovu sposobnost da produkuju/oslobode citokine IFN- γ i IL-17.



Slika 8. Efekat *in vitro* tretmana PERA na koncentraciju citokina IFN- γ i IL-17 u supernatantima kultura CD4⁺ ćelija separisanih iz PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i., a CD4⁺ ćelije, separisane iz ćelija PLČ metodom magnetne separacije, su stimulisane anti-CD3 (1 μ M) i anti-CD28 (1 μ M) antitelima, u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Metodom ELISA je određena koncentracija citokina IFN- γ (A) i IL-17 (B) u supernatantima kultivisanih CD4⁺ ćelija. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Za određivanje statističke značajnosti razlika u koncentraciji IFN- γ i IL-17, korišćena je jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

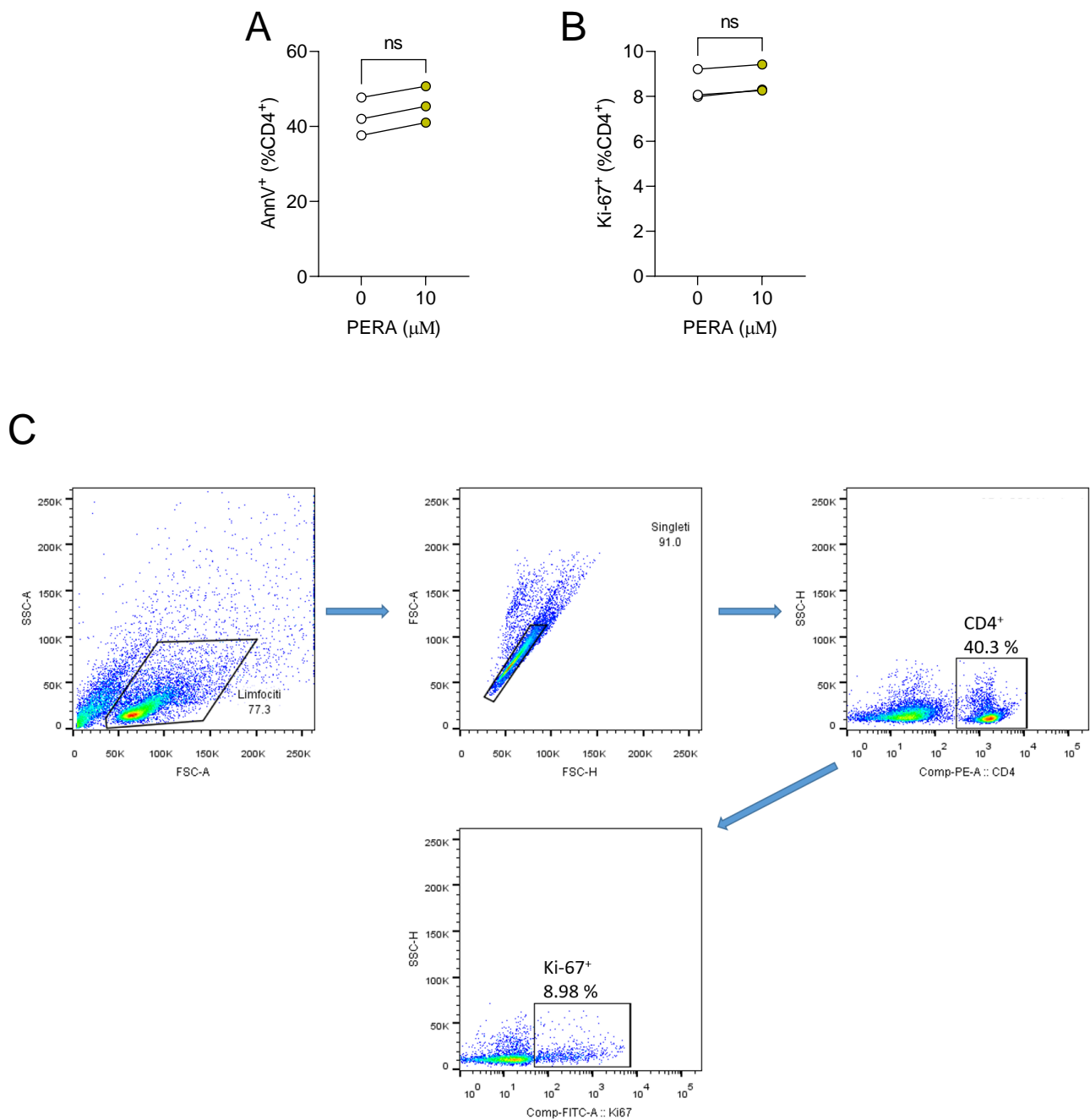
U cilju ispitivanja efekta *in vitro* tretmana PEGA na funkcionalne karakteristike CD4⁺ ćelija, životinje su imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, a 6. d.n.i. su izolovani PLČ iz kojih su prečišćene CD4⁺ ćelije magnetnom separacijom. CD4⁺ ćelije su stimulisane PMA + jonomicinom i tretirane PEGA. Koncentracija PEGA od 5 μ M nije značajno uticala na koncentraciju IFN- γ u supernatantima kulture CD4⁺ ćelija (Slika 9A), dok je koncentracija PEGA od 10 μ M značajno smanjila koncentraciju IFN- γ (Slika 9A). PEGA je u obe koncentracije doveo do značajnog smanjenja koncentracije IL-17 (Slika 9B) u supernatantima kulture CD4⁺ ćelija. Prema dobijenim rezultatima, može se zaključiti da i PEGA ostvaruje supresivni efekat na CD4⁺ populaciju ćelija, kao glavnu efektorsku populaciju ćelija u patogenezi EAE.



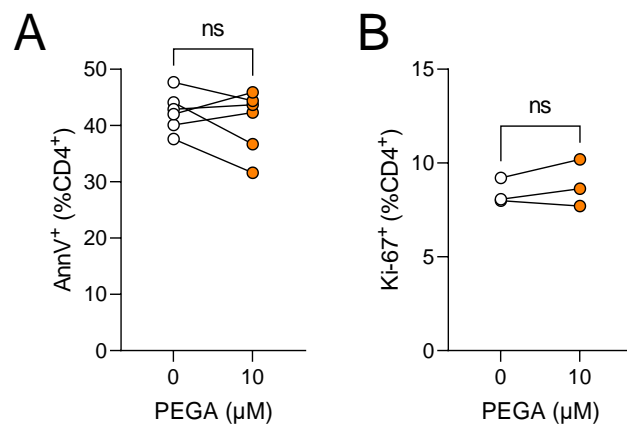
Slika 9. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na koncentraciju citokina IFN- γ i IL-17 u supernatantima kultura CD4⁺ ćelija separisanih iz PLČ DA pacova imunizovanih peptidom MOG₃₅₋₅₅. Pacovi su imunizovani peptidom MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) + CFA (5 mg/ml). PLČ su izolovani 6. d.n.i. i CD4⁺ ćelije su izdvojene iz ćelija PLČ metodom magnetne separacije. CD4⁺ ćelije su stimulisane PMA (100 ng/mL) i jonomicinom (400 ng/mL) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Metodom ELISA je određena koncentracija citokina IFN- γ (A) i IL-17 (B) u supernatantima kultura CD4⁺ ćelija. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * p < 0,05. Za određivanje statističke značajnosti je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.1.3.2. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na procenat apoptotičnih i proliferišućih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM

U svrhu ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na apoptozu i proliferaciju ćelija izolovanih iz PLČ 6. d.n.i., životinje su imunizovane sa HKM. Ćelije PLČ su *ex vivo* stimulisane MBP i tretirane PERA/PEGA, a potom je određen udeo apoptotičnih (AnnV⁺) i proliferišućih (Ki-67⁺) ćelija metodom protočne citofluorimetrije. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 μ M) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. AnnV je protein i koristi se za detekciju apoptotičnih ćelija vezujući se za fosfatidilserin koji je visoko zastupljen na apoptotičnim ćelijama kako bi bile prepoznate od strane makrofaga (Koopman i sar., 1994). Protein Ki-67 je prisutan u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu), dok je odsutan tokom mirujuće faze (G0), te je tako pogodan molekul za određivanje tzv. rastuće populacije ćelija (Scholzen i Gerdes, 2000). Utvrđeno je da tretman PERA/PEGA (10 μ M) nije doveo do značajne promene procentualne zastupljenosti AnnV⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Slika 10A, Slika 11A), kao i da nije imao uticaj na zastupljenost Ki-67⁺ ćelija među CD4⁺ ćelijama PLČ (Slika 10B, Slika 11B). Ovi rezultati ukazuju na to da tretman PERA/PEGA ne utiče na apoptozu CD4⁺ ćelija, kao ni na njihov proliferativni odgovor.



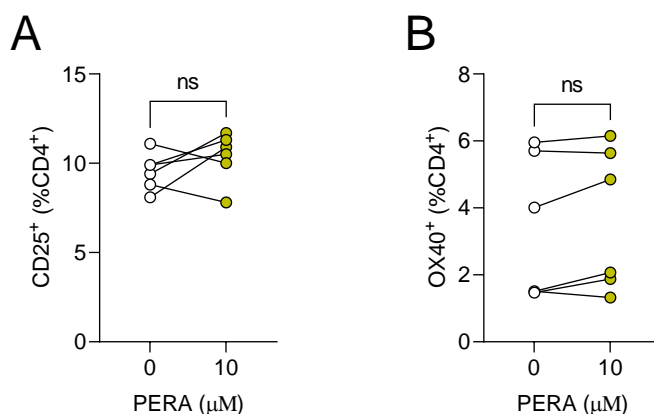
Slika 10. Efekat *in vitro* tretmana PERA na procenat apoptotičnih i proliferišućih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. Pacovi su imunizovani HKM i PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (10 μM) u trajanju od 24 h. Apoptoza CD4⁺ ćelija je određivana fluorescentno obeleženim proteinom AnnV (A), a proliferacija imunofluorescentnim bojenjem proteina Ki-67 (B). Procenat ćelija koje eksprimiraju ove molekule je određivan metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru (C). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu apoptotičnih i proliferišućih ćelija je korišćen Studentov t-test.



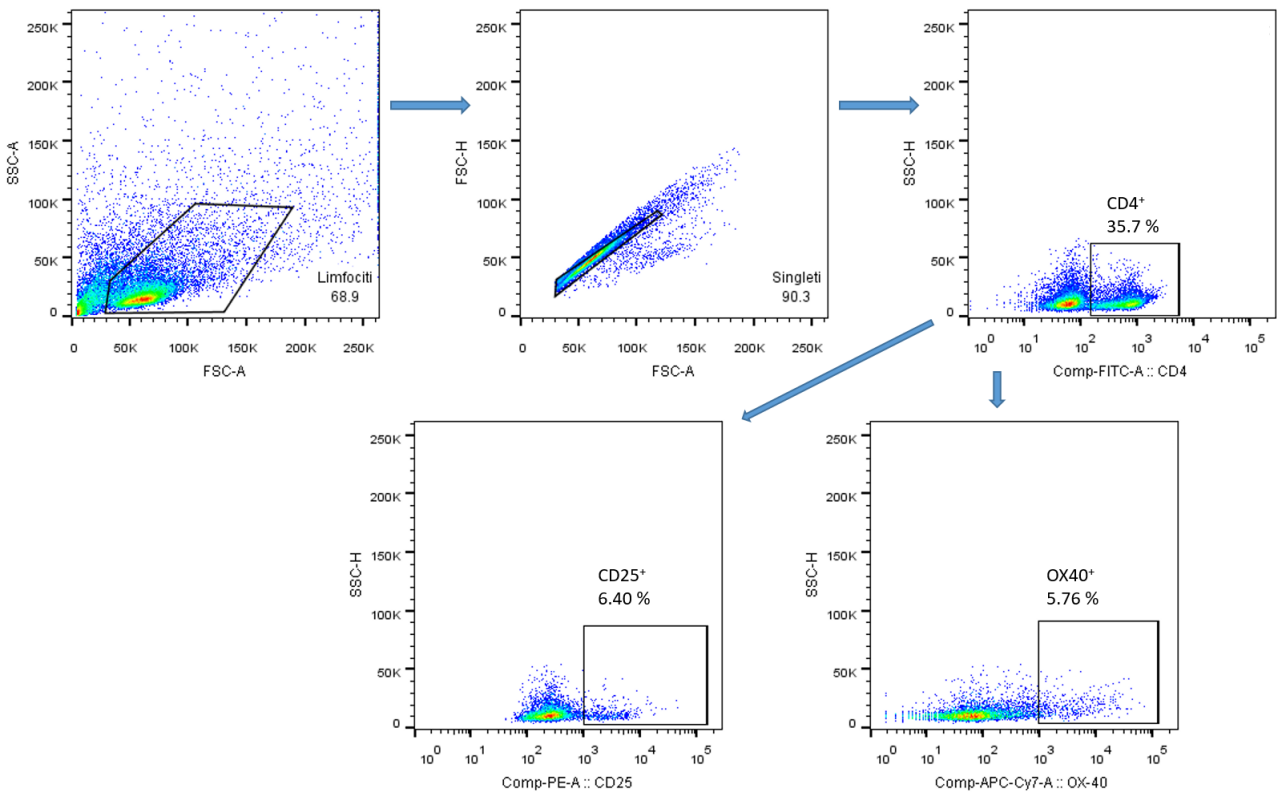
Slika 11. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na procenat apoptotičnih i proliferišućih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. Pacovi su imunizovani HKM i PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 μg/ml) u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h. Apoptoza CD4⁺ ćelija je određivana fluorescentno obeleženim proteinom AnnV (A), a proliferacija imunofluorescentnim bojenjem proteina Ki-67 (B). Procenat ćelija koje ekspimiraju ove molekule je određivan metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest (A) ili tri (B) uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu apoptotičnih i proliferišućih ćelija je korišćen Studentov t-test.

4.1.3.3. Ispitivanje *in vitro* uticaja tretmana PERA/PEGA na procenat aktivisanih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM

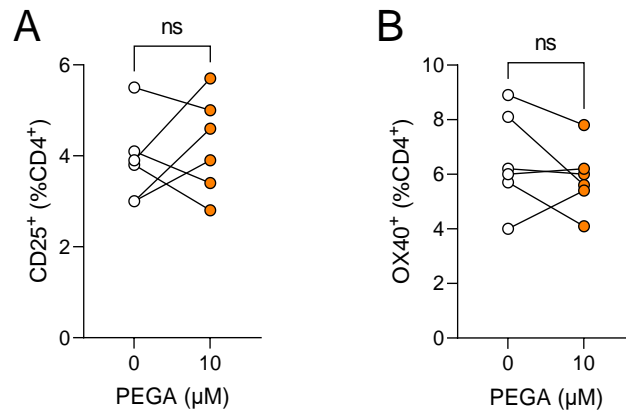
U cilju ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na markere aktivacije (CD25, OX40) ćelija izolovanih iz PLČ 6. d.n.i., životinje su imunizovane HKM. Ćelije PLČ su stimulisane MBP i tretirane PERA/PEGA. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 μM) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. Tretman ćelija PERA/PEGA (10 μM) nije promenio procentualnu zastupljenost CD25⁺ (Slika 12A, Slika 13A) i OX40⁺ (Slika 12B, Slika 13B) ćelija među CD4⁺ ćelijama PLČ. Dobijeni rezultati ukazuju da *in vitro* tretman PERA/PEGA ne utiče na zastupljenost aktivisanih CD4⁺ ćelija PLČ.



C



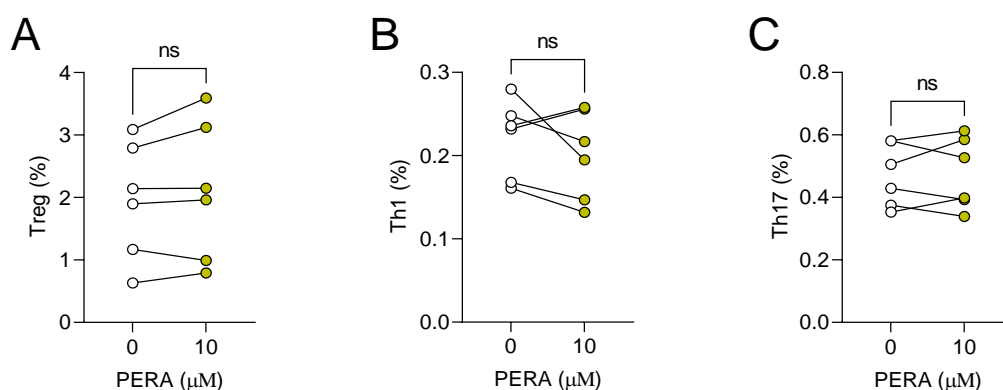
Slika 12. Efekat *in vitro* tretmana PERA na procenat aktivisanih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PERA (10 µM) u trajanju od 24 h. Procenat aktivisanih CD4⁺ ćelija je određen imunofluorescentnim obeležavanjem molekula CD25 (A) i OX40 (B) i metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru (C). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu aktivisanih ćelija je korišćen Studentov t-test.



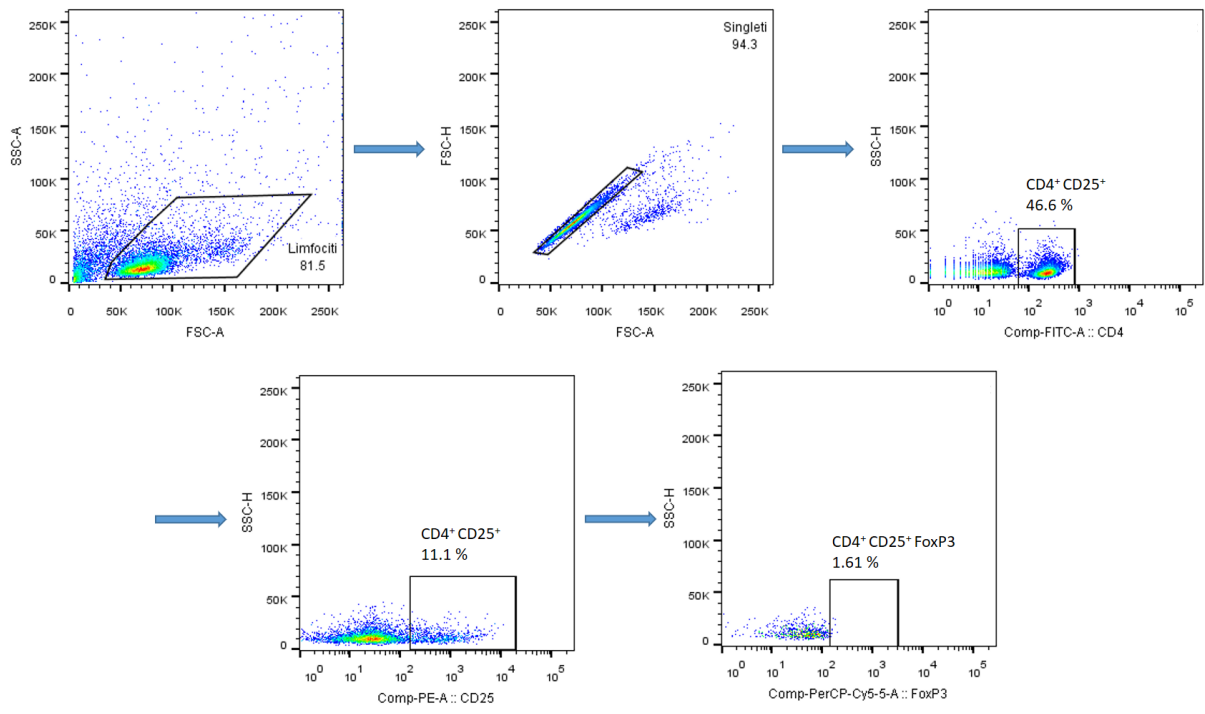
Slika 13. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na procenat aktivisanih CD4⁺ ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PEGA (10 µM) u trajanju od 24 h. Procenat aktivisanih CD4⁺ ćelija je određen imunofluorescentnim obeležavanjem molekula CD25 (A) i OX40 (B) i metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu aktivisanih ćelija je korišćen Studentov t-test.

4.1.3.4. Ispitivanje *in vitro* uticaja tretmana PERA/PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija među ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih HKM

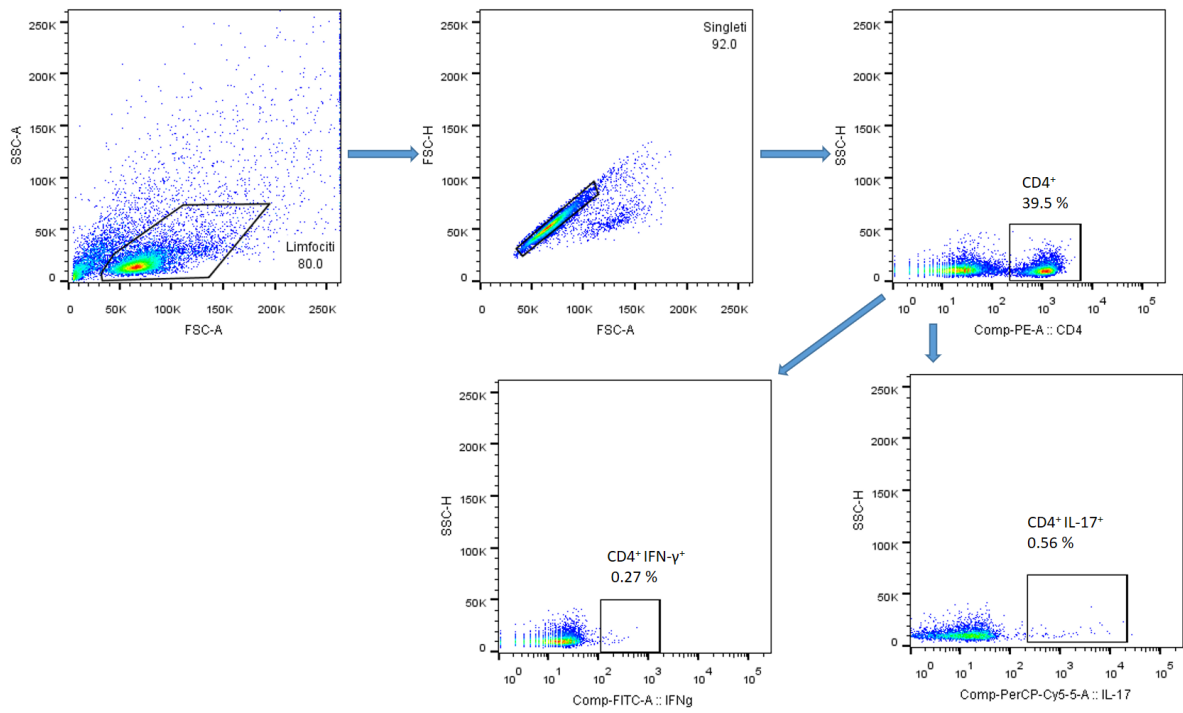
U cilju ispitivanja *in vitro* uticaja tretmana PERA/PEGA na procenat Treg (definisanih kao CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), Th1 (definisanih kao CD4⁺IFN-γ⁺) i Th17 (definisanih kao CD4⁺IL-17⁺) subpopulacija ćelija u okviru imunskih ćelija PLČ, životinje su imunizovane HKM, a PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije PLČ su stimulisane MBP i tretirane PERA/PEGA. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 µM) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. Ni PERA niti PEGA (10 µM) nije značajno promenio procentualnu zastupljenost Treg (Slika 14A, Slika 15A), Th1 (Slika 14B, Slika 15B) i Th17 (Slika 14C, Slika 15C) ćelija među ćelijama PLČ. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da PERA/PEGA ne utiče na udeo Treg, kao ni na Th1 i Th17 subpopulacije ćelija unutar ćelija PLČ *in vitro*.



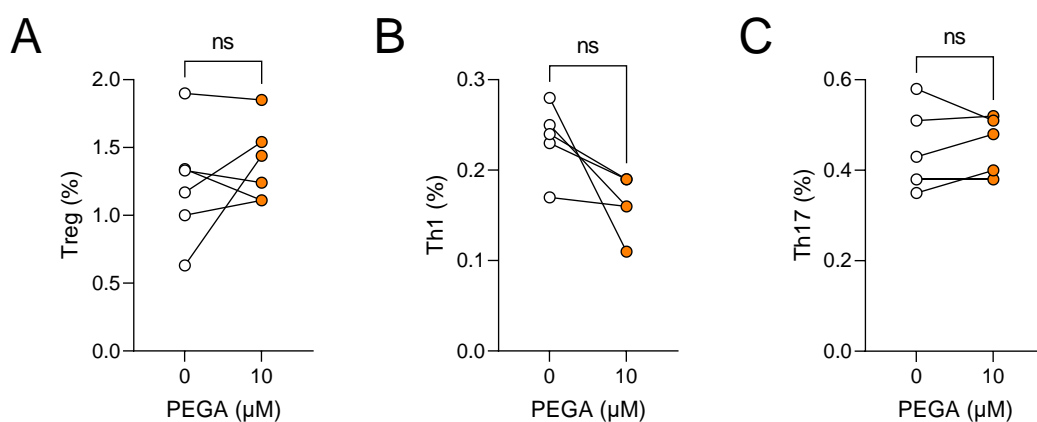
D



E



Slika 14. Efekat *in vitro* tretmana PERA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija među ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. U cilju određivanja procentualne zastupljenosti Treg ćelija, imunske ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PERA (10 µM) u trajanju od 24 h, nakon čega su pripremljene za analizu na protočnom citofluorimetru. Za potrebe određivanja udela Th1 i Th17 ćelijskih subpopulacija, ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PERA (10 µM) u trajanju od 24 h, nakon čega su stimulisane primenom komercijalnog koktela za stimulaciju u trajanju od 4 h i pripremljene za analizu na protočnom citofluorimetru. Treg (A) su definisane kao CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, Th1 (B) kao CD4⁺IFN-γ⁺, Th17 (C) kao CD4⁺IL-17⁺. Sve populacije su određene metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru za Treg (D), Th1 (E) i Th17 (E) ćelije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu Treg, Th1 i Th17 ćelija je korišćen Studentov t-test.

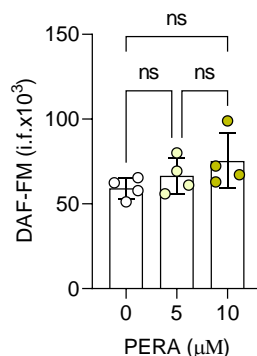


Slika 15. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija među ćelijama PLČ DA pacova imunizovanih HKM. Pacovi su imunizovani HKM, a PLČ su izolovani 6. d.n.i. Za određivanje procentualne zastupljenosti Treg ćelija, imunske ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PEGA (10 µM) u trajanju od 24 h. Za određivanje procentualne zastupljenosti Th1 i Th17 ćelijskih subpopulacija, imunske ćelije izolovane iz PLČ su stimulisane MBP (10 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PEGA (10 µM) u trajanju od 24 h, a zatim stimulisane primenom komercijalnog koktela za stimulaciju, 4 h pre bojenja fluorescentno obeleženim antitelima. Treg (A) su definisane kao CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, Th1 (B) kao CD4⁺IFN-γ⁺, Th17 (C) kao CD4⁺IL-17⁺. Sve populacije su određene metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu Treg, Th1 i Th17 ćelija je korišćen Studentov t-test.

4.1.4. Ispitivanje *in vitro* uticaja tretmana PERA/PEGA na sintezu NO od strane ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE

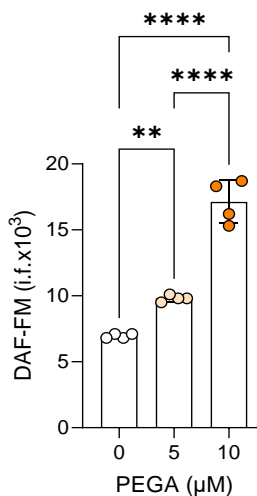
S obzirom na to da NO predstavlja važan signalni molekul u kontroli imunskog odgovora na nivou perifernog imunskog sistema (Willenborg i sar., 1999), ispitan je efekat PERA/PEGA na produkciju NO od strane imunskih ćelija PLČ DA pacova imunizovanih za EAE. Preliminarni rezultati su pokazali da je za dobijanje reprezentativnih podataka optimalno vreme inkubacije ćelija u prisustvu DAF-FM DA jedinjenja i tretmana bilo 20 h, zbog toga je ovo vreme inkubacije nadalje korišćeno za određivanje produkcije NO.

Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* tretmana PERA na produkciju NO u imunskim ćelijama PLČ, životinje su imunizovane HKM i PLČ su izolovani 6 d.n.i. Ćelije PLČ su stimulisane MBP i tretirane PERA. Tretman PERA (5 i 10 μM) je doveo do ograničenog povećanja koncentracije NO (Slika 16) od strane ćelija izolovanih iz PLČ u induktivnoj fazi bolesti (6. d.n.i).



Slika 16. Efekat *in vitro* tretmana PERA na sintezu NO od strane ćelija PLČ DA pacova imunizovanih HKM. PLČ su izolovani 6. d.n.i. Ćelije PLČ su stimulisane MBP (10 $\mu\text{g/ml}$) u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (5 i 10 μM) u trajanju od 20 h, dok je nivo NO detektovan upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog istovremeno uz tretman PERA. Intenzitet fluorescencije (i.f) je očitavan na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i $\text{SV} \pm \text{SD}$ četiri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorska analiza varijanse one-way (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

Da bi se ispitaio uticaj *in vitro* tretmana PEGA na produkciju NO na nivou PLČ životinje su imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ćelije PLČ su restimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ i tretirane PEGA. Tretman PEGA (5 i 10 μM) je doveo do značajnog povećanja koncentracije NO (Slika 17) produkovanog od strane ćelija izolovanih iz PLČ u induktivnoj fazi bolesti (6. d.n.i). Ovi rezultati ukazuju da PERA i PEGA dovode do povećanja koncentracije NO koji može ostvarivati imunosupresivni efekat na periferiji (Gold i sar., 1997).



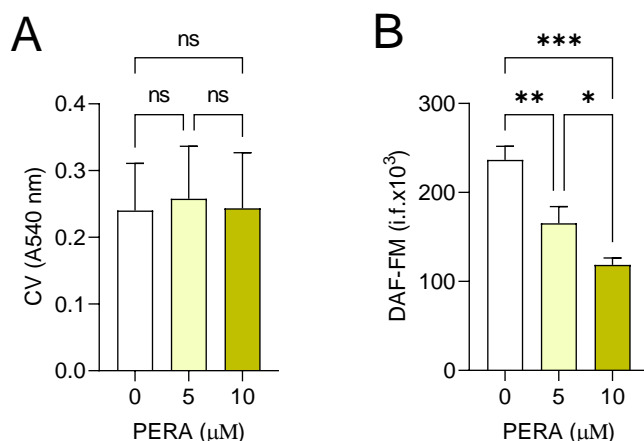
Slika 17. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na sintezu NO od strane ćelija PLČ DA pacova imunizovanih peptidom MOG₃₅₋₅₅. Pacovi su imunizovani peptidom MOG₃₅₋₅₅ (0,25 mg/ml) + CFA (5 mg/ml) (A). PLČ su izolovani 6. d.n.i., a ćelije PLČ su restimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (15 µg/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PEGA (5 i 10 µM) u trajanju od 20 h. Nivo NO je detektovan upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog istovremeno uz tretman PEGA. Intenzitet fluorescence (i.f) je očitana na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV±SD četiri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ** p < 0,01, **** p < 0,0001. Za određivanje statističke značajnosti razlika u nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.2. Imunomodulacijski efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na aktivirane BV2 ćelije mikroglije

Mikroglija ima značajnu ulogu u patogenezi EAE, kako zbog svoje uloge u prezentaciji antigena i reaktivaciji T-ćelija (Bogie i sar., 2014), tako i zbog oslobađanja neurotoksičnih i proinflamacijskih medijatora (NO, citokini, ROS) koji doprinose oštećenju nervnog tkiva i neurodegeneraciji (Cao i He, 2013). S tim u vezi, ispitan je efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na mišju ćelijsku liniju mikroglije BV2, i to na vijabilnost ovih ćelija, njihov aktivacioni status, fenotip i funkciju (sinteza NO i citokina IL-6 i TNF, produkcija ROS, fagocitoza i ekspresija molekula MHC II i kostimulatornog molekula CD86).

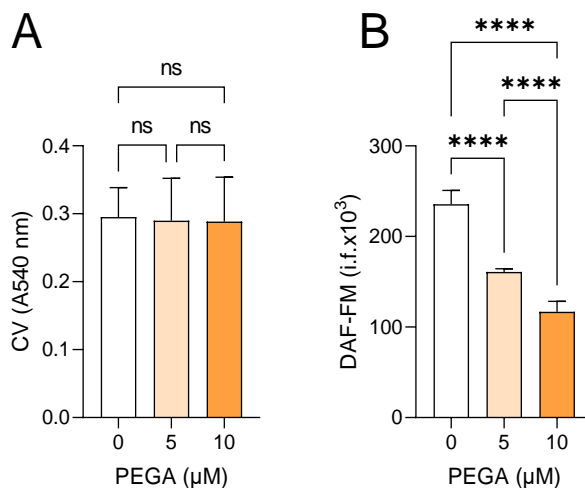
4.2.1. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na vijabilnost BV2 ćelija mikroglije i sintezu NO

Zbog značajne uloge mikroglije u produkciji proinflamacijskih medijatora poput NO u CNS tokom patogeneze EAE (Cao i He, 2013), ispitan je efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija mikroglije i sintezu NO, prethodno stimulisanih IFN-γ + LPS. Tretman PERA/PEGA (5 i 10 µM) nije značajno uticao na vijabilnost BV2 ćelija (Slika 18A, Slika 19A), ali je značajno smanjio sintezu NO (Slika 18B, Slika 19 B) od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije, u obe ispitane koncentracije. Ovi rezultati ukazuju da PERA i PEGA potencijalno mogu delovati antioksidativno, smanjujući sintezu NO u *in vitro* stimulisanim BV2 ćelijama mikroglije.



Slika 18. Efekat *in vitro* tretmana PERA na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija mikroglije i sintezu NO. BV2 ćelije su stimulisane IFN-γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 µM) ili prisustvu PERA (5 i 10 µM) u trajanju od 20 h. Vijabilnost ćelija je određena testom Crystal violet (CV) (A), a detektovanje nivoa NO je omogućeno upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog

istovremeno uz tretman (B). Intenzitet fluorescence (i.f) je očitana na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ šest (A) i tri (B) uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti BV2 ćelija mikroglije i nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

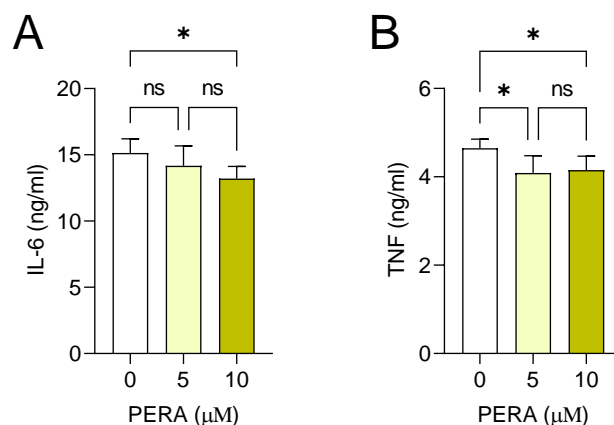


Slika 19. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija mikroglije i sintezu NO. BV2 ćelije su stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M), u trajanju od 20 h. Vijabilnost ćelija je određena testom Crystal violet (CV) (A), a detektovanje nivoa NO je omogućeno upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog istovremeno uz tretman (B). Intenzitet fluorescence (i.f) je očitana na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ osam (A) i šest (B) uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. **** $p < 0,0001$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti BV2 ćelija mikroglije i nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

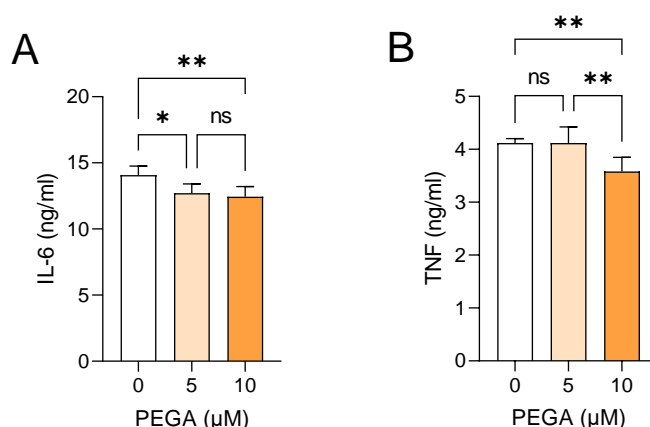
4.2.2. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na produkciju inflamacijskih citokina od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije

Pored NO, faktori koji doprinose neuroinflamaciji u EAE su proinflamacijski citokini IL-6 i TNF (Bogie i sar., 2014), čiji su glavni izvor, pored aktiviranih astrocita i neurona, i ćelije mikroglije (Ishijima i Nakajima, 2021; Welsler-Alves i Milner, 2013). Prema tome, bilo je važno ispitati efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na produkciju ovih citokina od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije.

BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA/PEGA na produkciju citokina IL-6 i TNF stimulisane IFN- γ + LPS i tretirane PERA/PEGA. Tretman sa PERA u koncentraciji od 10 μ M, ali ne i od 5 μ M, značajno je smanjio koncentraciju citokina IL-6 u supernatantima kulture aktiviranih BV2 ćelija (Slika 20A). S druge strane, tretman PERA je u obe ispitane koncentracije doveo do značajnog smanjenja koncentracije citokina TNF u supernatantima kulture aktiviranih BV2 ćelija (Slika 20B). Slično, tretman PEGA je u obe ispitane koncentracije smanjio koncentraciju IL-6 u supernatantima kulture aktiviranih BV2 ćelija (Slika 21A), dok je koncentraciju TNF značajno smanjila samo koncentracija PEGA od 10 μ M (Slika 21B).



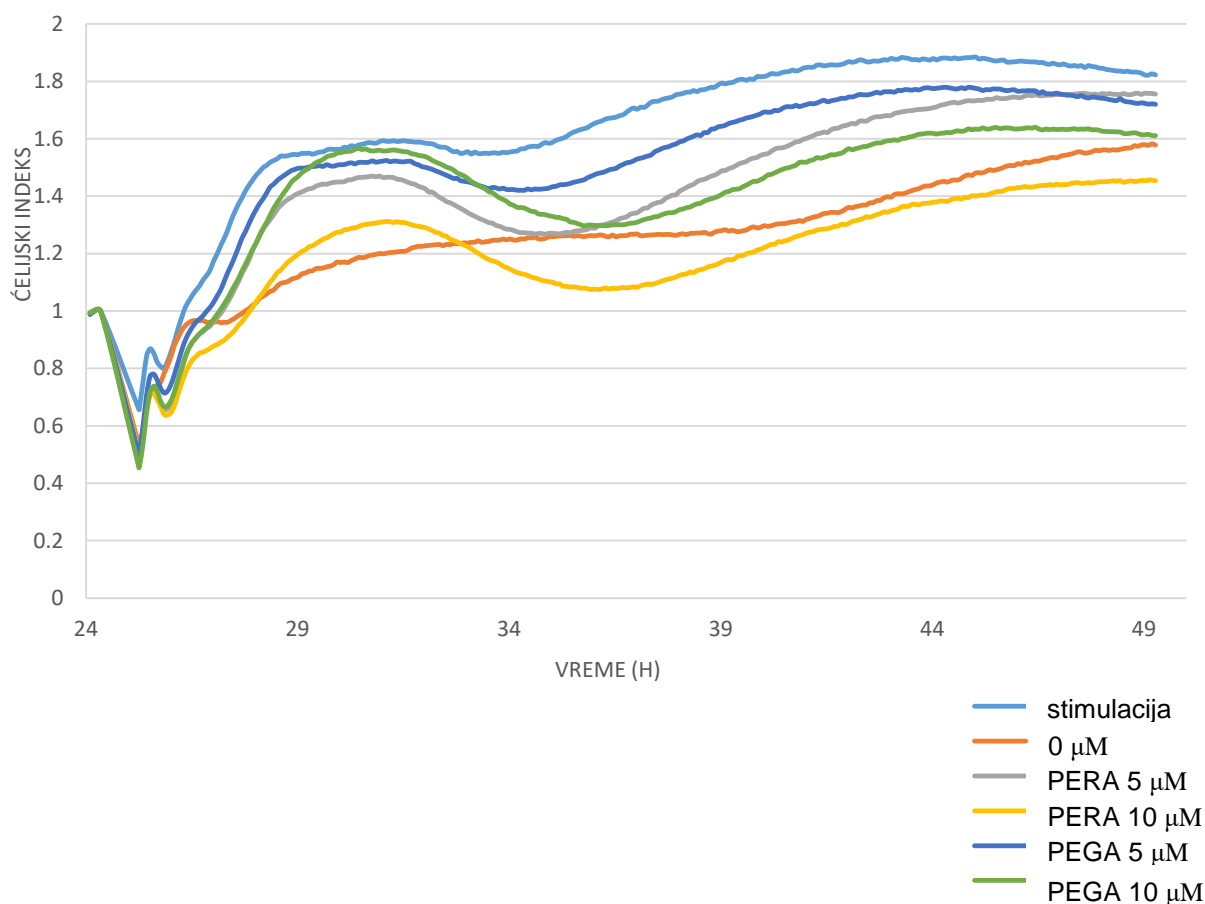
Slika 20. Efekat *in vitro* tretmana PERA na produkciju inflamacijskih citokina od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Koncentracija citokina IL-6 (A) i TNF (B) u supernatantima je određena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u produkciji proinflamacijskih citokina je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.



Slika 21. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na produkciju inflamacijskih citokina od strane aktiviranih BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Koncentracija citokina IL-6 (A) i TNF (B) u supernatantima je određena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u produkciji proinflamacijskih citokina je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.2.3. Ispitivanje *in vitro* uticaja tretmana PERA/PEGA na aktivaciju BV2 ćelija mikroglije

Promena sposobnosti adhezije ili interakcije adherentnih ćelija sa podlogom je detektovana kao promena otpora analizom ćelija u realnom vremenu (RTCA) i predstavljena je kao ćelijski indeks koji može biti indikator aktivacije BV2 ćelija (Otero-González i sar., 2012). BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA i PEGA na aktivaciju gajene u kulturi 24 h kako bi adherirale za podlogu, nakon čega su stimulisane IFN- γ + LPS i tretirane PERA/PEGA (5 i 10 μ M) tokom sledećih 24 h. Ćelijski indeks BV2 ćelija prema RTCA metodi je bio povećan usled stimulacije IFN- γ + LPS, ali je tretman PERA/PEGA stimulisanih ćelija doveo do smanjenja ovog indeksa (Slika 22). Prema navedenom, moglo bi se zaključiti da je, *in vitro* tretman PERA ili PEGA smanjio aktivaciju ćelija mikroglije.

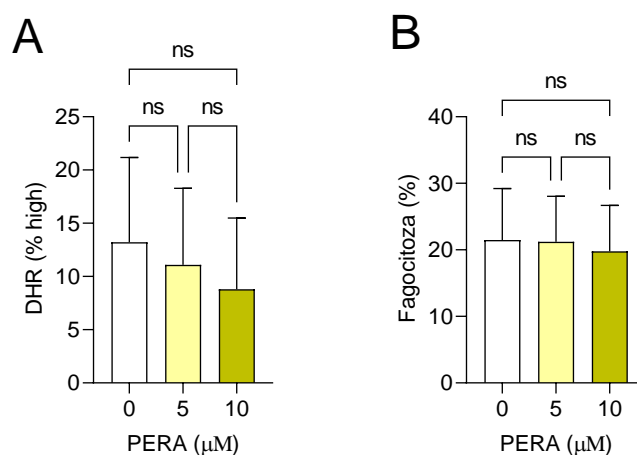


Slika 22. Efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na aktivaciju BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su gajene 24 h kako bi adherirale za podlogu, nakon toga su ćelije gajene samo u medijumu za kulturu ćelija (0 μ M), ili stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml), u odsustvu PERA/PEGA (stimulacija) ili prisustvu stimulacije i PERA/PEGA (PERA/PEGA 5 μ M, PERA/PEGA 10 μ M) u trajanju od 24 h. Merenje otpora (RTCA) je započeto u trenutku postavljanja ćelija u kulturu, trajalo je 24 h tokom gajenja ćelija u odsustvu stimulacije i tretmana PERA/PEGA, i naredna 24 h od momenta dodavanja stimulacije i PERA/PEGA.

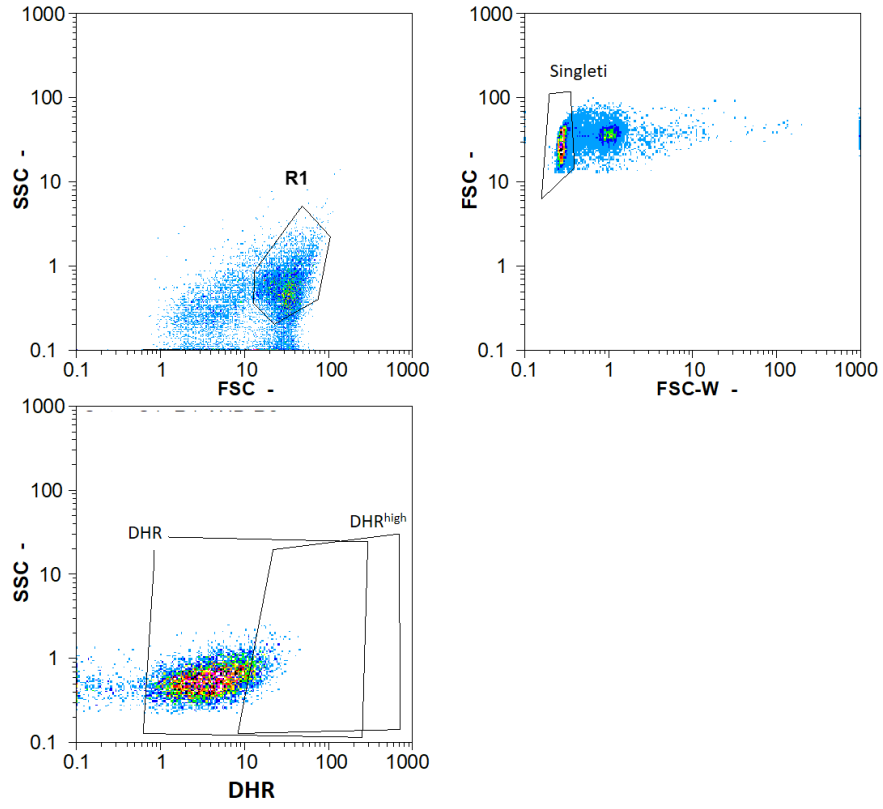
4.2.4. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na produkciju ROS i fagocitozu od strane BV2 ćelija mikroglije

S obzirom na to da ROS produkovane od mikroglije predstavljaju važne medijatore inflamacije i oštećenja nervnog tkiva u EAE (Lassmann i van Horssen, 2011), bilo je važno ispitati efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na produkciju ROS od strane BV2 ćelija. Pored toga, zbog uloge mikroglije u prezentaciji antigena T-ćelijama (Bogie i sar., 2014), kao i uklanjanju debrisa u CNS, ispitan je efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na sposobnost fagocitoze fluorescentno obeleženih kuglica od lateksa od strane BV2 ćelija.

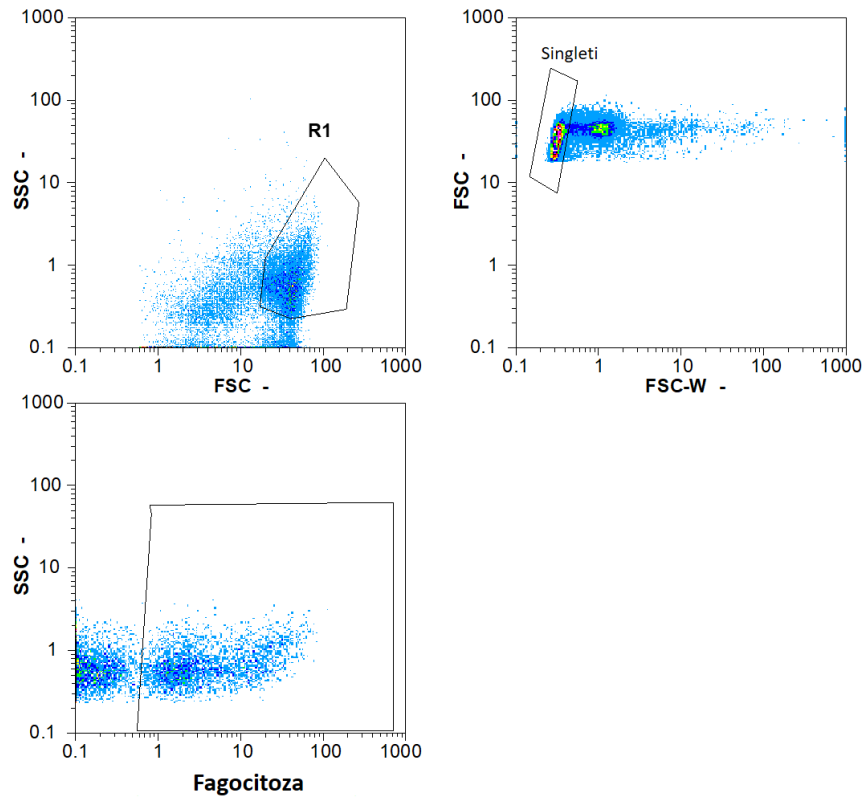
BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA/PEGA na produkciju ROS pretretirane PERA/PEGA u trajanju od 24 h. Nakon toga, ćelije su preinkubirane u prisustvu DHR i PERA/PEGA u trajanju od 20 min. Zatim su ćelije su narednih 1,5 h stimulisane LPS (100 ng/ml) u prisustvu PERA/PEGA. Određivanje nivoa ROS je omogućeno svojstvom DHR boje da slobodno ulazi u ćelije i u interakciji sa intracelularnim ROS dovodi do stvaranja oksidisanе forme rodamina koji fluorescira zeleno (Qin i sar., 2007). Dobijeni rezultati ukazuju da tretman PERA/PEGA (5 i 10 μM) nije značajno uticao na produkciju ROS u BV2 ćelijama (Slika 23A, Slika 24A). S druge strane, BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA/PEGA na fagocitozu stimulisane IFN- γ + LPS i tretirane PERA/PEGA. PERA/PEGA (5 i 10 μM) nije ostvario značajan uticaj na fagocitozu kuglica od lateksa (Slika 23B, Slika 24B).



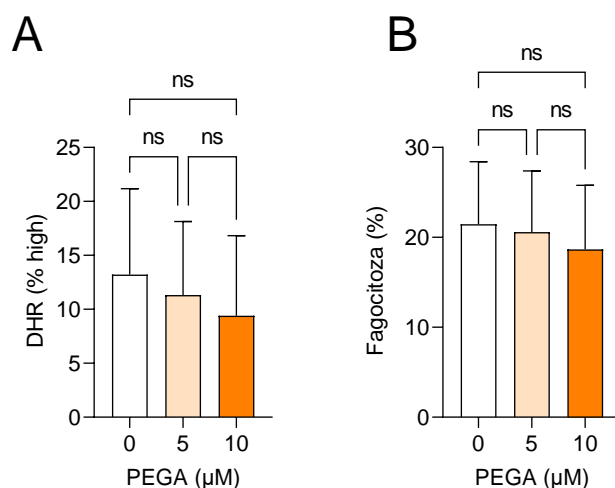
C



D



Slika 23. Efekat *in vitro* tretmana PERA na produkciju ROS i fagocitozu od strane BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA na produkciju ROS gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (5 i 10 μM) u trajanju od 24 h. Nakon toga, ćelije su inkubirane u prisustvu DHR i u trajanju od 20 min. Zatim su ćelije narednih 1,5 h stimulirane LPS (100 ng/ml). Produkcija ROS je određena koršćenjem fluorescentne boje DHR (A) i izražena je kao procenat ćelija sa visokom ekspresijom DHR boje (DHR^{high}). BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA na fagocitozu stimulirane IFN- γ (10 ng/ml) i LPS (10 ng/ml), u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (5 i 10 μM), u trajanju od 24h. Nakon toga, ćelijama je dodat rastvor fluorescentno obeleženih kuglica od lateksa za fagocitozu (2 μl kuglica u rastvor 50% FCS PBS). Ćelije su zatim inkubirane 1 h u ovom rastvoru. Fagocitoza od strane BV2 ćelija je izražena kao procentualna zastupljenost ćelija koje vrše fagocitozu fluorescentnih kuglica od lateksa (kuglice+ćelije) (B). Sve populacije ćelija su određene metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru, za DHR^{high} ćelije (C) i ćelije koje vrše fagocitozu (kuglice+ ćelije) (D). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu DHR^{high} i ćelija koje vrše fagocitozu je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

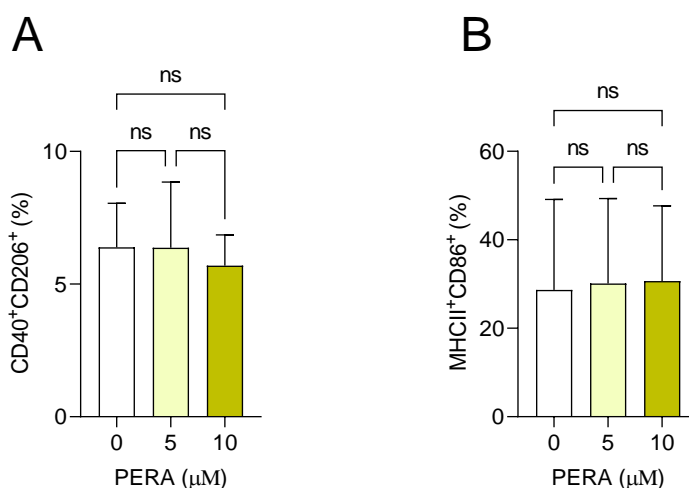


Slika 24. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na produkciju ROS i fagocitozu od strane BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PEGA na produkciju ROS gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu (5 i 10 μM) PEGA u trajanju od 24 h. Nakon toga, ćelije su preinkubirane u prisustvu DHR i u odsustvu (0 μM) ili prisustvu (5 i 10 μM) PEGA u trajanju od 20 min. Zatim su ćelije narednih 1,5 h stimulirane LPS (100 ng/ml). Produkcija ROS je određena koršćenjem DHR (A) i izražena je kao procenat ćelija sa visokom ekspresijom DHR boje (DHR^{high}). BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PEGA na fagocitozu stimulirane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μM) ili prisustvu (5 i 10 μM) PEGA, u trajanju od 24h. Nakon toga, ćelijama je dodat rastvor fluorescentno obeleženih kuglica od lateksa za fagocitozu (2 μl kuglica u rastvor 50% FCS PBS). Ćelije su zatim inkubirane 1 h u ovom rastvoru. Fagocitoza od strane BV2 ćelija je izražena kao procentualna zastupljenost ćelija koje vrše fagocitozu fluorescentnih kuglica od lateksa (kuglice+ćelije) (B). Sve populacije ćelija su određene metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru, za DHR^{high} ćelije (C) i ćelije koje vrše fagocitozu (kuglice+ ćelije) (D). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD tri (A) i šest (B) uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu DHR^{high} i ćelija koje vrše fagocitozu je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

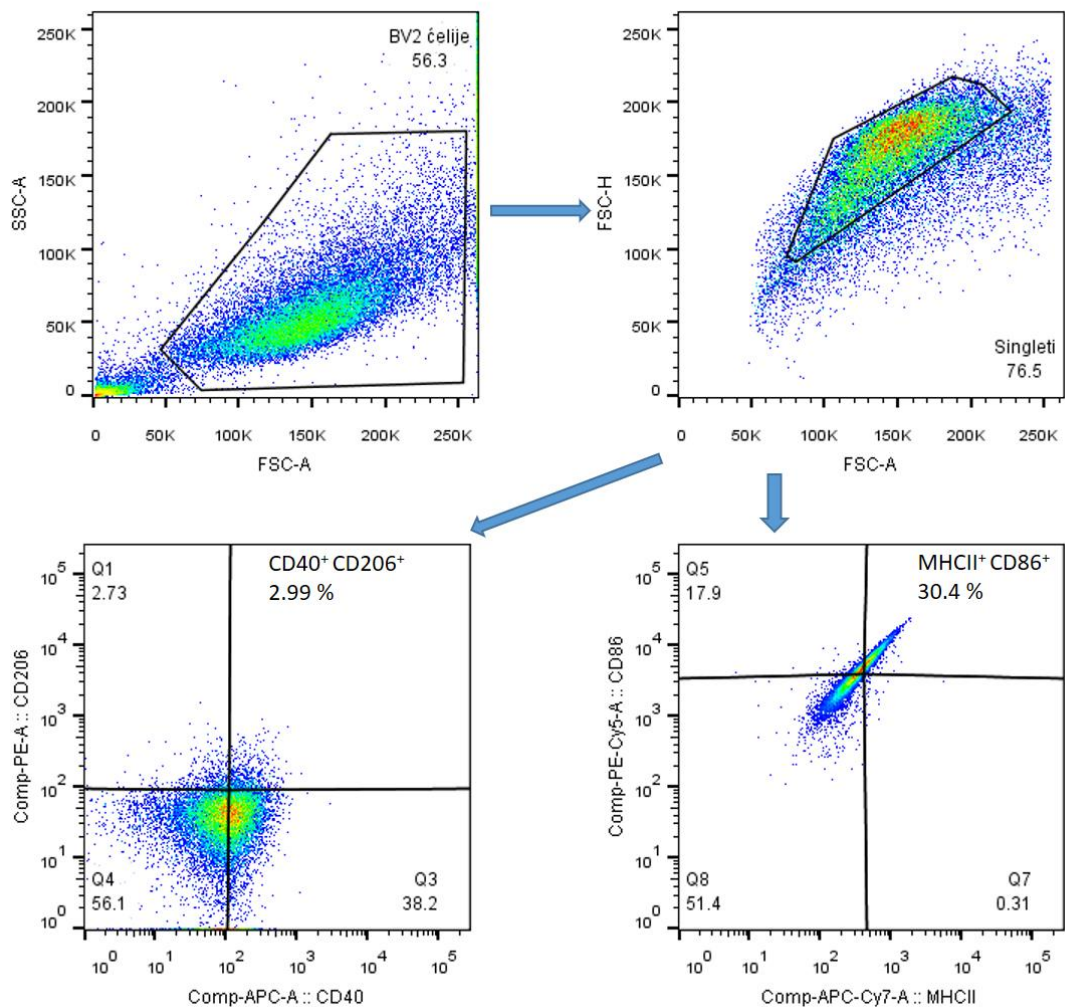
4.2.5. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na fenotipske karakteristike aktiviranih BV2 ćelija mikroglije

Pored sposobnosti fagocitoze u kontekstu prezentacije antigena T-ćelijama, bilo je važno ispitati efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na ekspresiju MHC II molekula koji učestvuje u prezentaciji antigena i CD86 molekula koji učestvuje u kostimulaciji T-ćelija (Lynch, 2009), kao i molekula CD40 koji učestvuje u infiltraciji leukocita u CNS tokom patogeneze EAE (Becher i sar., 2001). Pored toga, ispitan je i uticaj PERA/PEGA na uspostavljanje antiinflamacijskog fenotipa BV2 ćelija. M1 fenotip mikroglije je karakterističan za akutnu fazu neuroinflamacije i ogleda se povećanom produkcijom proinflamacijskih citokina i ekspresijom kostimulatornih i antigen-prezentujućih molekula (Bogie i sar., 2014), s druge strane, M2 fenotip dominira u kasnijoj fazi neuroinflamacije i karakteriše ga produkcija antiinflamacijskih citokina i ekspresija molekula CD206 (Chu i sar., 2018).

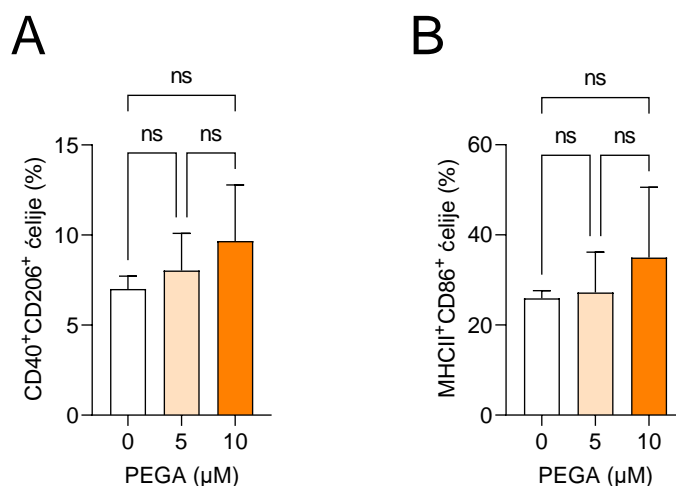
BV2 ćelije su za potrebe ispitivanja uticaja PERA/PEGA na fenotipske karakteristike stimulusane IFN- γ + LPS i tretirane PERA/PEGA. Efekat PERA/PEGA (5 i 10 μ M) na udeo ćelija sa M2 fenotipom (procentualna zastupljenost CD40⁺CD206⁺ ćelija) (Slika 25A, Slika 26A) BV2 ćelija je izostao, kao i na udeo MHCII⁺CD86⁺ ćelija (Slika 25B, 26B) unutar BV2 ćelija. Rezultati ukazuju da PERA/PEGA nije ostvario značajan efekat na fenotipske karakteristike BV2 ćelija mikroglije u ispitivanim uslovima.



C



Slika 25. Efekat *in vitro* tretmana PERA na fenotipske karakteristike aktiviranih BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Procentualna zastupljenost ćelija sa M2 fenotipom (A) i udeo ćelija koje ekspiriraju MHCII i CD86 (B) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru (C). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu CD40⁺CD206⁺ i MHCII⁺CD86⁺ ćelija je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.



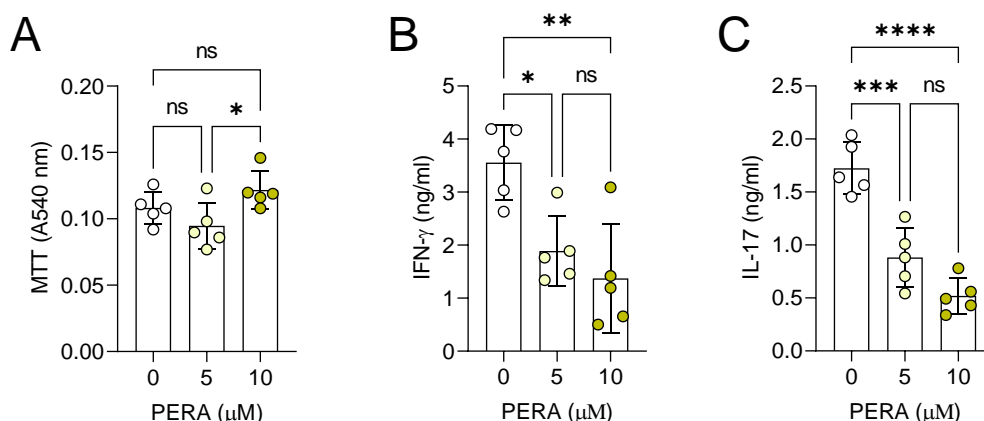
Slika 26. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na fenotipske karakteristike aktiviranih BV2 ćelija mikroglije. BV2 ćelije su stimulisane IFN- γ (10 ng/ml) + LPS (10 ng/ml) u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M) u trajanju od 24 h. Procentualna zastupljenost ćelija sa M2 fenotipom (A) i udeo ćelija koje ekspimiraju molekul MHCII i molekul CD86 (B) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, predstavlja promenu koja nije statistički značajna. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu CD40⁺CD206⁺ i MHCII⁺CD86⁺ ćelija je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.3. Imunomodulacijski efekat *in vitro* tretmana PERA/PEGA na SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

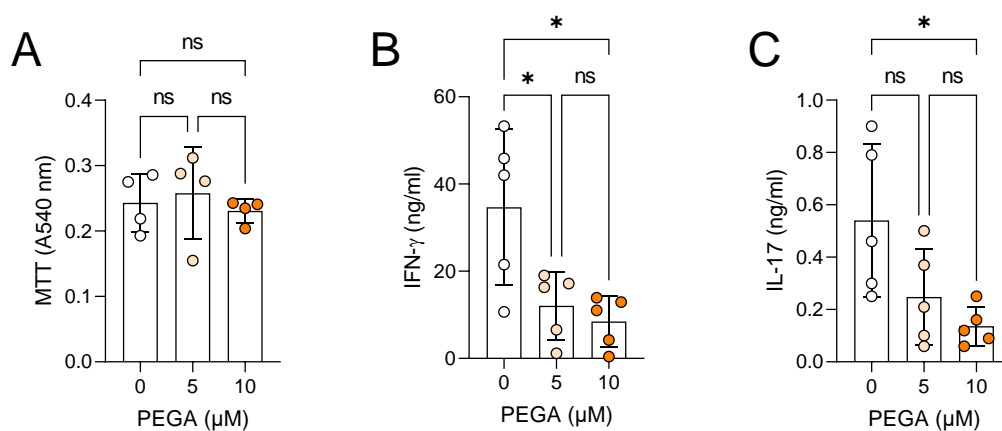
U nastavku istraživanja, ispitan je uticaj *in vitro* tretmana PERA/PEGA na SCIC u EAE. SCIC imaju ključnu ulogu u razvoju i progresiji EAE, a to ostvaruju kroz inflamacijski odgovor, demijelinizaciju i oštećenje tkiva CNS (Balasa i sar., 2020). Prema tome, ispitan je *in vitro* efekat PERA/PEGA na produkciju encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17 od strane ovih ćelija. Imajući u vidu da CD4⁺ ćelije predstavljaju dominantnu populaciju ćelija koja infiltrira CNS, izvršeno je i ispitivanje uticaja PERA/PEGA na apoptozu (procenat AnnV⁺ ćelija) i reaktivaciju (procenat CD25⁺ i OX40⁺ ćelija) CD4⁺ ćelija. Takođe, utvrđen je i uticaj PERA/PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija u SCIC.

4.3.1. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na vijabilnost i produkciju citokina SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

U cilju ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na SCIC, životinje su imunizovane HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i., odnosno na vrhuncu bolesti, i tretirane PERA/PEGA. Tretman PERA/PEGA nije ostvario uticaj na vijabilnost SCIC (Slika 27A, Slika 28A). Međutim, tretman PERA i PEGA je doveo do značajnog snižavanja koncentracije citokina IFN- γ (Slika 27B, Slika 28B) i IL-17 (Slika 27C, Slika 28C) u supernatantima kulture SCIC. Dakle, ovi rezultati pokazuju da PERA i PEGA (5 i 10 μ M) smanjuju patogeni potencijal SCIC.



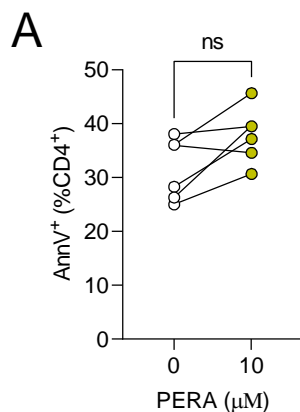
Slika 27. Efekat *in vitro* tretmana PERA na vijabilnost i produkciju citokina od SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Ćelije su gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (5 i 10 μM) u trajanju od 24 h. Nakon toga, urađen je test MTT (A) za procenu vijabilnosti SCIC, dok je u supernatantima ćelijskih kultura određena koncentracija citokina IFN-γ (B) i IL-17 (C) metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV±SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti i produkciji citokina korišćena je jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.



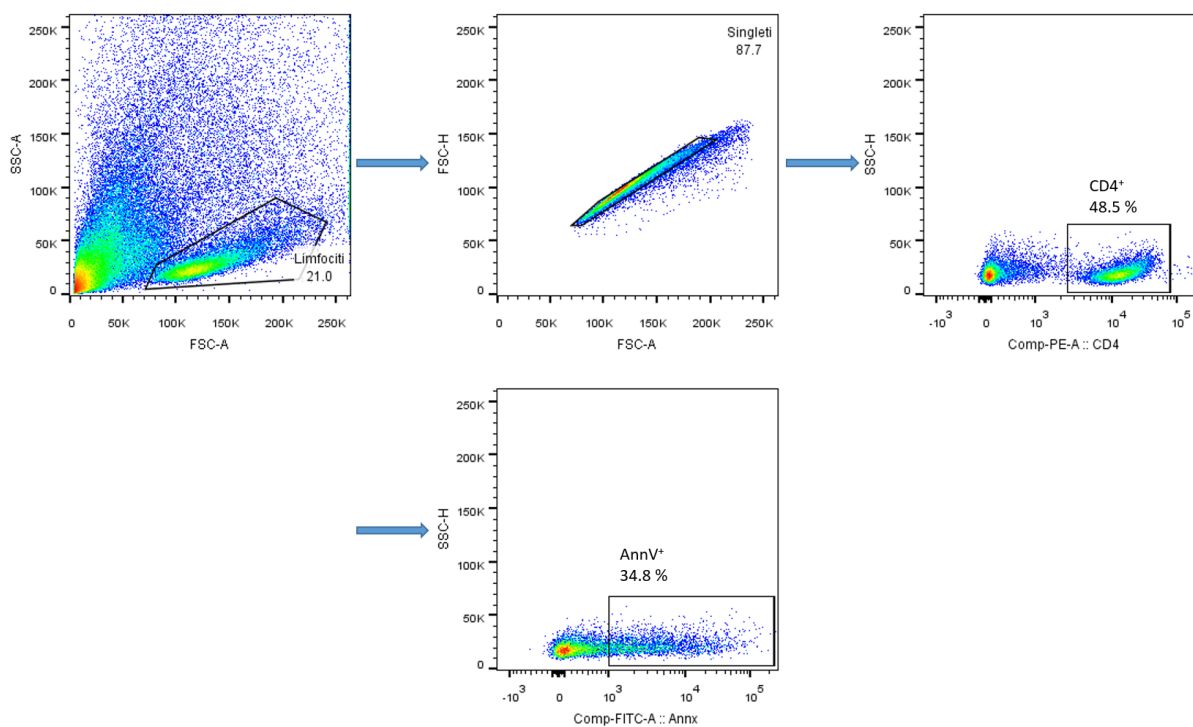
Slika 28. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na vijabilnost i produkciju citokina SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Ćelije su gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μM) u trajanju od 24 h. Nakon toga, urađen je test MTT (A) za procenu vijabilnosti SCIC, dok je u supernatantima ćelijskih kultura određena koncentracija citokina IFN-γ (B) i IL-17 (C) metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV±SD pet uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * p < 0,05. Za određivanje statističke značajnosti razlika u vijabilnosti i produkciji citokina korišćena je jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.3.2. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na procenat apoptotičnih CD4⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

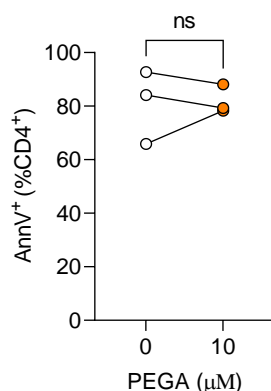
Da bi ispitali uticaj *in vitro* tretmana PERA/PEGA na procenat apoptotičnih CD4⁺ ćelija unutar SCIC izolovanih na vrhuncu bolesti (11. d.n.i), životinje su imunizovane HKM. Ćelije su tretirane PERA/PEGA. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 μ M) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. Tretman PERA/PEGA (10 μ M) nije doveo do statistički značajne promene u udelu AnnV⁺ među CD4⁺ ćelijama (Slika 29A, Slika 30). Ovaj rezultat ukazuje da PERA i PEGA ne ostvaruju značajan efekat na apoptozu CD4⁺ ćelija unutar SCIC.



B



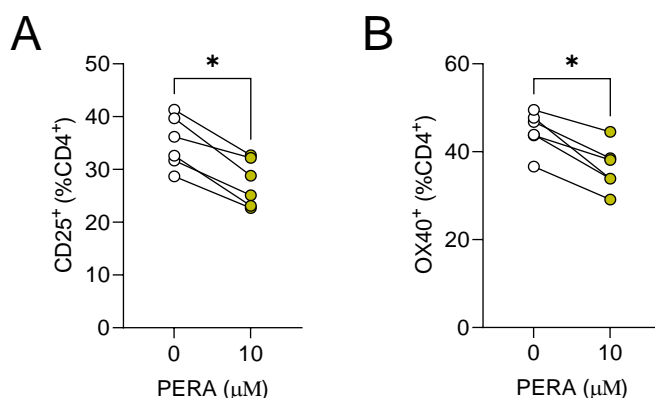
Slika 29. Efekat *in vitro* tretmana PERA na procenat apoptotičnih CD4⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. i gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (10 μM) u trajanju od 24 h. Apoptoza je određena detekcijom AnnV⁺ među CD4⁺ ćelijama protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su plotovi strategije ograničavanja populacija ćelija od interesa dobijeni analizom na protočnom citofluorimetru (B). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu apoptotičnih ćelija je korišćen Studentov t-test.



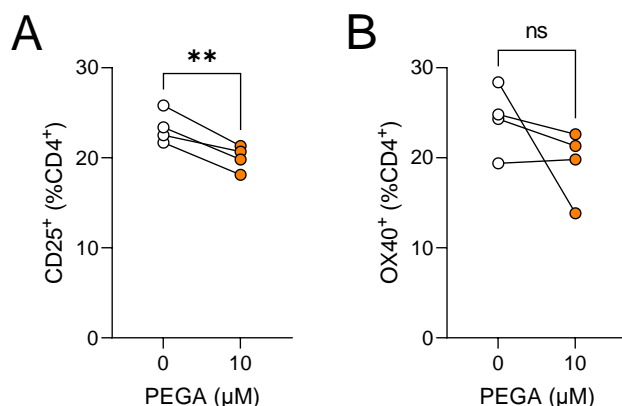
Slika 30. . Efekat *in vitro* tretmana PEGA na apoptozu CD4⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. i gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h. Apoptoza je određena detekcijom AnnV⁺ među CD4⁺ ćelijama protočnom citofluorimetrijom. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu apoptotičnih ćelija je korišćen Studentov t-test.

4.3.3. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na procenat reaktivisanih CD4⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

Da bi ispitali uticaj *in vitro* tretmana PERA/PEGA na procenat reaktivisanih CD4⁺ ćelija unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu bolesti (11. d.n.i), životinje su imunizovane HKM. SCIC su tretirane PERA ili PEGA. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana je koncentracija PERA/PEGA (10 μM) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. Tretman PERA/PEGA (10 μM) je doveo do značajnog smanjenja procentualne zastupljenosti CD25⁺ (Slika 31A, 32A) ćelija u okviru CD4⁺ ćelija populacije SCIC. Takođe, PERA je doveo i do značajnog smanjenja procentualne zastupljenosti OX40⁺ (Slika 31B) ćelija među CD4⁺ ćelijama, dok PEGA nije doveo do značajne promene procentualne zastupljenosti OX40⁺ (Slika 32B) ćelija unutar CD4⁺ ćelija SCIC. Dakle, PERA i PEGA smanjuju udeo reaktivisanih CD4⁺ ćelija unutar SCIC izolovanih na vrhuncu EAE kod DA pacova.



Slika 31. Efekat *in vitro* tretmana PERA na procenat reaktivisanih CD4⁺ ćelija (CD25⁺, OX40⁺ ćelije) unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. i gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (10 μM) u trajanju od 24 h. Udeo ćelija koje ekspimiraju CD25 (A) i OX40 (B) u okviru CD4⁺ ćelija SCIC je određen metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. * p < 0,05. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu aktivisanih ćelija je korišćen Studentov t-test.

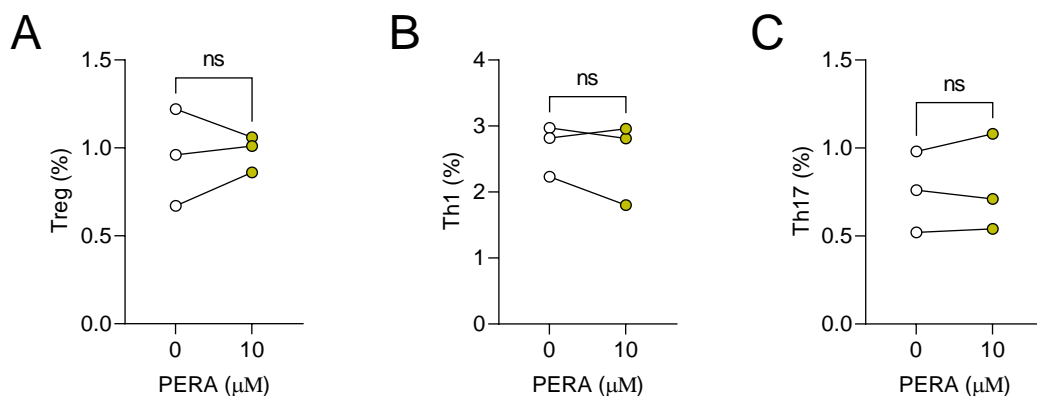


Slika 32. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na procenat reaktivisanih CD4⁺ ćelija (CD25⁺, OX40⁺ ćelije) unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. i gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h. Udeo ćelija koje ekspimiraju CD25 (A) i OX40 (B) u okviru CD4⁺ ćelija SCIC je određen metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti četiri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. ** p < 0,01. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu aktivisanih ćelija je korišćen Studentov t-test.

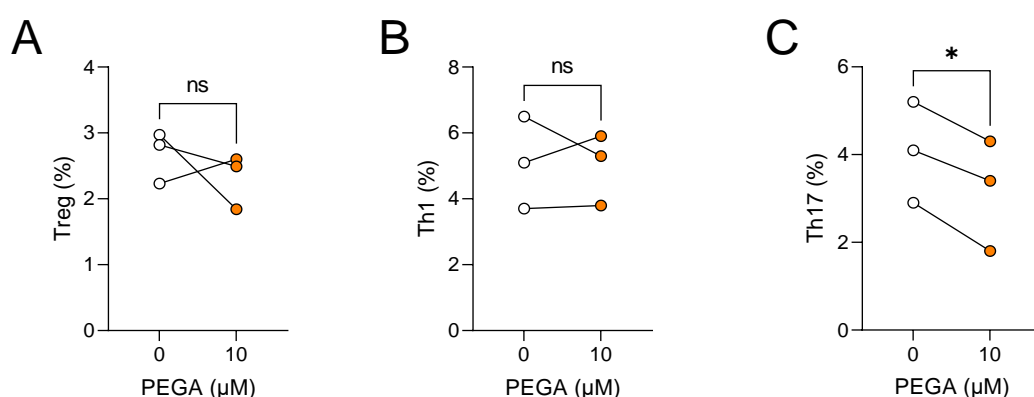
4.3.4. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija unutar populacije SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

U cilju ispitivanja uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na udeo Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), Th1 (CD4⁺IFN-γ⁺) i Th17 (CD4⁺IL-17⁺) subpopulacija ćelija unutar SCIC, životinje su imunizovane HKM, a SCIC su izolovane 11. d.n.i. Ćelije su tretirane PERA ili PEGA, bez dodatne stimulacije za određivanje Treg populacije ćelija, ili su nakon toga stimulisane 4 h komercijalnim koktelom za stimulaciju ćelija za određivanje Th1 i Th17 ćelija. Takođe, za potrebe ovog eksperimenta odabrana

je koncentracija PERA/PEGA (10 μM) sa izraženijim imunomodulacijskim efektom, a koja nije ostvarila značajan uticaj na vijabilnost ćelija. PERA (10 μM) nije značajno promenio procentualnu zastupljenost Treg (Slika 33A), Th1 (Slika 33B) i Th17 (Slika 33C) ćelija među ćelijama SCIC. PEGA (10 μM) nije promenio značajno procentualnu zastupljenost Treg (Slika 34A) i Th1 (Slika 34B) ćelija, dok je značajno smanjio procentualnu zastupljenost Th17 (Slika 34C) ćelija unutar SCIC. Ovi rezultati ukazuju da PERA ne utiče na udeo Treg, kao ni na Th1 i Th17 subpopulacije ćelija unutar SCIC, dok PEGA selektivno smanjuje udeo Th17 ćelija u SCIC, *in vitro*.



Slika 33. Efekat *in vitro* tretmana PERA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Za određivanje procenta Treg, SCIC su gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (10 μM) u trajanju od 24 h, bez dodatne stimulacije. Za određivanje procenta Th1 i Th17, SCIC su gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PERA (10 μM) u trajanju od 24 h, a nakon toga stimulisane 4 h komercijalnim koktelom za stimulaciju ćelija. Treg (A) su definisane kao $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, Th1 kao $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ i Th17 kao $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ ćelije. Populacije su određene metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu Treg, Th1 i Th17 ćelija je korišćen Studentov t-test.

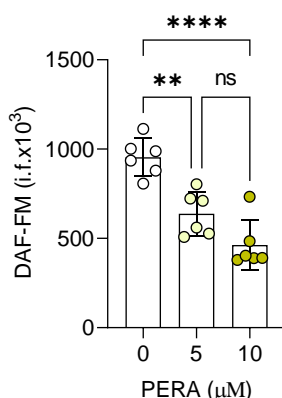


Slika 34. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija unutar populacije SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Pacovi su imunizovani HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Za određivanje procenta Treg, SCIC su gajene u odsustvu (0 μM) ili prisustvu PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h, bez dodatne stimulacije. Za određivanje procenta Th1 i Th17, SCIC su gajene u odsustvu (0) ili prisustvu PEGA (10 μM) u trajanju od 24 h, a nakon toga stimulisane 4 h pre bojenja komercijalnim koktelom za stimulaciju ćelija. Treg (A) su definisane kao $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, Th1

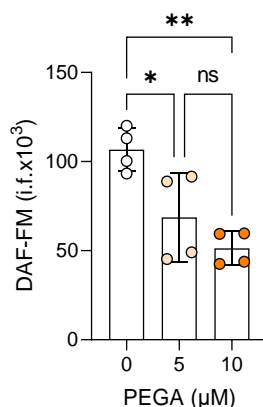
kao CD4⁺IFN- γ ⁺ i Th17 kao CD4⁺IL-17⁺ ćelije. Populacije ćelija su određene metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti tri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * p < 0,05. Za određivanje statističke značajnosti razlika u procentu Treg, Th1 i Th17 ćelija je korišćen Studentov t-test.

4.3.5. Ispitivanje uticaja *in vitro* tretmana PERA/PEGA na sintezu NO od strane SCIC izolovanih iz DA pacova na vrhuncu EAE

Da bi se ispitao uticaj *in vitro* tretmana PERA/PEGA na produkciju NO od strane SCIC, životinje su imunizovane HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. i tretirane PERA ili PEGA. Pokazano je da je tretman PERA/PEGA, u obe ispitane koncentracije (5 i 10 μ M), doveo do značajnog smanjenja koncentracije NO u SCIC (Slika 35, Slika 36). Ovi rezultati ukazuju da PERA i PEGA potencijalno ostvaruju antioksidativnu zaštitu smanjenjem nivoa sintetisanog NO u SCIC, *in vitro*.



Slika 35. Efekat *in vitro* tretmana PERA na sintezu NO od strane SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Životinje su imunizovane HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Ćelije su gajene u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PERA (5 i 10 μ M) u trajanju od 20 h. Nivo NO je detektovan upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog istovremeno uz tretman PERA. Intenzitet fluorescence (i.f) je očitao na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i SV \pm SD šest uzoraka, iz tri nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. ** p < 0,01, **** p < 0,0001. Za određivanje statističke značajnosti razlika u nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.



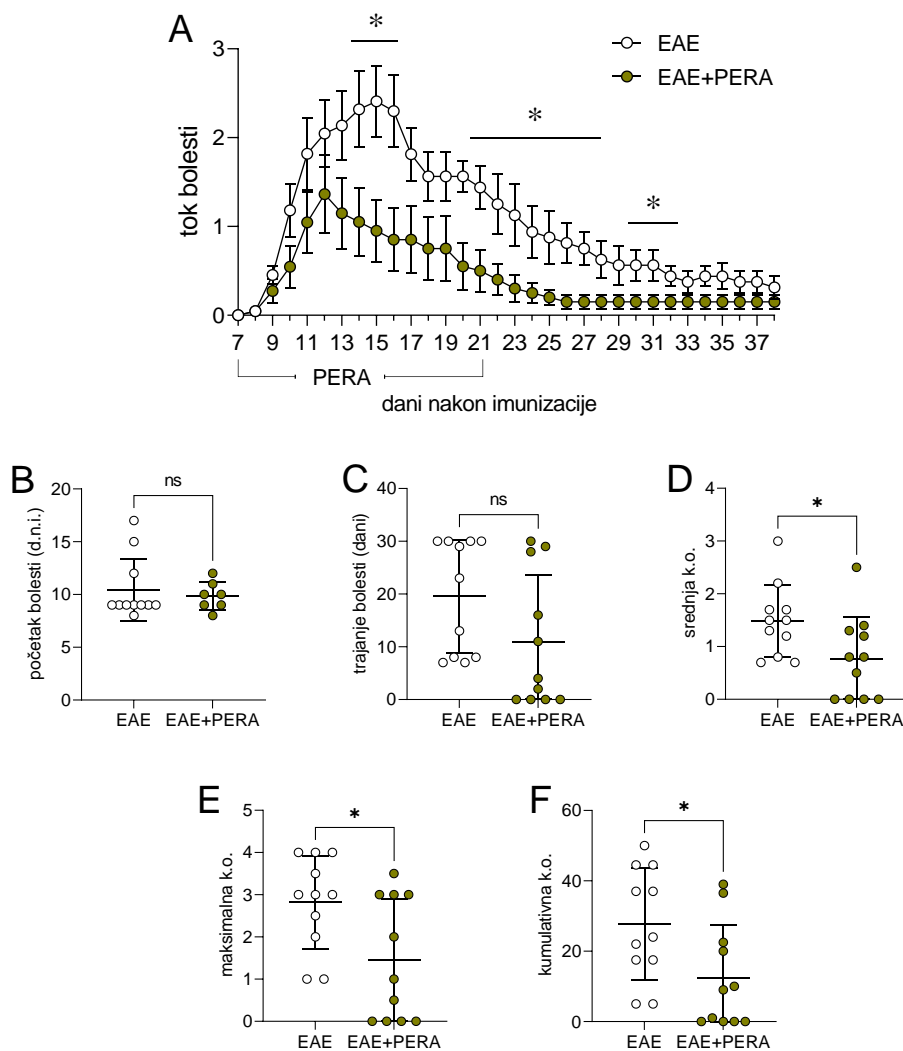
Slika 36. Efekat *in vitro* tretmana PEGA na sintezu NO od strane SCIC izolovanih na vrhuncu EAE. Životinje su imunizovane HKM. SCIC su izolovane 11. d.n.i. Čelije su gajene u odsustvu (0 μ M) ili prisustvu PEGA (5 i 10 μ M) u trajanju od 20 h. Nivo NO je detektovan upotrebom DAF-FM DA jedinjenja dodatog istovremeno uz tretman PEGA. Intenzitet fluorescence (i.f) je očitao na Synergy H1 čitaču mikroploča. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i $SV \pm SD$ četiri uzorka, iz tri nezavisna eksperimenta ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u nivou sintetisanog NO je korišćena jednofaktorijalna univarijaciona analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom za post hoc poređenje.

4.4. Efekat tretmana PERA/PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE indukovanog kod DA pacova

Nakon ustanovljenih imunoregulatornih dejstava *in vitro* tretmana PERA/PEGA na ćelije PLČ, BV2 ćelije i SCIC, ispitan je efekat *in vivo* tretmana ovim jedinjenjima na tok bolesti i na težinu neurološkog deficita u EAE.

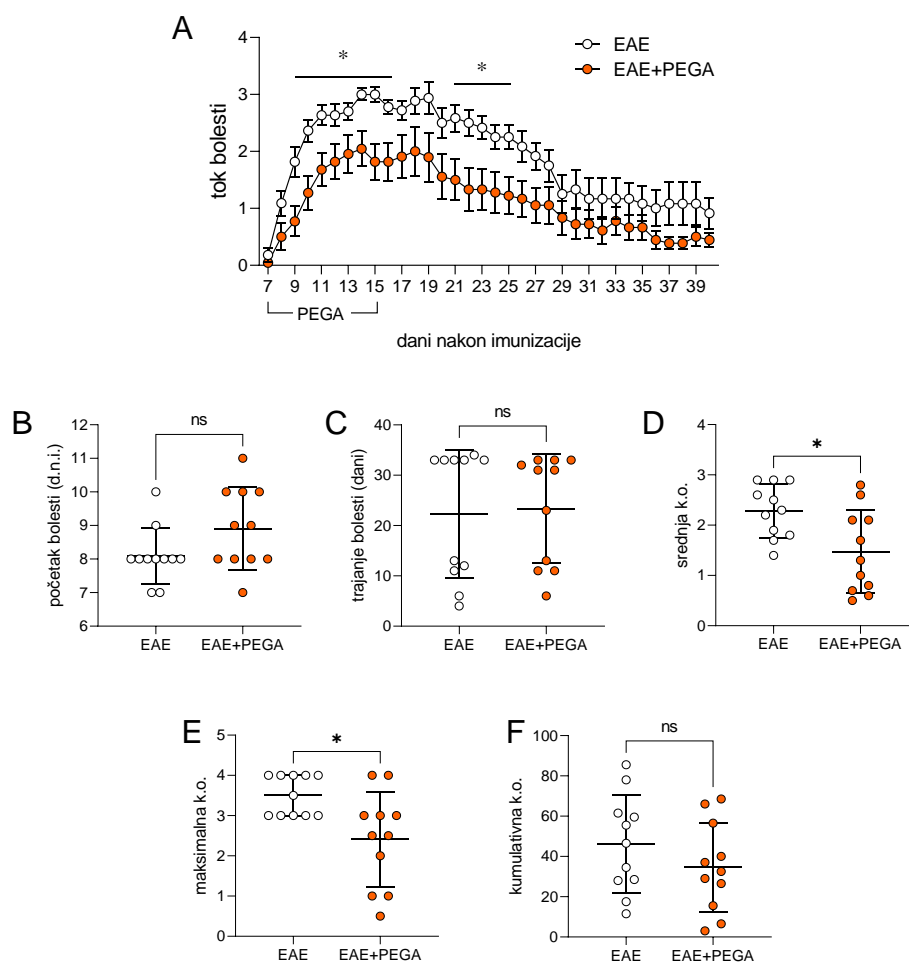
4.4.1. Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE indukovanog kod DA pacova

U cilju ispitivanja efekta PERA na kliničku sliku EAE, pacovi su imunizovani HKM. Subkutana aplikacija tretmana u donji deo leđa je započeta 7. d.n.i. i trajala je narednih 15 dana. Paralelno sa tretmanom životinja PERA (EAE + PERA), kontrolne životinje (EAE) su primale kontrolni rastvor. PERA je rastvoren u DMSO i dodatno u susamovom ulju do radnog rastvora, dok je kontrolni rastvor sadržao DMSO u susamovom ulju. Tok bolesti je praćen svakodnevno do 40. d.n.i. (Slika 37A). Tretman PERA nije doveo do odlaganja početka bolesti (Slika 37B), niti do skraćivanja trajanja EAE (Slika 37C). Međutim, uočeno je značajno smanjenje težine neurološkog deficita bolesti usled tretmana PERA. Naime, tretman PERA je doveo do smanjenja srednje k.o (Slika 37D), maksimalne k.o (Slika 37E) i kumulativne k.o (Slika 37F). Ovi rezultati pokazuju da PERA ne utiče na tok bolesti, ali smanjuje težinu neurološkog deficita u EAE.



Slika 37. Efekat PERA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE. Životinje su imunizovane HKM i tretirane subkutanom aplikacijom u donji leđni deo rastvorom DMSO u susamovom ulju (EAE) ili PERA (30 mg/kg) u susamovom ulju (EAE + PERA) od 7. d.n.i., u trajanju od 15 dana. Parametri bolesti praćeni do 40. d.n.i. i predstavljani su kao tok bolesti (A), dan početka bolesti (B), trajanje bolesti (C), srednja k.o (D), maksimalna k.o (E) i kumulativna k.o (F). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i/ili $SV \pm SD$ 11 životinja po grupi, iz dva nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u kliničkoj slici je korišćen Studentov t-test.

U cilju ispitivanja efekta PEGA na kliničku sliku, pacovi su imunizovani HKM. Subkutana aplikacija tretmana u donji deo leđa je započeta 7. d.n.i. i trajala je narednih 9 dana. Paralelno sa tretmanom životinja PEGA (EAE + PEGA), kontrolne životinje (EAE) su primale kontrolni rastvor. PEGA je rastvoren u DMSO i dodatno u susamovom ulju do radnog rastvora, dok je kontrolni rastvor sadržao DMSO u susamovom ulju. Tok bolesti je praćen do 40. d.n.i. (Slika 38A), međutim, nije uočen efekat na početak bolesti (Slika 38B), kao ni na dužinu trajanja bolesti (38C). S druge strane, uočeno je značajno smanjenje težine znakova bolesti usled tretmana PEGA u odnosu na kontrolnu grupu životinja, tj. dolazi do smanjenja srednje k.o (Slika 38D) i maksimalne k.o (Slika 38E), ali bez efekta kumulativnu k.o (Slika 38F). Ovi rezultati pokazuju da PEGA ne utiče na tok bolesti, ali smanjuje težinu neurološkog deficita u EAE.



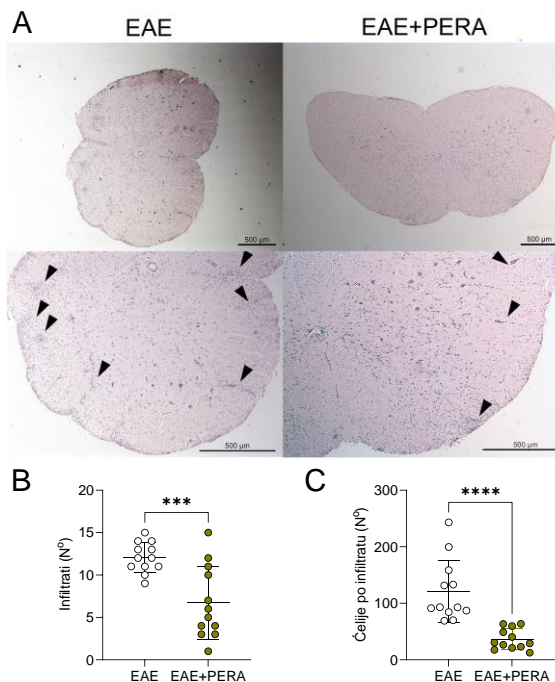
Slika 38. Efekat PEGA na tok bolesti i težinu neurološkog deficita EAE. Životinje su imunizovane HKM. Životinje su tretirane subkutanom aplikacijom u donji leđni deo rastvorom DMSO u susamovom ulju (EAE) ili PEGA (20 mg/kg) u susamovom ulju (EAE + PEGA) od 7. d.n.i., u trajanju od 9 dana. Klinički simptomi su praćeni do 40. d.n.i. i predstavljeni su kao tok bolesti (A), dan početka bolesti (B), trajanje bolesti (B), srednja k.o (D), maksimalna k.o (E) i kumulativna k.o (F). Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i/ili $SV \pm SD$ 11 životinja po grupi, iz dva nezavisna eksperimenta. ns, nema statističke značajnosti. * $p < 0,05$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u kliničkoj slici je korišćen Studentov t-test.

4.4.2. Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na presecima kičmene moždine pacova kojima je indukovao EAE

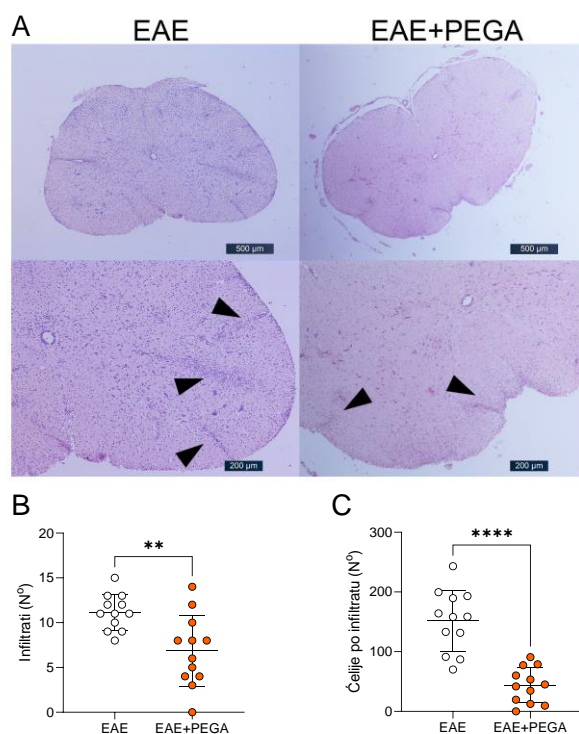
Nakon uočavanja efekta PERA i PEGA smanjenje neurološkog deficita EAE, ispitan je njihov efekat na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na poprečnom preseku kičmene moždine pacova kojima je indukovao EAE.

U cilju ispitivanja efekta PERA/PEGA na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na poprečnom preseku kičmene moždine, pacovi su imunizovani HKM. Subkutana aplikacija tretmana u donji deo leđa je započeta 7. d.n.i. Simultano sa tretmanom životinja PERA (EAE + PERA)/PEGA (EAE + PEGA), kontrolne životinje (EAE) su primale kontrolni rastvor. Životinje su žrtvovane na vrhuncu bolesti kod kontrolnih životinja (11. - 14. d.n.i). Rezultati dobijeni primenom bojenja H&E (Slika 39A, 40A) ukazuju da je došlo do smanjenja broja infiltrata (Slika 39B, 40B) na poprečnom preseku kičmene moždine, kao i smanjenja broja ćelija (Slika 39C, 40C) unutar infiltrata kod životinja

tretiranih PERA/PEGA, u odnosu na kontrolne životinje. Na osnovu ovih rezultata, moglo bi se zaključiti da je smanjenje težine neurološkog deficita EAE kod pacova tretiranih PERA/PEGA, između ostalog, posledica smanjene infiltracije imunskih ćelija u kičmenu moždinu ovih životinja.



Slika 39. Efekat PERA na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na poprečnom preseku kičmene moždine pacova kojima je indukovano EAE. Životinje su imunizovane HKM. Subkutana aplikacija tretmana PERA (30 mg/kg) rastvorenim u susamovom ulju (EAE + PERA) ili DMSO rastvorenim u susamovom ulju (EAE) je započeta 7. d.n.i. i trajala je do vrhunca bolesti (11. - 14. d.n.i) kontrolnih životinja (EAE). Poprečni preseki kičmenih moždina obe grupe životinja su uzeti na vrhuncu bolesti kontrolnih životinja i obojeni H&E (A, reprezentativna mikrografija, skala predstavlja 500 μm , infiltrati su označeni strelicama). Ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu su detektovane bojenjem H&E, a statistički predstavljene kao broj infiltrata po preseku (B) i broj ćelija po infiltratu (C), dok je brojanje urađeno manuelnim nepristrasnim pregledom histoloških preseka na mikroskopu. Infiltrati su definisani kao veće grupacije ćelija na poprečnom preseku kičmene moždine. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i $SV \pm SD$ iz tri životinje po grupi, četiri preseka po životinji, iz dva nezavisna eksperimenta. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Za određivanje statističke značajnosti je korišćen Studentov t-test (B, C).. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u broju infiltrata na poprečnom preseku i broju ćelija po infiltratu je korišćen Studentov t-test (B, C).

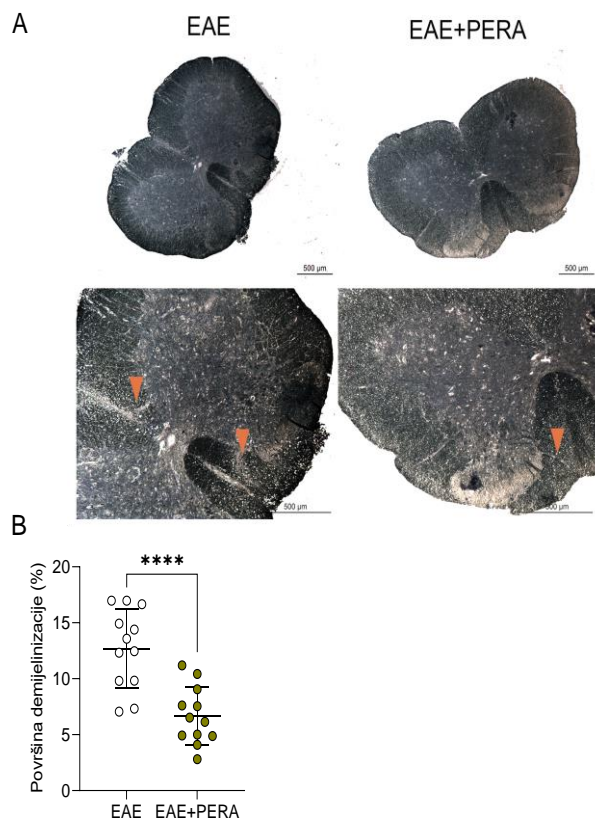


Slika 40. Efekat PEGA na broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu na poprečnom preseku kičmene moždine pacova kojima je indukovano EAE. Životinje su imunizovane HKM. Subkutana aplikacija tretmana PEGA (20 mg/kg) rastvorenim u susamovom ulju (EAE + PEGA) ili DMSO rastvorenim u susamovom ulju (EAE) je započeta 7. d.n.i. i trajala je do vrhunca bolesti (11. - 14. d.n.i) kontrolnih životinja (EAE). Poprečni preseki kičmenih moždina obe grupe životinja su uzeti na vrhuncu bolesti kontrolnih životinja i obojeni H&E (A, reprezentativna mikrografija, skala predstavlja 500 μ m, infiltrati su označeni strelicama). Ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu su detektovane bojenjem H&E, a statistički predstavljene kao broj infiltrata po preseku (B) i broj ćelija po infiltratu (C), dok je brojanje urađeno manuelnim nepristrasnim pregledom histoloških preseka na mikroskopu. Infiltrati su definisani kao veće grupacije ćelija na poprečnom preseku kičmene moždine. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrednosti i $SV \pm SD$ iz 3 životinje po grupi, 4 preseka po životinji, iz dva nezavisna eksperimenta. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, predstavlja statistički značajnu promenu EAE + PEGA u odnosu na EAE. Za određivanje statističke značajnosti razlika u broju infiltrata na poprečnom preseku i broju ćelija po infiltratu je korišćen Studentov t-test (B, C).

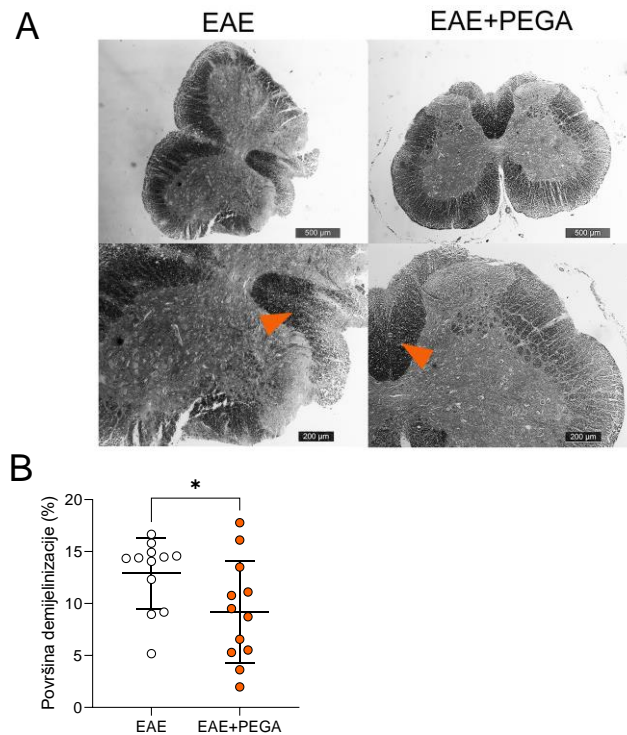
4.4.3. Ispitivanje uticaja tretmana PERA/PEGA na demijelinizaciju u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE

S obzirom na to da demijelinizacija predstavlja patohistološku karakteristiku EAE, ispitan je efekat PERA i PEGA na očuvanje mijelinskog omotača kod životinja kojima je indukovano EAE.

U cilju ispitivanja efekta PERA/PEGA na procenat demijelinizacije po poprečnom preseku kičmene moždine, pacovi su imunizovani HKM. Subkutana aplikacija tretmana u donji deo leđa je započeta 7. d.n.i. i životinje su žrtvovane u momentu vrhunca bolesti kontrolnih životinja (11. - 14. d.n.i). Simultano sa tretmanom životinja PERA (EAE + PERA)/PEGA (EAE + PEGA), kontrolne životinje (EAE) su primale kontrolni rastvor (DMSO rastvoren u susamovom ulju). Bojenjem SBB (Slika 41A, 42A) i kvantifikovanjem demijelinizovanih regiona programom ICY (Slika 41B, 42B) na poprečnim presecima kičmenih moždina, uočeno je smanjenje udela demijelinizacijom zahvaćenih površina. Ovi rezultati pokazuju da je uočeni efekat PERA i PEGA na EAE i posledica smanjene demijelinizacije u kičmenoj moždini tretiranih pacova što ukazuje na mijeloprotektivno dejstvo PERA i PEGA.



Slika 41. Efekat PERA na procenat demijelinizacije po poprečnom preseku kičmene moždine pacova kojima je indukovana EAE. Životinje su imunizovane HKM. Subkutani tretman PERA (30 mg/kg) rastvoren u susamovom ulju (EAE + PERA) ili DMSO rastvoren u susamovom ulju (EAE) je započet 7. d.n.i. i trajao je do vrhunca bolesti (11. - 14. d.n.i) kontrolnih životinja (EAE). Poprečni preseki kičmenih moždina obe grupe životinja su uzeti na vrhuncu bolesti kontrolnih životinja i obojeni SBB (A, reprezentativna mikrografija, skala predstavlja 500 μ m, demijelinizovane površine su označene strelicama). Demijelinizovani delovi kičmene moždine su kvantifikovani programom ICY (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz tri životinje po grupi, četiri preseka po životinji, iz dva nezavisna eksperimenta. **** $p < 0,0001$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u površini demijelinizacije je korišćen Studentov t-test (B).



Slika 42. Efekat PEGA na procenat demijelinizacije po poprečnom preseku kičmene moždine pacova kojima je indukovano EAE. Životinje su imunizovane HKM. Subkutani tretman PEGA (20 mg/kg) rastvoren u susamovom ulju (EAE + PEGA) ili DMSO rastvoren u susamovom ulju (EAE) je započet 7. d.n.i. i trajao je do vrhunca bolesti (11. - 14. d.n.i) kontrolnih životinja (EAE). Poprečni preseki kičmenih moždina obe grupe životinja su uzeti na vrhuncu bolesti kontrolnih životinja i obojeni SBB (A, reprezentativna mikrografija, skala predstavlja 500 μ m, demijelinizovane površine su označene strelicama). Demijelinizovani delovi kičmene moždine su kvantifikovani programom ICY (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz tri životinje po grupi, četiri preseka po životinji, iz dva nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$. Za određivanje statističke značajnosti razlika u površini demijelinizacije je korišćen Studentov t-test (B).

5. Diskusija

Autoimunske bolesti predstavljaju veliki izazov u savremenoj medicini zbog njihove široke rasprostranjenosti i kompleksne, heterogene etiologije, a nemogućnost identifikovanja tačnog uzroka bolesti sa sobom nosi probleme u lečenju. S tim u vezi, postoji velika potreba za iznalaženjem novih terapeutika ili modifikacije postojećih u cilju ublažavanja simptoma bolesti ili modulacije toka same bolesti.

Tradicionalna upotreba različitih aromatičnih biljaka u ishrani je pokazala koristi za ljudsko zdravlje, te su identifikovane brojne bioaktivne komponente zaslužne za takav efekat. Postoji širok spektar hemijskih jedinjenja izolovanih iz aromatičnih biljaka, kao što su polifenoli, kinini, flavonoli/flavonoidi, alkaloidi, polipeptidi ili njihovi derivati (Christaki i sar., 2012). Iako ova jedinjenja imaju izrazite biološke aktivnosti, postoji potreba za njihovim unapređenjem u smislu povećanja biodostupnosti, poboljšanja aktivnosti i/ili veće specifičnosti. Među ovim jedinjenjima posebno se ističu RA i GA koje pripadaju fenolnoj grupi jedinjenja biljaka čiji su mehanizmi delovanja dobro istraženi i poznati u kontekstu različitih inflamacijskih stanja, ali postoji mali broj radova koji se bave njihovim derivatima, posebno u kontekstu autoimunosti.

Nekoliko studija koje su ispitivale derivate RA i GA pokazalo je veću potentnost derivata od izvorne komponente. Tako je etil ester RA ispitivan u *in vitro* modelu oštećenja humanih endotelnih ćelija izazvanog visokom koncentracijom glukoze. Pokazano je da ovaj derivat štiti endotelne ćelije od apoptoze, a uočava se i značajno snižavanje nivoa ROS (Shen i sar., 2018). Efekat derivata GA, trimetil galna kiselina, u modelu sindroma hroničnog stresa kod miševa je doveo do reverzije stresom indukovano ponašanja, zatim snižavanja biohemijskih parametara stresa i TNF, kao markera inflamacije (Dhingra i sar., 2014). Slični rezultati su primećeni u studiji koja je ispitivala uticaj amid derivata GA na stimulisane humane mast ćelije u kojoj je pokazano da ovaj derivat efikasnije smanjuje gensku ekspresiju IL-6 i TNF *in vitro* nego sama GA (Fei i sar., 2017).

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su novosintetisani derivati RA i GA. Fenetil RA i GA sintetisani su u hemijskoj reakciji esterifikacije između ovih kiselina i fenetil alkohola. Dobijeni produkti su prečišćeni i okarakterisani pomoću ¹H/¹³C NMR spektroskopije. Uvođenjem izrazito veće, nepolarne fenetil grupe na mesto polarne karboksilne grupe, dobija se derivat kiseline kojem je olakšan prolazak kroz ćelijsku membranu (Gerogianni i sar., 2018). Dalje, dejstvom unutarćelijskih esteraza obezbeđuje se akumulacija slobodnih formi RA i GA u ćeliji koje zatim ostvaruju svoju biološku aktivnost. Tako su rezultati dobijeni *in vitro* na humanim Jurkat ćelijama pokazali veću potentnost PERA od same RA i njenih drugih derivata (poput amid derivata), u zaštiti ćelija od oštećenja DNK izazvanih H₂O₂ (Gerogianni i sar., 2018). Takođe, u istoj studiji poređena je efikasnost preuzimanja RA i PERA, kada je pokazano da PERA mnogo efikasnije ulazi u ćeliju od primarne supstance (Gerogianni i sar., 2018). Prema tome, zbog očiglednih pozitivnih ali nedovoljno istraženih efekata derivata aromatičnih kiselina u biološkim sistemima, posebno u kontekstu autoimunosti, u ovoj doktorskoj disertaciji su *in vitro* ispitivana imunomodulacijska svojstva hemijski sintetisanih fenetil estara RA i GA na ćelije koje su uključene u imunopatogenezu EAE, kao i *in vivo* efekat ovih jedinjenja na neurološku manifestaciju bolesti.

Kao model sistem u ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je aktivni EAE indukovan u DA pacovima. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da *in vivo* tretman PERA i PEGA utiče na težinu neurološkog deficita u EAE i da svoj efekat potencijalno ostvaruju delovanjem na imunske ćelije uključene u patogenezu EAE. Ovi rezultati su dobijeni *in vitro* ispitivanjima na imunskim ćelijama PLČ, prečišćenim CD4⁺ ćelijama, imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine kao i na BV2 ćelijama koje predstavljaju mišju ćelijsku liniju mikroglije.

Nakon imunizacije, periferne APC preuzimaju encefalitogene i prezentuju naivnim CD4⁺ T-ćelijama, od kojih nastaju Th1 i Th17 ćelije, i to posredstvom signalizacije preko TCR, kostimulatornih molekula, receptora za citokine i transkripcionih faktora specifičnih za određeni podtip ćelija (Lynch, 2009). Na značaj Th1 i Th17 populacija ćelija, koje spadaju u glavne nosioce patoloških procesa u

MS i EAE, ukazuje uvođenje termina „Th17/Th1 paradigma“ (Rostami i Ciric, 2013). Tako, u modelu EAE koji je izazvan transferom limfocita iz miševa imunizovanih peptidom MOG u naivne miševe, pokazano je da imunske ćelije koje infiltriraju CNS čine uglavnom Th1 ćelije (Yura i sar., 2001). Međutim, kasnije je utvrđeno da u patogenezi EAE učestvuje i Th17 subpopulacija ćelija. Naime, pasivnim transferom Th17 ćelija je pokazano da dolazi do razvoja EAE (El-behi i sar., 2010). Pretpostavlja se da Th1 ćelije prve ulaze u CNS i stvaraju uslove za infiltraciju Th17 ćelija (O'Connor i sar., 2008). Takođe, pokazano je da nakon imunizacije, u inicijalnoj fazi bolesti, kod DA pacova dolazi do porasta broja CD4⁺ T-ćelija unutar PLČ, nakon čega se njihov broj smanjuje pod pretpostavkom da migriraju u CNS (Vukmanović i sar., 1990). Prema tome, uticaj PERA i PEGA je prvo ispitan na ćelijama PLČ, i to na produkciju encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17 od strane celokupne populacije ćelija, kao i na fenotipske i funkcionalne karakteristike CD4⁺ ćelija. Dalje je ispitan uticaj PERA i PEGA na SCIC, koja predstavlja efektorsko mesto encefalitogenih T-limfocita u EAE, gde se oni reaktiviraju i ostvaruju patogeni potencijal.

Ranije je uočeno da se nivo citokina IFN- γ i IL-17 menja kroz različite faze bolesti u EAE. Tako, u drenirajućim limfnim čvorovima u fazi inicijacije bolesti dolazi do porasta oslobađanja IL-17, dok je povećanje produkcije IFN- γ ograničeno (Momcilović i sar., 2008). S druge strane, povećana produkcija IFN- γ i IL-17 na početku bolesti unutar kičmene moždine ukazuje na njihovu važnu ulogu u inicijaciji neuroinflamacije (Momcilović i sar., 2008). IFN- γ je smatran ključnim medijatorom u inflamacijskim demijelinizujućim bolestima (Olsson, 1992). Iako su literaturni podaci o ulozi IFN- γ u EAE brojni, i često kontradiktorni (Sosa i sar., 2015), nesporan je značaj IFN- γ u patogenezi EAE (Arellano i sar., 2015). U mišjem modelu EAE induktivnu fazu karakteriše povećana produkcija IFN- γ u drenirajućim limfnim čvorovima, a to se dovodi u vezu sa indukcijom NK-reaktivnih ćelija, koje imaju ulogu u polarizaciji makrofaga ka M1 fenotipu i kasnijoj diferencijaciji autoreaktivnih Th1 ćelija (Evangelista i sar., 2016). S druge strane, na značaj IL-17 u patogenezi EAE ukazuje komparativna studija urađena između AO (Albino Oxford) soja, rezistentnog na indukciju EAE, i DA soja pacova (Miljković i sar., 2006). Naime, ova studija je pokazala da u drenirajućim limfnim čvorovima dolazi do veće produkcije IL-17 u DA soju koji je podložan razvoju EAE (Miljković i sar., 2006).

In vitro tretmanom PERA i PEGA ostvaruje se inhibitorski efekat na imunske ćelije izolovane iz PLČ restimulisane antigenima CNS (MBP kod životinja imunizovanih HMK ili MOG₃₅₋₅₅ kod životinja imunizovanih ovim peptidom + CFA, kao i na izdvojene CD4⁺ ćelije i SCIC. Takav efekat se detektuje kao snižavanje koncentracije IFN- γ i IL-17 u supernatantima kulture ovih ćelija (Slika 43). S tim u vezi, ovi rezultati ukazuju da PERA i PEGA imaju sposobnost da ograniče encefalitogeni potencijal ovih ćelija, odnosno imunskih ćelija izolovanih iz PLČ, CD4⁺ ćelija izdvojenih iz imunskih ćelija PLČ i SCIC.

Naime, važno je spomenuti da prilikom imunizacije pacova HKM postoji širok spektar encefalitogena koji pokreću imunski odgovor, dok suprotno tome imunizacijom emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA imunski odgovor pokreće jedan encefalitogen i drugi nespecifični mikobakterijski antigeni. Samim tim, u ovoj doktorskoj disertaciji su prilikom restimulacije ćelija koršćeni i različiti antigeni (MBP prilikom imunizacije HKM ili MOG₃₅₋₅₅ prilikom imunizacije emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA). Dobijeni efekti PERA/PEGA pri različitim režimima imunizacije i restimulacije ćelija, konzistentno ukazuju na njihov antiencfalitogeni efekat.

Efekat estara na smanjenje produkcije IFN- γ od strane imunskih ćelija PLČ, separisanih CD4⁺ ćelija i SCIC je u skladu sa ranijim istraživanjima u kojima je pokazano npr. da je delovanje derivata 4-O-beta-D-glukozida ruzmarinske kiseline na efektorske Th1 ćelije, na modelu infekcije miševa virusom influence, dovelo do supresije produkcije citokina IFN- γ u plućima i serumu inficiranih miševa (Liu i sar., 2017). Takođe, u modelu atopijskog dermatitisa kod miševa, indukovano 2,4-dinitrofluorobenzenom, pokazan je inhibitorski efekat RA na produkciju IFN- γ od strane CD4⁺ ćelija

prečišćenih iz limfnih čvorova koji dreniraju mesto kožnih lezija (Jang i sar., 2011). Dalje, u pacovskom modelu psorijaze, pokazano je da RA smanjuje nivo ekspresije citokina Th17 ćelija, IL-17 i IL-22, kao i transkripcionog faktora ROR γ t (*engl.* retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma T), u kožnim lezijama i limfnim čvorovima (Zhang i sar., 2021). Slično, u mišjem modelu psorijaze, RA inhibira produkciju citokina IL-17 i interferira sa interakcijom IL-17A/IL-17RA čime ublažava inflamaciju kože karakterističnu za psorijazu (Ho i sar., 2022).

Tretman GA u modelu alergijskog rinitisa kod pacova, povećava ekspresiju IFN- γ i IL-12, dok s druge strane smanjuje nivo IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 i ROR γ t u nazalnoj tečnosti (Fan i sar., 2019). Takođe, u modelu reumatoidnog artritisa kod miševa izazvanog ubrizgavanjem kolagena, na mestu inflamacije, tj. skočnim zglobovima je uočeno snižavanje nivoa iRNA za IL-17 usled tretmana GA, a povećan nivo antiinflamacijskih citokina IL-10 i TGF- β , dok u serumu dolazi do snižavanja nivoa proinflamacijskih citokina, IFN- γ i IL-17 (Liu i sar., 2023). U modelu ulceroznog kolitisa kod miševa koji se karakteriše jakom inflamacijom debelog creva, pokazan je antiinflamacijski potencijal GA, i to na osnovu smanjenja iRNK za IFN- γ i IL-17 u debelom crevu, kao i drugih proinflamacijskih citokina (Pandurangan i sar., 2015).

S obzirom na to da je citokinski milje unutar PLČ ključan faktor koji usmerava diferencijaciju T-ćelija, bilo je važno odrediti uticaj PERA i PEGA na ekspresiju gena za citokine ili njihove subjedinice, koji učestvuju u polarizaciji imunskog odgovora. Prateći efekte promene ekspresije gena usled *in vitro* tretmana PERA na imunске ćelije PLČ, uočeno je povećanje ekspresije *Tgfb* i smanjenja ekspresije *P40* (Slika 43), dok nije uočen efekat na *P19*, *P35* i *Il-6*. Povećanje ekspresije *Tgfb* ukazuje na to da PERA podstiče antiinflamacijski odgovor ćelija PLČ. Naime, TGF- β učestvuje u razvoju Treg ćelija, dok je za razvoj Th17 ćelija potrebno udruženo delovanje TGF- β i IL-6 (Aranami i Yamamura, 2008; Bettelli i sar., 2006). Pored toga, smanjenje ekspresije *P40* koji kodira proteinsku subjedinicu p40 koja ulazi u sastav IL-12 (p35+p40) i IL-23 (p19+p40), glavnih citokina koji usmeravaju diferencijaciju Th1 i Th17 ćelijskih subpopulacija (Brahmachari i Pahan, 2008; Grifka-Walk, 2015), bi moglo doprineti smanjenju inflamacijskog odgovora pod dejstvom PERA. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno navedenim studijama u kojoj je pokazano da RA smanjuje nivo ekspresije citokina IL-23 u kožnim lezijama i limfnim čvorovima koji dreniraju mesto lezija indukovanih imikvimodom (Zhang i sar., 2022; Ho i sar., 2022). Sa druge strane, *in vitro* tretman PEGA imunskih ćelija PLČ, dovodi do snižavanja nivoa ekspresije gena *P35* i *Tgfb* (Slika 43), dok nema uticaja na ekspresiju gena *P40*, *P19* i *Il-6*. Tako, na osnovu prethodno navedenog zaključujemo da PEGA dovodi do snižavanja ekspresije iRNK za TGF- β i IL-12, dok nema uticaj na IL-23. Ovi rezultati ukazuju da PERA i PEGA utiču na citokinski milje ćelija drenirajućih limfnih čvorova *in vitro*, a koji oblikuje fenotip Th ćelija. Osim toga, važno je napomenuti da je ograničenje ovakve eksperimentalne postavke vremenska inkubacija tretmana PERA i PEGA u trajanju od 24 h. Naime, moguće je da bi duža ili kraća inkubacija dovela do promena na nivou ekspresije gena za druge navedene relevantne citokine, što zahteva buduća istraživanja.

Zbog već pomenutog dualnog efekta NO na imunski odgovor, kao i antioksidativne aktivnosti fenolnih jedinjenja i njihovih derivata, ispitan je *in vitro* uticaj PERA i PEGA na produkciju NO u imunskim ćelijama PLČ i SCIC. Zanimljivo, PERA u ćelijama PLČ dovodi do ograničenog povećanja produkcije NO, dok PEGA ostvaruje značajan efekat povećanja produkcije NO, sa izraženim dozno-zavisnim efektom (Slika 43). Ovakav neočekivan rezultat se može tumačiti u kontekstu toga da uloga NO, za razliku od oštećujuće uloge u CNS gde u uslovima neuroinflamacije dovodi do formiranja RNS i ćelijske smrti (Jiang i sar., 2014; Petković i sar., 2013), na periferiji može delovati supresivno na adaptivni imunski odgovor (Gold i sar., 1997). Naime, NO posreduje u aktivaciji makrofaga, nastanku M1 fenotipa, i usmeravanju T-ćelija ka CNS u patogenezi EAE (Jiang i sar., 2014). Zbog značajnog doprinosa SCIC u produkciji NO, ispitan je efekat *in vitro* tretmana PERA i PEGA na produkciju NO od strane ovih ćelija. Rezultati jasno ukazuju da PERA i PEGA inhibiraju produkciju NO u SCIC (Slika 43). S tim u vezi, i brojni radovi ukazuju na značaj RA u kontekstu antioksidativne

zaštite na mestu inflamacije. Tako je pokazan inhibični efekat RA na produkciju NO u modelu osteoartritisa kod pacova, kao i snižena ekspresija iNOS i COX-2 u hondrocitima u istom modelu bolesti (Chen i sar., 2018). Slično, pokazano je da derivat RA u alevolarnim makrofagima stimulisanim LPS smanjuje nivo NO, kao i da snižava ekspresiju iNOS (Thammason i sar., 2018). Ovi *in vitro* rezultati ukazuju da fenetil estri ispitani u ovoj doktorskoj disertaciji svoj benefit *in vivo* potencijalno ostvaruju i preko modulacije nivoa NO. Na značaj NO u patogenetskim mehanizmima ukazuje studija u kojoj su Ljubisavljević i saradnici pokazali da upotreba inhibitora aktivnosti iNOS u induktivnoj fazi bolesti, poput aminoguanidina, smanjuje maksimalnu k.o i skraćuje trajanje bolesti kod pacova (Ljubisavljevic i sar., 2011). Međutim, postoje i drugačiji podaci koji ukazuju da upotreba aminoguanidina pri znatno većoj dozi, u induktivnoj fazi bolesti, dovodi do pogoršanja kliničkih simptoma (Kahl i sar., 2003). Sve ovo ukazuje da je reč o finoj signalizaciji na nivou periferne i centralne imunosti, te da ovakvi rezultati zahtevaju dalja istraživanja, naročito *ex vivo*. Naime, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da PERA i PEGA na periferiji, tj. mestu gde se generiše imunski odgovor, potenciraju produkciju NO i na taj način potencijalno suprimiraju imunski odgovor. Međutim, u SCIC, koje osim produkcijom citokina, i produkcijom NO potenciraju inflamaciju i neurodegeneraciju, PERA i PEGA inhibiraju takav efekat.

Nakon određivanja efekta PERA i PEGA na produkciju glavnih encefalitogenih citokina, i faktora koji utiču na određivanje fenotipa imunskih ćelija PLČ (citokinski milje i NO), bilo je važno odrediti *in vitro* uticaj ovih jedinjenja na neke od glavnih fenotipskih karakteristika imunskih ćelija PLČ i SCIC. Konkretno, ispitivan je njihov uticaj na aktivacioni status CD4⁺ ćelija (analizom ekspresije markera aktivacije ćelija - CD25 i OX40), procentualnu zastupljenost vodećih subpopulacija ćelija u patogenezi EAE (Th1 i Th17 ćelije), kao i na udeo ćelija koje učestvuju u regulaciji imunskog odgovora (Treg ćelije). Naime, CD25 je aktivacioni marker ćelija koji ukazuje na kasnu aktivaciju T-ćelija (Ochs i sar., 2022; Reddy i sar., 2004), dok OX40 predstavlja rani marker aktivacije ćelija sa kostimulatornom funkcijom, i eksprimiran je na konvencionalnim aktiviranim T-ćelijama, aktiviranim regulatornim T-ćelijama, NK T-ćelijama, NK ćelijama, i neutrofilima (Croft i sar., 2009). Rezultati pokazuju da PERA i PEGA ne utiču na procentualnu zastupljenost aktivisanih (CD25⁺, OX40⁺) ćelija unutar CD4⁺ ćelija imunskih ćelija PLČ. Međutim, u populaciji SCIC je pokazano da PERA značajno smanjuje procentualnu zastupljenost CD4⁺ ćelija koje eksprimiraju markere aktivacije ćelija (CD25, OX40) (Slika 43). Osim toga, PEGA smanjuje udeo CD25⁺ ćelija (Slika 43), dok je značajniji efekat na udeo OX40⁺ ćelije unutar CD4⁺ ćelije izostao. Ovo implicira da tretman PERA smanjuje učestalost aktivisanih CD4⁺ ćelija unutar SCIC, te da je to još jedan od potencijalnih mehanizama kojim može ostvarivati imunomodulacijski efekat *in vivo*, dok bi tretman PEGA takav efekat mogao pripisati jedino smanjenju udela CD25⁺ ćelija. Ovakav efekat PERA i PEGA na aktivirane CD4⁺ ćelije naročito je značajan u kontekstu studije koja je pokazala da je terapija usmerena ka OX40 molekulu uspešna u modelu EAE, i to zbog selektivnog delovanja na autoreaktivne CD4⁺ T-ćelije koje visoko eksprimiraju OX40 (Weinberg i sar., 1996).

Na važnost ispitivanja efekta PERA i PEGA na zastupljenost i funkciju Th1 i Th17 subpopulacija ćelija ukazuju već pomenute brojne studije ispitivanja uloge ovih subpopulacija u patogenezi EAE. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da tretman PERA nije značajno uticao na procentualnu zastupljenost Treg, Th1 i Th17 ćelija unutar populacije imunskih ćelija PLČ. Za razliku od PERA, tretman PEGA pokazuje tendenciju snižavanja udela Th1 populacije ćelija unutar populacije ćelija PLČ, dok efekat na Treg i Th17 populacije unutar imunskih ćelija PLČ izostaje. Dalje, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da PERA ne ostvaruje uticaj na udeo Treg, Th1 i Th17 unutar SCIC, dok PEGA značajno smanjuje udeo Th17 populacije ćelija unutar SCIC (Slika 43), a bez efekta na udeo Treg i Th1.

Ovi rezultati sugerišu da PERA svoj *in vivo* efekat ne postiže promenom udela pojedinačnih encefalitogenih populacija, niti takav efekat može da se pripiše njegovom delovanju na udeo Treg ćelija. PERA svoj efekat na EAE najverovatnije ostvaruje, pored inhibicije produkcije IFN- γ i IL-17,

i kroz smanjenje udela aktiviranih CD4⁺ ćelija u SCIC. S druge strane, povoljno delovanje tretmana PEGA na težinu bolesti kod životinja kod kojih je indukovana EAE, bi se potencijalno moglo pripisati smanjenoj zastupljenosti CD4⁺CD25⁺ i Th17 ćelija među SCIC, kao si smanjenoj sintezi efektorskih citokina IFN- γ i IL-17 u SCIC i imunskim ćelijama PLČ tretiranim PEGA.

Dalje, u modelu Tip 1 Dijabetesa (T1D) kod miševa je uočeno da PERA smanjuje procentualnu zastupljenost Th1 i Th17 ćelija koje infiltriraju pankreas (Koprivica i sar., 2021). Zatim, u već pomenutom modelu psorijaze gde su lezije kože indukovane imikvimodom, pokazano je da u kožnim lezijama i limfnim čvorovima koji ih dreniraju, RA smanjuje udeo CD4⁺ROR γ t⁺ i CD4⁺IL-17⁺ ćelija, a predloženi mehanizam delovanja RA je inhibicija IL-23/Th17 ose (Zhang i sar., 2021). Ovi rezultati su u skladu i sa rezultatima dobijenim u modelu reumatoidnog artritisa, gde je pokazano da GA dovodi do smanjenja udela CD4⁺IL17⁺ ćelija unutar slezine (Liu i sar., 2023). U studiji u kojoj je ispitivan efekat pretretmana GA mononuklearnih ćelija izolovanih iz periferne krvi pacijenata sa psorijazom, koje su nakon toga stimulisane jonomicinom i PMA, smanjena je procentualna zastupljenost Th1 i Th17 ćelija (Tsiogkas i sar., 2023).

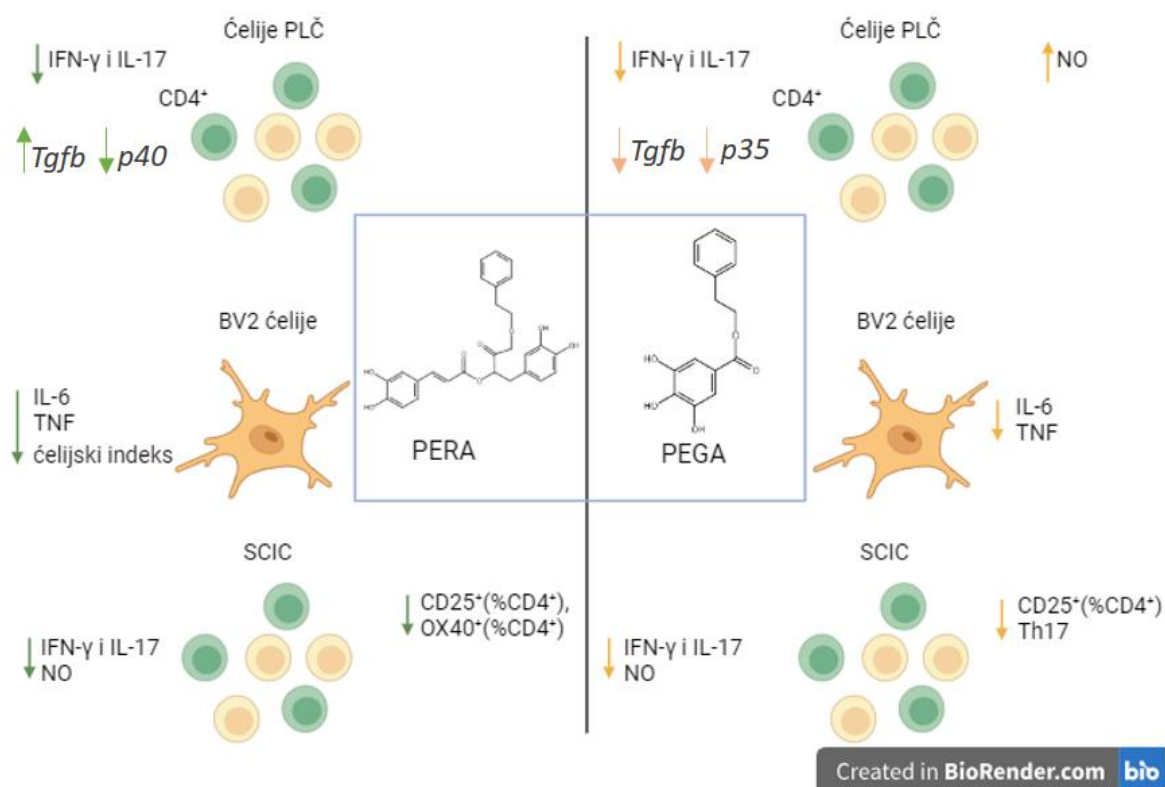
Efekti PERA i PEGA na apoptozu i proliferaciju CD4⁺ ćelija mogu biti važni za razumevanje njihovog imunomodulacijskog potencijala. Blago smanjenje procenta apoptotičnih (AnnV⁺ ćelije) CD4⁺ ćelija okviru imunskih ćelija PLČ pod uticajem PERA, uz izostanak efekta na proliferaciju CD4⁺ ćelija (Ki67⁺ ćelije) sugerise povećano preživljavanje ovih ćelija u prisustvu ovog jedinjenja. Sa druge strane, PEGA ne pokazuje značajan uticaj na apoptozu ili proliferaciju CD4⁺ ćelija. U slučaju uticaja ovih jedinjenja na SCIC, PERA blago ali ne značajno povećava apoptozu CD4⁺ ćelija što može ukazivati na nešto drugačiji efekat delovanja ovog jedinjenja na ove ćelije. Sa druge strane, PEGA ne izaziva takve promene. Iako su efekti RA i GA često povezani sa antiapoptotskim dejstvima, važno je imati u vidu da fenetil estri ovih kiselina mogu pokazivati specifične efekte na apoptozu i proliferaciju CD4⁺ ćelija poreklom iz različitih tkiva i modela bolesti.

Zatim, zbog značajne uloge koju ćelije mikroglije ostvaruju u incijalnoj i efektorskoj fazi EAE, kako zbog svoje uloge u preuzimanju i prezentovanju antigena, tako i zbog produkcije NO, ROS i citokina, bilo je važno odrediti uticaj *in vitro* tretmana PERA i PEGA na funkcionalne i fenotipske karakteristike BV2 ćelija. Rezultati ove studije pokazuju da *in vitro* tretman PERA i PEGA BV2 ćelija inhibira produkciju NO (Slika 43). Ovaj nalaz je u skladu sa ranije pokazanim efekom RA na BV2 ćelije stimulisane LPS, koji se ogleda u snižavanju ekspresije iNOS i COX-2 (Wei i sar., 2018). Takođe, studija ispitivanja efekta GA u modelu neuroinflamacije indukovane LPS je pokazala inhibični efekat GA na više molekula, a između ostalog i na ekspresiju iNOS, što rezultuje i smanjenom produkcijom NO (Liu i sar., 2020). Zanimljivo, PERA i PEGA nisu uticale na procenat ćelija koje vrše fagocitozu, dok pokazuju ograničen efekat na produkciju ROS koji nije statistički značajan. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da uticaj *in vitro* tretmana PERA i PEGA na procentualnu zastupljenost CD40⁺CD206⁺ i MHCII⁺CD86⁺ ćelija izostaje. Ovi rezultati zajedno ukazuju da PERA i PEGA ne menjaju značajno fenotipske karakteristike BV2 ćelija, ali utiču na njihova funkcionalna svojstva smanjenjem produkcije NO, čime potencijalno smanjuju neurotoksično dejstvo ovog molekula.

Kao parametar uticaja PERA i PEGA na aktivaciju BV2 ćelija, pratili smo efekat na ćelijski indeks i produkciju citokina. PERA ostvaruje pozitivan efekat na ćelije mikroglije stimulisane IFN- γ i LPS, u vidu smanjenja ćelijskog indeksa (Slika 43). Takav efekat uočen je i primenom PEGA na BV2 ćelije mikroglije, međutim slabijeg intenziteta (Slika 43). Ćelijski indeks ili otpor koji BV2 ćelije stvaraju prilikom interakcije sa podlogom u širem smislu može biti pokazatelj brojnosti, vijabilnosti, adehrentnosti i morfoloških promena BV2 ćelija (Otero-González i sar., 2012). Na osnovu ovoga možemo da zaključimo da PERA i PEGA smanjuju stepen aktivacije BV2 ćelija. Iako ovi rezultati ne ukazuju na izražen efekat PEGA u smanjenju stepena aktivacije, ranije studije ukazuju da GA snižava ekspresiju markera aktivacije, u astrocitima (GFAP, marker aktiviranih astrocita) i u

mikrogliji (ED1, marker aktivirane mikroglije) (Liu i sar., 2020). Iako nije ispitan direktan uticaj PERA i PEGA na ćelije mikroglije, rezultati dobijeni na BV2 ćelijama indirektno ukazuju da PERA i PEGA svoje delovanje mogu ostvariti promenom aktivacionog statusa ćelija mikroglije i na taj način mogu uticati na težinu neurološkog deficita u EAE. Kao što je već pomenuto, pored uticaja PERA i PEGA na ćelijski indeks kao parametra aktivacije ćelija mikroglije, određen je i uticaj na produkciju citokina IL-6 i TNF. Poznato je da je IL-6 važan medijator u različitim imunološkim i inflamacijskim procesima u CNS, te da iako može pokazivati i proinflamacijski i antiinflamacijski efekat, u EAE smanjenje nivoa IL-6 u CNS dovodi do smanjenja parametara bolesti (Gijbels i sar., 1995). Slično tome, iako je proinflamacijska funkcija TNF jasno utvrđena, brojni radovi ukazuju i na njegov značaj u regulaciji inflamacije, i to na njegovu antiinflamacijsku ulogu koja se ogleda kroz uspostavljanje tolerogenosti APC (Masli i Turpie, 2009). Generalno, snižavanje nivoa TNF, faktora uglavnom razmatranog u kontekstu doprinosa neuroinflamaciji, se dovodi u vezu sa ublažavanjem znakova bolesti EAE (Brenner i sar., 1997). *In vitro* tretman PERA i PEGA BV2 ćelija je doveo do inhibicije produkcije citokina IL-6 i TNF (Slika 43). Ovo je u skladu sa podacima ranijih studija ispitivanja RA i GA u različitim inflamacijskim stanjima. Tako, u već pomenutom radu ispitivanja uticaja RA na BV2 ćelije stimulisane LPS, pokazan je i inhibitorski efekat RA na produkciju IL-6 (Wei i sar., 2018). Ovo je potvrđeno i u mišjem modelu Parkinsonove bolesti, gde je uočen inhibitorski efekat RA na produkciju IL-6 i TNF na nivou srednjeg mozga (Lv i sar., 2019). Pored toga, uočeno je da RA snižava produkciju IL-6 i TNF i u animalnim modelima drugih bolesti kao što su akutni pankreatitis kod pacova indukovani natrijum-tauroholatom (Fan i sar., 2015), model mastitisa kod miševa indukovani LPS (Jiang i sar., 2018) i model ulceroznog kolitisa kod miševa indukovani natrijum-dekstran sulfatom (Zhou i sar., 2022).

Rezultati u okviru ove doktorske disertacije, koji ukazuju na inhibitorski efekat PEGA na produkciju IL-6 i TNF, su u skladu sa ranijom studijom ispitivanja efekta GA. Naime, GA u *in vitro* modelu deprivacije kiseonika/glukoze i reoksigenacije dovodi do smanjenja nivoa iRNK za proinflamacijski citokin IL-6 u BV2 ćelijama mikroglije (Dong i sar., 2022). Pored toga, i u modelu traumatske povrede mozga kod pacova uočeno je da GA smanjuje koncentraciju IL-6 i TNF (Sarkaki i sar., 2015). Uzimajući u obzir sve navedeno, PERA i PEGA bi potencijalno kroz uticaj na produkciju TNF i IL-6 mogli da imaju antiinflamacijsko dejstvo u CNS. Važno je napomenuti da su istraživanja ove doktorske disertacije ograničena na BV2 mišju ćelijsku liniju, kao i da se ona po ekspresiji gena, produkciji citokina i drugim funkcionalnim karakteristikama može razlikovati u odnosu na primarnu mikrogliju. S tim u vezi, efekat PERA i PEGA na primarnu mikrogliju bi se mogao razlikovati, što zahteva buduća istraživanja.



Slika 43. Šematski prikaz *in vitro* efekata PERA/PEGA.

Na kraju, imajući u vidu rezultate *in vitro* tretmana PERA i PEGA ćelija izolovanih iz PLČ, BV2 ćelije i SCIC, efekat PERA/PEGA je ispitan i *in vivo*. Naime, tretman PERA ili PEGA imunizovanih DA pacova doveo je do smanjenja neurološkog deficita (Slika 44). PERA je doveo do smanjenja srednje, maksimalne i kumulativne k.o, ali bez efekta na početak i trajanje bolesti. PEGA je doveo do smanjenja srednje k.o i maksimalne k. o, dok je imao ograničen efekat na kumulativnu k.o, a bio je bez efekta na početak i trajanje bolesti.

Slično tome, RA je pokazala povoljan uticaj na parametre bolesti i u eksperimentalnim modelima drugih bolesti. Na primer, kod miševa, RA je pokazala kardioprotektivni efekat u oštećenjima indukovanim miokardijalnom ishemijom i to smanjenjem nivoa NF-κB i IκB (*engl.* inhibitor of κB), kao i ROS, gde je metodama molekularnog dokinga nađeno da RA i NF-κB ostvaruju direktnu interakciju (Quan i sar., 2021). Zatim, RA je u modelu akutnog oštećenja jetre indukovano karbon-tetrahloridom dovođila do poboljšanja histoloških i serumskih markera oštećenja (Domitrović i sar., 2013). Hepatoprotektivni efekat RA se dovođi u vezu sa uočenim povećanjem ekspresije antioksidativnih proteina Nrf2 i hem-oksigenaze-1 (HO-1), smanjenom aktivacijom kaspaze 3, kao i prevencijom ekspresije TGF-β i α-SMA (Domitrović i sar., 2013). Takođe, i u modelu akutnog oštećenja jetre indukovano LPS/d-galaktozaminom uočeno je da RA inhibira MAPK/NF-κB signalni put, dok aktivira Nrf2, čime dovođi do porasta ekspresije antioksidativnih enzima HO-1, NAD(P)H kinon-oksidoireduktaze 1 (*engl.* NAD(P)H quinone oxidoreductase 1), GCLC (*engl.* glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), GCLM (*engl.* glutamate-cystein ligase modifier subunit). Osim toga, uočeno je snižavanje prooksidantnog enzima mijeloperoksidaze (MPO), a povećanje ekspresije antioksidativnog enzima GPx (Li i sar., 2019). Pored toga, RA je efikasna i u modelu ulceroznog kolitisa kod miševa indukovano natrijum-dekstran sulfatom, što se ogleda kroz snižavanje parametara kolitisa (indeks aktivnosti bolesti, oštećenja kolona, dužine kolona). Ovakav efekat RA se i u ovom modelu dovođi u vezu sa smanjenjem nivoa IL-6, IL-1β, smanjenjem

proteinskog nivoa COX-2 i iNOS, kao i NF- κ B i STAT3 (*engl.* signal transducer and activator of transcription 3) aktivacije (Jin i sar., 2017).

Sa druge strane, GA je već primenjivana *in vivo* u mišjem modelu EAE, gde je pokazano da dovodi do ublažavanja parametara bolesti (Abdullah i sar., 2019). Slično tome, tretman GA pokazao je ublažavanje parametara bolesti u nekoliko različitih eksperimentalnih modela bolesti, uključujući hroničnu opstruktivnu bolest pluća, artritis, ulcerozni kolitis i neuropatski bol. U modelu hronične opstruktivne bolesti pluća indukovane elastazom kod pacova, uočeno je da GA ublažava inflamaciju i destrukciju alveola. Kao mehanizam kojim GA ostvaruje svoj efekat u ovom modelu navodi se aktivacija signalnog puta Nrf2, povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (GPx, SOD, CAT) i smanjenje ekspresije NF- κ B (Sohrabi i sar., 2021). GA svoj efekat zaštite alveola od destrukcije koja se sreće u modelu hronične opstruktivne bolesti pluća indukovane elastazom ostvaruje i kroz supresiju ekspresije proteolitičkih enzima MMP-2/MMP-9, a povećavajući ekspresiju njihovih inhibitora poput TIMP1 (*engl.* tissue inhibitor of metalloproteinase 1) (Singla i sar., 2020). Efekat ublažavanja parametara bolesti usled tretmana GA je uočen i u već pomenutom modelu artritisa indukovanog kolagenom (Liu i sar., 2023), modelu ulceroznog kolitisa indukovanog trinitrobenzensulfonskom kiselinom kod miševa (Zhu i sar., 2018), i modelu neuropatskog bola kod miševa indukovanog hemioterapeutikom paklitakselom (Kaur i Muthuraman, 2019).

U ovoj disertaciji, efekat tretmana imunizovanih DA pacova PERA ili PEGA detektovan je i na nivou histoloških preseka kičmenih moždina pacova. Naime, pomoću H&E bojenja uočeno je da dolazi do smanjenja broja infiltrata i broja ćelija po infiltratu usled tretmana PERA ili PEGA (Slika 44). Ovi rezultati su u skladu sa ranijom studijom sprovedenom u modelu atopijskog dermatitisa indukovanog kod miševa, gde je uočeno da RA dovodi do smanjenja broja CD4⁺, CD8⁺ i mast ćelija unutar lezija (Jang i sar., 2011). Ovakav rezultat bi se mogao objasniti efektom RA na migraciju ćelija. Naime, prethodno je pokazano da RA posredstvom inhibicije metaloproteinaza inhibira migratorne sposobnosti ćelija melanoma i glioma (Liu i sar., 2021). Osim toga, RA ostvaruje efekat i na dendritske ćelije, i to smanjujući gensku ekspresiju hemokina MCP-1 (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1) i MIP-1 α (*engl.* macrophage inflammatory protein-1 alpha) (Kim i sar., 2008). To sugeriše da bi se smanjenje infiltracije ćelija uočeno na histološkim prescima usled tretmana PERA moglo objasniti smanjenom produkcijom hemokina koji usmeravaju migraciju imunskih ćelija.

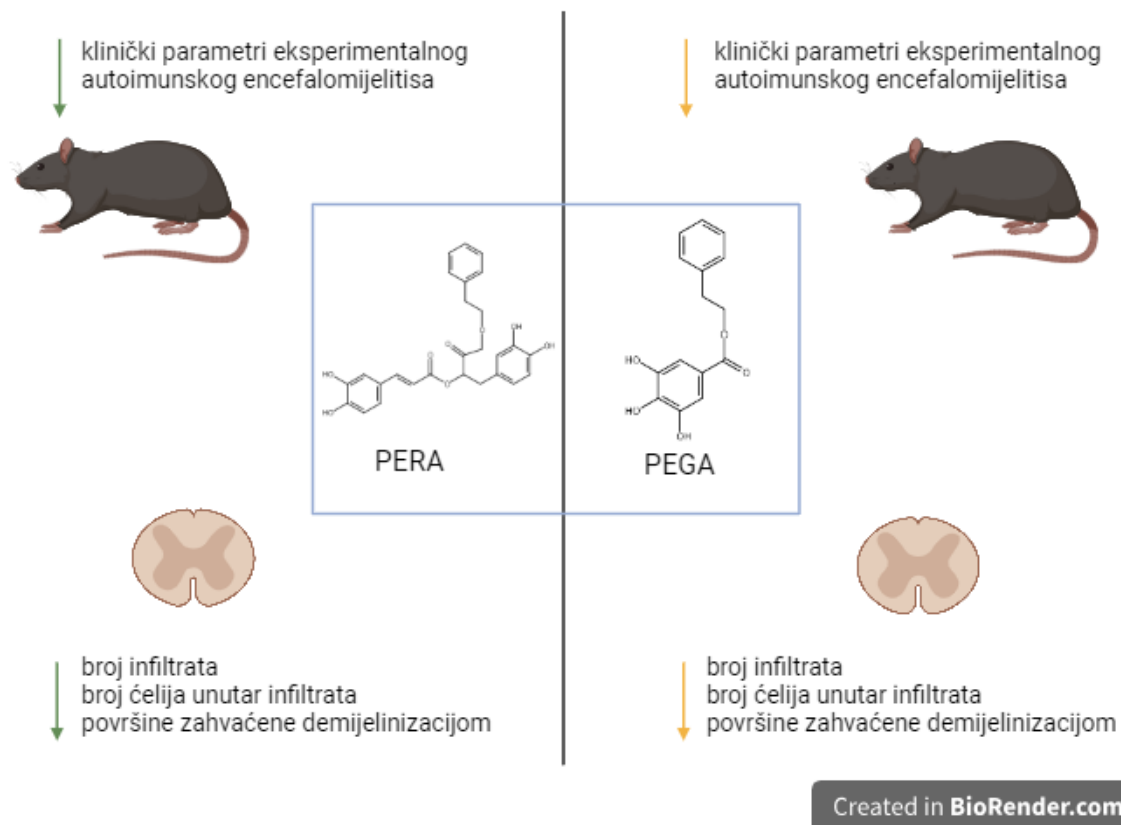
U mišjem modelu astme indukovane ovalbuminom je pored efekta ublažavanja kliničkih znakova bolesti pod uticajem tretmana GA, uočeno da GA dovodi do smanjenja infiltracije eozinofila, makrofaga, neutrofila i limfocita u pluća. Pretpostavljeni mehanizam delovanja GA u ovom modelu je kroz supresiju produkcije citokina IL-33, čije povećano prisustvo je dovoljno da pokrene infiltraciju ćelija (Wang i sar., 2018). Dalje, i u modelu alergijskog rinitisa kod miševa je uočen efekat smanjenja infiltracije eozinofila u nazalnu mukozu usled tretmana GA (Fan i sar., 2019). Slično, kao i usled tretmana RA na ćelijske linije tumora, i usled tretmana GA je pokazana inhibitorna aktivnost na migraciju i to kroz smanjenje ekspresije MMP-9 u humanim ćelijama kolorektalnog karcinoma (Priyadarshi i sar., 2021).

Proces demijelinizacije je karakterističan za demijelinizujuće bolesti poput EAE, te je praćen i efekat tretmana PERA i PEGA na očuvanje mijelinskog omotača kod imunizovanih DA pacova. SBB bojenjem je pokazano da tretman PERA ili PEGA utiče na očuvanje mijelinskog omotača, a to je potvrđeno kvantifikovanjem površina zahvaćenih demijelinizacijom unutar preseka kičmene moždine, koje su bile manje kod tretiranih grupa (Slika 44). Neuroprotektivni efekat RA je uočen u modelu oštećenja kičmene moždine, a to se ostvaruje kroz snižavanje nivoa ROS, inhibicije NF- κ B, snižavanje nivoa IL-6, TNF i MCP-1, kao i kroz antiapoptotsko dejstvo, posredstvom PI3K (*engl.* phosphoinositide 3-kinase) /Akt (*engl.* protein kinase B) signalnog puta (Shang i sar., 2017). Ovakav histološki nalaz korelira sa *in vitro* rezultatima i onima dobijenim H&E bojenjem. Naime, medijatori

produkovani od strane SCIC i mikroglije, doprinose neuroinflamaciji i sledstvenoj demijelinizaciji u EAE, te je tako usled tretmana PERA neuroinflamacija ograničena, a time i procesi demijelinizacije.

Kada je GA u pitanju, podaci o njenom neuroprotektivnom dejstvu su brojniji. Tako, u *in vitro* mišjem modelu demijelinizacije indukovane lizolecitinom je pokazano da tretman GA snižava ekspresiju COX-2, NF- κ B, tenascina C, kao i hondroitin sulfat peptidoglikana u astrocitima, dok je u ćelijskim telima neurita i oligodendrocita uočeno povećanje ekspresije MBP (Siddiqui i sar., 2019), što ukazuje na njeno neuroprotektivno dejstvo. Dalje, studija ispitivanja uticaja GA na neurodegeneraciju na nivou hipokampusa koja nastaje kao posledica dijabetesa tipa 2 indukovano u pacovima, ukazuje da GA suprimira oštećenja neurona posredstvom antiapoptotskih efekata (Abdel-Moneim i sar., 2017). Slično, neuroprotektivni efekat je pokazan i u modelu ishemije CNS, s tom razlikom da su korišćene nanopartikule punjene GA ili sama GA. Upotreba ovakvih partikula ili same GA u modelu ishemije CNS kod pacova je pokazala antiapoptotsko dejstvo što je pokazano smanjenjem broja TUNEL⁺ (*engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling) ćelija (Zhao i sar., 2020). Mehanizam delovanja GA u kontekstu neuroinflamacijskih bolesti posebno je izučavan u animalnim modelima Alchajmerove bolesti. S tim u vezi, studija ispitivanja uticaja GA *in vitro* (BV-2 i Neuro-2A ćelije) i *in vivo* u modelu Alchajmerove bolesti indukovano kod miševa je pokazala značajan efekat na enzime koji učestvuju u acetilaciji NF- κ B. Naime, acetilacija dovodi do aktivacije NF- κ B i posledične produkcije proinflamacijskih citokina pospešujući dalju patogenezu, koja je pak, delovanjem GA smanjena zahvaljujući direktnoj inhibiciji enzima koji vrše acetilaciju ovog transkripcionog faktora (Kim i sar., 2011). Takođe, GA smanjuje depozite amiloida β u mišjem modelu Alchajmerove bolesti, i to kroz dvojnju aktivnost, povećavajući aktivnost enzima ADAM10 (*engl.* A disintegrin and metalloproteinase domain 10), a inhibirajući aktivnost enzima BACE1 (*engl.* Beta-Site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1), i time promoviše neamiloidogenu obradu apolipoproteina (Mori i sar., 2020). Ovi podaci ukazuju na relevantnost upotrebe PERA i PEGA u daljim istraživanjima tretmana neuroinflamacijskih, demijelinizirajućih i neurodegenerativnih bolesti.

Sumarno, rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da PERA i PEGA smanjuju težinu neurološkog deficita EAE, najverovatnije supresijom produkcije citokina IFN- γ i IL-17, kako od strane imunskih ćelija PLČ i CD4⁺ ćelija PLČ u kojima se generiše (auto)imunski odgovor, tako i od strane SCIC. Osim toga, PERA i PEGA u PLČ dovode do promene ekspresije gena koji učestvuju u polarizaciji CD4⁺ ćelija kao i nivoa NO, i time menjaju okruženje imunskih ćelija u kojem započinje imunski odgovor na encefalitogene. Ove promene u inflamacijskom okruženju encefalitogenih ćelija PLČ bi mogle da utiču na smanjenje njihovog patogenog potencijala na perifereiji. Pored toga, smanjenje produkcije NO od strane SCIC i BV2 ćelija mikroglije pod dejstvom PERA i PEGA, sprečava njegove toksične efekte u CNS. Takođe, PERA i PEGA značajno suprimiraju produkciju IL-6 i TNF od strane BV2 ćelija mikroglije, što ukazuje na jedan od potencijalnih mehanizama njihovog delovanja na EAE. Osim toga, jedan od mehanizama kojim PERA i PEGA ostvaruju svoj uticaj u EAE može biti i kroz smanjenje procentualne zastupljenosti aktiviranih populacija ćelija (CD25⁺, OX40⁺) unutar CD4⁺ ćelija populacije SCIC. Iako PERA *in vitro* ne menja udeo Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija unutar populacija imunskih ćelija PLČ i SCIC, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da PEGA značajno smanjuje procentualnu zastupljenost Th17 ćelija unutar populacije SCIC. *In vivo* rezultati toka bolesti su potkrepljeni histološkom analizom gde je pokazano da PERA i PEGA značajno smanjuju broj infiltrata i ćelija unutar infiltrata na poprečnim presecima kičmene moždine. Svi ovi rezultati zajedno ukazuju na efekat PERA i PEGA u smanjenju neuroinflamacije. Takođe, histološka analiza je pokazala da tretman PERA i PEGA smanjuje površinu zahvaćenu demijelinizacijom, što sugerise i njihov protektivni efekat.



Slika 44. Šematski prikaz *in vivo* efekata i efekta na broj infiltrata, broj ćelija unutar infiltrata i površine zahvaćene demijelinizacijom unutar poprečnog preseka kičmene moždine PERA/PEGA.

Ova istraživanja su dala uvid u neke od mehanizama delovanja novosintetisanih jedinjenja PERA i PEGA, kao potencijalnih pomoćnih terapeutika u neuroinflamacijskim i neurodegenerativnim stanjima. Međutim, potrebna su dalja ispitivanja u cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama delovanja ovih jedinjenja u relevantnim ćelijama, kao i ispitivanje ovih jedinjenja *ex vivo* u autoimunskim bolestima, kao i u drugim inflamacijskim stanjima.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata, iz ove doktorske disertacije se mogu izvesti sledeći zaključci:

I *In vitro* tretman PERA/PEGA ostvaruje imunomodulacijski efekat na sledeće ćelije uključene u patogenezu EAE:

i. Ćelije PLČ izolovane iz pacova imunizovanih HKM ili MOG₃₅₋₅₅ u CFA, i to:

- Bez uticaja na vijabilnost
- Smanjenjem produkcije/oslobađanja encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17
- Smanjenjem relativne ekspresije gena *P40*, a povećanje *Tgfb* usled tretmana PERA, ali bez promene *P19*, *P35* i *Il-6*, kao i smanjenjem relativne ekspresije gena *P35* i *Tgfb* usled tretmana PEGA, ali bez promene *P40*, *P19*, i *Il-6*
- Smanjenjem produkcije/oslobađanja citokina IFN- γ i IL-17 od strane CD4⁺ ćelija prečišćenih iz PLČ
- Bez uticaja na procentualnu zastupljenost apoptotičnih i proliferišućih CD4⁺ ćelija
- Bez uticaja na procentualnu zastupljenost aktivisanih CD4⁺ ćelija
- Bez uticaja na procentualnu zastupljenost Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija
- Povećanjem produkcije NO

ii. Ćelije mikroglije BV2 linije, i to:

- Bez uticaja na vijabilnost
- Smanjenjem produkcije NO
- Smanjenjem produkcije/oslobađanja proinflamacijskih citokina TNF i IL-6
- Promenom adhezivnih svojstava
- Bez uticaja na produkciju ROS i fagocitozu od strane ovih ćelija
- Bez uticaja na fenotipske karakteristike

iii. SCIC DA pacova obolelih od EAE, i to:

- Bez uticaja na vijabilnost
- Smanjenjem produkcije/oslobađanja encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17
- Bez uticaja na procentualni udeo apoptotičnih CD4⁺ ćelija među ovim ćelijama
- Smanjenjem zastupljenosti CD25⁺ i OX40⁺ ćelija među CD4⁺ ćelijama usled tretmana PERA, kao i smanjenje zastupljenosti CD25⁺ ćelija među CD4⁺ ćelijama usled tretmana PEGA
- Bez efekta na procentualnu zastupljenost Treg, Th1 i Th17 subpopulacija ćelija usled tretmana PERA, uz smanjenje procentualne zastupljenosti Th17 ćelija usled tretmana PEGA, ali bez efekta na zastupljenost Treg i Th1 subpopulacija ćelija
- Smanjenjem produkcije NO

II *In vivo* tretman PERA/PEGA ublažava težinu neurološkog deficita kod pacova sa EAE

III *In vivo* tretman PERA/PEGA dovodi do smanjenja broja infiltrata, smanjenja broja ćelija po infiltratu i smanjenja polja demijelinizacije na presecima kičmene moždine kod pacova sa EAE

Na osnovu prethodnih pojedinačnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da PERA i PEGA ostvaruju izvesni imunomodulacijski efekat na imunske ćelije uključene u patogenezu EAE *in vitro*, kao i da administracija PERA i PEGA u DA pacovima počev od 7 d.n.i. dovodi do ublažavanja neuroloških znakova ove bolesti. Ovo sugeriše da bi ovi derivati mogli biti razmotreni za dalja ispitivanja terapijskih mogućnosti u autoimunskim i hroničnim inflamacijskim bolestima.

7. Literatura

- Abdel-Moneim A, Yousef AI, Abd El-Twab SM, Abdel Reheim ES, Ashour MB. Gallic acid and p-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. *Metab Brain Dis*. 2017 Aug;32(4):1279-1286. doi: 10.1007/s11011-017-0039-8. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28573601.
- Abdullah A, Maged M, Hairul-Islam M I, Osama I A, Maha H, Manal A, Hamza H. Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by a novel agonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2019 Apr 26;14(4):e0215981. doi: 10.1371/journal.pone.0215981. Erratum in: *PLoS One*. 2019 Oct 10;14(10):e0223429. PMID: 31026283; PMCID: PMC6485712.
- Absinta M, Sati P, Masuzzo F, Nair G, Sethi V, Kolb H, Ohayon J, Wu T, Cortese ICM, Reich DS. Association of Chronic Active Multiple Sclerosis Lesions With Disability In Vivo. *JAMA Neurol*. 2019 Dec 1;76(12):1474-1483. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.2399. Erratum in: *JAMA Neurol*. 2019 Dec 1;76(12):1520. PMID: 31403674; PMCID: PMC6692692.
- Ao T, Kikuta J, Ishii M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules*. 2021 Nov 3;11(11):1624. doi: 10.3390/biom11111624. PMID: 34827621; PMCID: PMC8615708.
- Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int*. 2008 Jun;57(2):115-20. doi: 10.2332/allergolint.R-07-159. PMID: 18427164.
- Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2015 Sep 29;6:492. doi: 10.3389/fimmu.2015.00492. PMID: 26483787; PMCID: PMC4586507.
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000 Aug 7;192(3):393-404. doi: 10.1084/jem.192.3.393. PMID: 10934227; PMCID: PMC2193223.
- Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*. 2015. 5(35), 27540–27557. doi:10.1039/c5ra01911g
- Balasa R, Barcutean L, Balasa A, Motataianu A, Roman-Filip C, Manu D. The action of TH17 cells on blood brain barrier in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum Immunol*. 2020 May;81(5):237-243. doi: 10.1016/j.humimm.2020.02.009. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32122685.
- Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet*. 2017 Dec;33(12):960-970. doi: 10.1016/j.tig.2017.09.004. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28987266; PMCID: PMC5701819.
- Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Jul;84(7):532-43. doi: 10.1007/s00109-006-0065-1. Epub 2006 Jun 14. PMID: 16773356.
- Becher B, Durell BG, Miga AV, Hickey WF, Noelle RJ. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J Exp Med*. 2001 Apr 16;193(8):967-74. doi: 10.1084/jem.193.8.967. PMID: 11304557; PMCID: PMC2193406.
- Benito-León J, Laurence M. The Role of Fungi in the Etiology of Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2017 Oct 16;8:535. doi: 10.3389/fneur.2017.00535. PMID: 29085329; PMCID: PMC5650687.

- Bernstein N, Akram M, Daniyal M, Koltai H, Fridlender M, Gorelick J. Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. *Advances in Agronomy*. 2018. 150, 131-183. doi: 10.1016/bs.agron.2018.02.003
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. doi: 10.1038/nature04753. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648838.
- Bhuia MS, Rahaman MM, Islam T, Bappi MH, Sikder MI, Hossain KN, Akter F, Al Shamsh Prottay A, Rokonuzzman M, Güreş ES, Calina D, Islam MT, Sharifi-Rad J. Neurobiological effects of gallic acid: current perspectives. *Chin Med*. 2023 Mar 15;18(1):27. doi: 10.1186/s13020-023-00735-7. PMID: 36918923; PMCID: PMC10015939.
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res*. 1992 Apr;31(4):616-21. doi: 10.1002/jnr.490310405. PMID: 1578513.
- Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2014 Aug;128(2):191-213. doi: 10.1007/s00401-014-1310-2. Epub 2014 Jun 22. PMID: 24952885.
- Brahmachari S, Pahan K. Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. *Minerva Med*. 2008 Apr;99(2):105-18. PMID: 18431321; PMCID: PMC2570259.
- Brandstadter R, Katz Sand I. The use of natalizumab for multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 Jun 28;13:1691-1702. doi: 10.2147/NDT.S114636. PMID: 28721050; PMCID: PMC5499927.
- Brenner T, Brocke S, Szafer F, Sobel RA, Parkinson JF, Perez DH, Steinman L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1997 Mar 15;158(6):2940-6. PMID: 9058833.
- Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. (2011). A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp, F., Parnham, M. (eds) *Principles of Immunopharmacology*. Birkhäuser Basel. doi: 10.1007/978-3-0346-0136-8_2
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Oct;8(10):766-75. doi: 10.1038/nrn2214. PMID: 17882254.
- Calvi A, Haider L, Prados F, Tur C, Chard D, Barkhof F. In vivo imaging of chronic active lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2022 Apr;28(5):683-690. doi: 10.1177/1352458520958589. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32965168; PMCID: PMC8978472.
- Cao L, He C. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neurosci Bull*. 2013 Apr;29(2):189-98. doi: 10.1007/s12264-013-1324-0. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23558588; PMCID: PMC5561884.
- Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):666-73. doi: 10.1038/ni.1887. Epub 2010 Jul 20. Erratum in: *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):271. PMID: 20644572; PMCID: PMC3388799.
- Chen WP, Jin GJ, Xiong Y, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Rosmarinic acid down-regulates NO and PGE₂ expression via MAPK pathway in rat chondrocytes. *J Cell Mol Med*. 2018 Jan;22(1):346-353. doi: 10.1111/jcmm.13322. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28945000; PMCID: PMC5742733.

- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneri P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*. 2012; 2(3):228-243. doi: 10.3390/agriculture2030228
- Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2018 May 15;318:1-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.015. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29606295.
- Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. 2010 Mar-Apr;33(2):91-101. doi: 10.1097/WNF.0b013e3181cbf825. PMID: 20061941; PMCID: PMC2859693.
- Contarini G, Giusti P, Skaper SD. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice. *Methods Mol Biol*. 2018;1727:353-360. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_26. PMID: 29222794.
- Cosmi L, Maggi L, Santarasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. 2014 Jan;85(1):36-42. doi: 10.1002/cyto.a.22348. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24009159.
- Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):173-91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x. PMID: 19426222; PMCID: PMC2729757.
- Danilov AI, Andersson M, Bavand N, Wiklund NP, Olsson T, Brundin L. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003 Mar;136(1-2):112-8. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00464-2. PMID: 12620649.
- Dhingra MS, Dhingra S, Kumria R, Chadha R, Singh T, Kumar A, Karan M. Effect of trimethylgallic acid esters against chronic stress-induced anxiety-like behavior and oxidative stress in mice. *Pharmacol Rep*. 2014 Aug;66(4):606-12. doi: 10.1016/j.pharep.2014.01.004. Epub 2014 Apr 25. PMID: 24948061.
- Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012 Mar 13;78(11):823-32. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f6f0. PMID: 22411958; PMCID: PMC3304944.
- Domitrović R, Skoda M, Vasiljev Marchesi V, Cvijanović O, Pernjak Pugel E, Stefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:370-8. doi: 10.1016/j.fct.2012.10.021. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23116643.
- Dong X, Luo S, Hu D, Cao R, Wang Q, Meng Z, Feng Z, Zhou W, Song W. Gallic acid inhibits neuroinflammation and reduces neonatal hypoxic-ischemic brain damages. *Front Pediatr*. 2022 Dec 22;10:973256. doi: 10.3389/fped.2022.973256. PMID: 36619526; PMCID: PMC9813953.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004 Feb;3(2):104-10. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00663-x. PMID: 14747002.
- El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010 Jun;5(2):189-97. doi: 10.1007/s11481-009-9188-9. Epub 2010 Jan 27. PMID: 20107924; PMCID: PMC2866798.
- Evangelista MG, Castro SB, Alves CC, Dias AT, Souza VW, Reis LB, Silva LC, Castañón MC, Farias RE, Juliano MA, Ferreira AP. Early IFN- γ production together with decreased expression of TLR3 and TLR9 characterizes EAE development conditional on the presence of myelin.

- Autoimmunity. 2016 Jun;49(4):258-67. doi: 10.3109/08916934.2016.1141898. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26911613.
- Fachel FNS, Schuh RS, Veras KS, Bassani VL, Koester LS, Henriques AT, Braganhol E, Teixeira HF. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. *Neurochem Int.* 2019 Jan;122:47-58. doi: 10.1016/j.neuint.2018.11.003. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30439384.
- Fan Y, Piao CH, Hyeon E, Jung SY, Eom JE, Shin HS, Song CH, Chai OH. Gallic acid alleviates nasal inflammation via activation of Th1 and inhibition of Th2 and Th17 in a mouse model of allergic rhinitis. *Int Immunopharmacol.* 2019 May;70:512-519. doi: 10.1016/j.intimp.2019.02.025. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30884431.
- Fan YT, Yin GJ, Xiao WQ, Qiu L, Yu G, Hu YL, Xing M, Wu DQ, Cang XF, Wan R, Wang XP, Hu GY. Rosmarinic Acid Attenuates Sodium Taurocholate-Induced Acute Pancreatitis in Rats by Inhibiting Nuclear Factor- κ B Activation. *Am J Chin Med.* 2015;43(6):1117-35. doi: 10.1142/S0192415X15500640. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26364660
- Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rego P, Oliveira CO, Fontana AG, de Paula RF, Santos MP, Pradella F, Moraes AS, Oliveira EC, Longhini AL, Rezende AC, Vaisberg MW, Santos LM. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci Ther.* 2013 Apr;19(4):269-77. doi: 10.1111/cns.12071. PMID: 23521914; PMCID: PMC6493393.
- Fei X, Je IG, Shin TY, Kim SH, Seo SY. Synthesis of Gallic Acid Analogs as Histamine and Pro-Inflammatory Cytokine Inhibitors for Treatment of Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation. *Molecules.* 2017 May 29;22(6):898. doi: 10.3390/molecules22060898. PMID: 28555061; PMCID: PMC6152652.
- Fernandes FH, Salgado HR. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Crit Rev Anal Chem.* 2016 May 3;46(3):257-65. doi: 10.1080/10408347.2015.1095064. PMID: 26440222.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010 Oct;162(1):1-11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x. PMID: 20682002; PMCID: PMC2990924.
- Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008 Sep;7(9):852-8. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70192-3. PMID: 18703007.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):12-8. doi: 10.1016/j.it.2006.11.004. Epub 2006 Nov 28. PMID: 17129764.
- Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and Other CD20⁺ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2017 Oct;14(4):835-841. doi: 10.1007/s13311-017-0557-4. PMID: 28695471; PMCID: PMC5722762.
- Gerogianni PS, Chatziathanasiadou MV, Diamantis DA, Tzakos AG, Galaris D. Lipophilic ester and amide derivatives of rosmarinic acid protect cells against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis: The potential role of intracellular accumulation and labile iron chelation. *Redox Biol.* 2018 May;15:548-556. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.014. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29413966; PMCID: PMC5975196.

- Ghasemzadeh Rahbardar M, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomed Pharmacother.* 2017 Feb;86:441-449. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.049. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28012923.
- Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020 Oct;393(10):1779-1795. doi: 10.1007/s00210-020-01935-w. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32725282.
- Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med.* 1995 Nov;1(7):795-805. PMID: 8612202; PMCID: PMC2230023.
- Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain.* 2000 Mar;123 Pt 3:508-18. doi: 10.1093/brain/123.3.508. PMID: 10686174.
- Gold DP, Schroder K, Powell HC, Kelly CJ. Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1997 Nov;27(11):2863-9. doi: 10.1002/eji.1830271118. PMID: 9394811.
- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012 Jul;248(1):87-103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x. PMID: 22725956; PMCID: PMC5967887.
- Greenfield AL, Hauser SL. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol.* 2018 Jan;83(1):13-26. doi: 10.1002/ana.25119. PMID: 29244240; PMCID: PMC5876115.
- Grifka-Walk HM, Giles DA, Segal BM. IL-12-polarized Th1 cells produce GM-CSF and induce EAE independent of IL-23. *Eur J Immunol.* 2015 Oct;45(10):2780-6. doi: 10.1002/eji.201545800. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26220255; PMCID: PMC5352159.
- Grigoriadis N, van Pesch V; ParadigMS Group. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol.* 2015 Oct;22 Suppl 2:3-13. doi: 10.1111/ene.12798. PMID: 26374508.
- Grochowska M, Laskus T, Radkowski M. Gut Microbiota in Neurological Disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2019 Dec;67(6):375-383. doi: 10.1007/s00005-019-00561-6. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31578596; PMCID: PMC6805802.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 2005 Jun;76(2):126-52. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.001. PMID: 16115721.
- Haase S, Linker RA. (2021). Inflammation in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 14. doi: 10.1177/17562864211007687
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011 Jul;134(Pt 7):1914-24. doi: 10.1093/brain/awr128. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21653539; PMCID: PMC3122372.
- Hampe CS. B Cell in Autoimmune Diseases. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:215308. doi: 10.6064/2012/215308. PMID: 23807906; PMCID: PMC3692299.

- Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology*. 2010 Jun 8;74(23):1905-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e24124. PMID: 20530326; PMCID: PMC2882222.
- Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016 Jun;22(6 Suppl):s159-70. PMID: 27356025.
- Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med*. 2020 Dec;133(12):1380-1390.e2. doi: 10.1016/j.amjmed.2020.05.049. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32682869; PMCID: PMC7704606.
- Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol*. 2013 Nov;28(11):867-74. doi: 10.1007/s10654-013-9853-4. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24146047; PMCID: PMC3898140.
- Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009 Dec;66(6):739-53. doi: 10.1002/ana.21800. PMID: 20035511.
- Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):185-95. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.008. PMID: 15850657.
- Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 26(2), 83-94.
- Ho TY, Lo HY, Liu IC, Huang SL, Hsiang CY. Rosmarinic acid ameliorated psoriatic skin inflammation in mice through the novel inhibition of the interleukin-17A/interleukin-17A receptor interaction. *Food Funct*. Jun 20;13(12):6802-6812. doi: 10.1039/d2fo00417h. PMID: 35674182.
- Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:263-283. doi: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00019-5. PMID: 28987175; PMCID: PMC7149979.
- Hohlfeld R, Dornmair K, Meinel E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol*. 2016 Feb;15(2):198-209. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00334-8. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26724103.
- Huseby ES, Huseby PG, Shah S, Smith R, Stadinski BD. Pathogenic CD8 T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol*. 2012 Mar 29;3:64. doi: 10.3389/fimmu.2012.00064. PMID: 22566945; PMCID: PMC3341980.
- Ibiza S, Serrador J. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología*. 2008. 27(3), 103-117. doi:10.1016/S0213-9626(08)70058-1
- Ishijima T, Nakajima K. Inflammatory cytokines TNF α , IL-1 β , and IL-6 are induced in endotoxin-stimulated microglia through different signaling cascades. *Sci Prog*. 2021 Oct;104(4):368504211054985. doi: 10.1177/00368504211054985. PMID: 34821182; PMCID: PMC10450609.
- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011 Jul;74(1):1-13. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x. PMID: 21338381.

- Jahan-Abad AJ, Karima S, Shateri S, Baram SM, Rajaei S, Morteza-Zadeh P, Borhani-Haghighi M, Salari AA, Nikzamir A, Gorji A. Serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathology*. 2020 Feb;40(1):84-92. doi: 10.1111/neup.12612. Epub 2019 Nov 10. PMID: 31709666.
- Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, Jin YH, Park YS, Park CS. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol*. 2011 Sep;11(9):1271-7. doi: 10.1016/j.intimp.2011.04.007. Epub 2011 Apr 17. PMID: 21504802.
- Javalkar V, McGe J, Minagar A. Clinical Manifestations of Multiple Sclerosis: An Overview. *Multiple Sclerosis*. 2016. 1-12. doi: 10.1016/B978-0-12-800763-1.00001-4
- Ji Q, Goverman J. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1103:157-66. doi: 10.1196/annals.1394.017. Epub 2007 Mar 21. PMID: 17376824.
- Jiang K, Ma X, Guo S, Zhang T, Zhao G, Wu H, Wang X, Deng G. Anti-inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice. *Inflammation*. 2018 Mar;41(2):437-448. doi: 10.1007/s10753-017-0700-8. PMID: 29204872.
- Jiang Z, Jiang JX, Zhang GX. Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett*. 2014 Jul;160(1):17-22. doi: 10.1016/j.imlet.2014.03.006. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24698730; PMCID: PMC6186449.
- Jin BR, Chung KS, Cheon SY, Lee M, Hwang S, Noh Hwang S, Rhee KJ, An HJ. Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation. *Sci Rep*. 2017 Apr 6;7:46252. doi: 10.1038/srep46252. PMID: 28383063; PMCID: PMC5382778
- Kahl KG, Zielasek J, Uttenenthal LO, Rodrigo J, Toyka KV, Schmidt HH. Protective role of the cytokine-inducible isoform of nitric oxide synthase induction and nitrosative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis of the DA rat. *Journal of neuroscience research*. 2003. 73(2), 198-205.
- Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):132-40. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.06.012. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20600868; PMCID: PMC7126972.
- Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Apr 2;8(4):a029025. doi: 10.1101/cshperspect.a029025. PMID: 29358315; PMCID: PMC5880159.
- Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015 Jun;28(3):193-205. doi: 10.1097/WCO.0000000000000206. PMID: 25887774.
- Kaur S, Muthuraman A. Ameliorative effect of gallic acid in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Toxicol Rep*. 2019 Jun 7;6:505-513. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.06.001. PMID: 31211096; PMCID: PMC6562321.
- Kim HK, Lee JJ, Lee JS, Park YM, Yoon TR. Rosmarinic acid down-regulates the LPS-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) via the MAPK pathway in bone-marrow derived dendritic cells. *Molecules and Cells*. 2008. 26(6), 583-589.

- Kim MJ, Seong AR, Yoo JY, Jin CH, Lee YH, Kim YJ, Lee J, Jun WJ, Yoon HG. Gallic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, suppresses β -amyloid neurotoxicity by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Dec;55(12):1798-808. doi: 10.1002/mnfr.201100262. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22038937.
- Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*. 2017 Mar;27(2):123-137. doi: 10.1111/bpa.12454. Epub 2017 Jan 11. PMID: 27792289; PMCID: PMC8029141.
- Kitsati N, Fokas D, Ouzouni MD, Mantzaris MD, Barbouti A, Galaris D. Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-Induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *J Agric Food Chem*. 2012 Aug 15;60(32):7873-9. doi: 10.1021/jf301237y. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22827723.
- Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013 Jan 15;324(1-2):10-6. doi: 10.1016/j.jns.2012.10.021. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23154080; PMCID: PMC7127277.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1415-20. PMID: 8068938.
- Koprivica I, Jonić N, Diamantis D, Gajić D, Saksida T, Pejnović N, Tzakos AG, Stojanović I. Phenethyl ester of rosmarinic acid attenuates autoimmune responses during type 1 diabetes development in mice. *Life Sci*. 2022 Jan 1;288:120184. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120184. Epub 2021 Nov 25. PMID: 34838848.
- Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*. 2006 Sep;116(9):2385-92. doi: 10.1172/JCI28330. PMID: 16955140; PMCID: PMC1555668.
- Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2031-5. doi: 10.1002/eji.200939568. PMID: 19672898.
- Krishnarajah S, Becher B. T_H Cells and Cytokines in Encephalitogenic Disorders. *Front Immunol*. 2022 Mar 7;13:822919. doi: 10.3389/fimmu.2022.822919. PMID: 35320935; PMCID: PMC8934849.
- Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017 Jan;133(1):13-24. doi: 10.1007/s00401-016-1653-y. Epub 2016 Dec 17. PMID: 27988845.
- Kurschus F. (2015). T cell mediated pathogenesis in EAE: molecular mechanisms. *Biomedical journal*, 38(3).
- La Mantia L, Munari LM, Lovati R. Glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 May 12;(5):CD004678. doi: 10.1002/14651858.CD004678.pub2. PMID: 20464733.
- Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017 Feb;133(2):223-244. doi: 10.1007/s00401-016-1631-4. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27766432; PMCID: PMC5250666.

- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007 Apr;17(2):210-8. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x. PMID: 17388952; PMCID: PMC8095582.
- Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3715-23. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.004. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21854776.
- Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Mar 1;8(3):a028936. doi: 10.1101/cshperspect.a028936. PMID: 29358320; PMCID: PMC5830904.
- Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Dec;37(7):698-710. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01189.x. PMID: 21696413.
- Lazarević M, Djedovic N, Stanisavljević S, Dimitrijević M, Stegnjaić G, Krishnamoorthy G, Mostarica Stojković M, Miljković Đ, Jevtić B. Complete Freund's adjuvant-free experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats is a valuable tool for multiple sclerosis studies. *J Neuroimmunol.* 2021 May 15;354:577547. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577547. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33765502.
- Lazarević M, Stegnjaić G, Jevtić B, Despotović S, Ignjatović Đ, Stanisavljević S, Nikolovski N, Momčilović M, Fraser GL, Dimitrijević M, Miljković Đ. Increased regulatory activity of intestinal innate lymphoid cells type 3 (ILC3) prevents experimental autoimmune encephalomyelitis severity. *J Neuroinflammation.* 2024 Jan 18;21(1):26. doi: 10.1186/s12974-024-03017-7. PMID: 38238790; PMCID: PMC10795263.
- Li Z, Feng H, Wang Y, Shen B, Tian Y, Wu L, Zhang Q, Jin M, Liu G. Rosmarinic acid protects mice from lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting MAPKs/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2019 Feb;67:465-472. doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.052. Epub 2018 Dec 28. PMID: 30597292.
- Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, Shieh CJ, Shiao MS, Chen YJ. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 31;51(27):7907-12. doi: 10.1021/jf034729d. PMID: 14690372.
- Liu JX, Zhang Y, Hu QP, Li JQ, Liu YT, Wu QG, Wu JG, Lai XP, Zhang ZD, Li X, Li G. Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid-4-O- β -D-glucoside in reducing acute lung injury in mice infected with influenza virus. *Antiviral Res.* 2017 Aug;144:34-43. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.04.010. Epub 2017 Apr 29. PMID: 28461072.
- Liu S, Li J, Feng LH. Gallic acid regulates immune response in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Immun Inflamm Dis.* 2023 Feb;11(2):e782. doi: 10.1002/iid3.782. PMID: 36840490; PMCID: PMC9933205.
- Liu Y, Xu X, Tang H, Pan Y, Hu B, Huang G. Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 2021. 47(5), 1-11.
- Liu YL, Hsu CC, Huang HJ, Chang CJ, Sun SH, Lin AM. Gallic Acid Attenuated LPS-Induced Neuroinflammation: Protein Aggregation and Necroptosis. *Mol Neurobiol.* 2020 Jan;57(1):96-104. doi: 10.1007/s12035-019-01759-7. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31832973.
- Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol.* 2011 Sep;9(3):409-16. doi: 10.2174/157015911796557911. PMID: 22379455; PMCID: PMC3151595.

- Luo C, Zou L, Sun H, Peng J, Gao C, Bao L, Ji R, Jin Y, Sun S. A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. 11, 516846. doi: 10.3389/fphar.2020.00153
- Lv R, Du L, Liu X, Zhou F, Zhang Z, Zhang L. Rosmarinic acid attenuates inflammatory responses through inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway in a mouse model of Parkinson's disease. *Life Sci*. 2019 Apr 15;223:158-165. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.030. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30880023.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Stevanovic I. Aminoguanidine and N-acetyl-cysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. *Redox Rep*. 2011;16(4):166-72. doi: 10.1179/1351000211Y.0000000007. PMID: 21888767; PMCID: PMC6837682.
- Masli S, Turpie B. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology*. 2009 May;127(1):62-72. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02933.x. PMID: 18795974; PMCID: PMC2678182.
- Maurya H, Mangal V, Gandhi S, Prabhu K, Ponnudurai K. Prophylactic antioxidant potential of gallic Acid in murine model of sepsis. *Int J Inflam*. 2014;2014:580320. doi: 10.1155/2014/580320. Epub 2014 Jun 11. PMID: 25018890; PMCID: PMC4074961.
- McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res*. 2003 Sep;313(3):259-69. doi: 10.1007/s00441-003-0779-0. Epub 2003 Aug 14. PMID: 12920643.
- Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2007 Oct;6(10):903-12. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70243-0. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2009 Aug;8(8):699. PMID: 17884680.
- Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010 Mar;9(5):A387-94. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.010. Epub 2009 Nov 20. PMID: 19932200.
- Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Popadic D, Cvetkovic I, Mostarica-Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *J Neurosci Res*. 2006 Aug 1;84(2):379-88. doi: 10.1002/jnr.20883. PMID: 16676327.
- Mohammad MG, Hassanpour M, Tsai VW, Li H, Ruitenber MJ, Booth DW, Serrats J, Hart PH, Symonds GP, Sawchenko PE, Breit SN, Brown DA. Dendritic cells and multiple sclerosis: disease, tolerance and therapy. *Int J Mol Sci*. 2012 Dec 27;14(1):547-62. doi: 10.3390/ijms14010547. PMID: 23271370; PMCID: PMC3565281.
- Momcilović M, Miljković Z, Popadić D, Miljković D, Mostarica-Stojković M. Kinetics of IFN-gamma and IL-17 expression and production in active experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats. *Neurosci Lett*. 2008 Dec 12;447(2-3):148-52. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.082. Epub 2008 Oct 7. PMID: 18852028.
- Mori T, Koyama N, Yokoo T, Segawa T, Maeda M, Sawmiller D, Tan J, Town T. Gallic acid is a dual α/β -secretase modulator that reverses cognitive impairment and remediates pathology in

- Alzheimer mice. *J Biol Chem.* 2020 Nov 27;295(48):16251-16266. doi: 10.1074/jbc.RA119.012330. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32913125; PMCID: PMC7705308.
- Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol.* 2017 Feb-Mar;149-150:1-20. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.002. Epub 2017 Jan 28. PMID: 28143732.
- Mundt S, Mrdjen D, Utz SG, Greter M, Schreiner B, Becher B. Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation. *Sci Immunol.* 2019 Jan 25;4(31):eaau8380. doi: 10.1126/sciimmunol.aau8380. PMID: 30679199.
- Nadeem M, Imran M, Aslam Gondal T, Imran A, Shahbaz M, Muhammad Amir R, Wasim Sajid M, Batool Qaisrani T, Atif M, Hussain G, Salehi B, Adrian Ostrander E, Martorell M, Martins N. Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review. *Applied Sciences.* 2019. 9(15), 3139. doi: 10.3390/app9153139
- Najafi S, Ghane M, Yousefzadeh-Chabok S, Amiri M. The High Prevalence of the Varicella Zoster Virus in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in the North of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016 Mar 12;9(3):e34158. doi: 10.5812/jjm.34158. PMID: 27226879; PMCID: PMC4877442.
- Nayeem N, SMB A. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. *Journal of Applied Pharmacy.* 2016. 08(02). doi:10.4172/1920-4159.1000213
- Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2001 Mar 27;56(6):702-8. doi: 10.1212/wnl.56.6.702. PMID: 11288751.
- Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, Sonogo F, Mirchandani A, Nascimento DC, Cunha FQ, Liew FY. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 31;108(22):9220-5. doi: 10.1073/pnas.1100667108. Epub 2011 May 16. PMID: 21576463; PMCID: PMC3107290.
- Nuyts A, Lee W, Bashir-Dar R, Berneman Z, Cools N. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? *Multiple Sclerosis Journal.* 2013;19(8):995-1002. doi:10.1177/1352458512473189
- Ochs J, Nissimov N, Torke S, Freier M, Grondey K, Koch J, Klein M, Feldmann L, Gudd C, Bopp T, Häusser-Kinzel S, Weber MS. Proinflammatory CD20+ T cells contribute to CNS-directed autoimmunity. *Sci Transl Med.* 2022 Mar 30;14(638):eabi4632. doi: 10.1126/scitranslmed.abi4632. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35353539.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3750-4. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3750. PMID: 18768826; PMCID: PMC2619513.
- Olsson T. Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *J Neuroimmunol.* 1992 Oct;40(2-3):211-8. doi: 10.1016/0165-5728(92)90135-8. PMID: 1430152.
- Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol.* 2012 Sep 18;46(18):10271-8. doi: 10.1021/es301599f. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22916708.

- Oukka M. (2007). Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(Suppl 3), iii87. doi: 10.1136/ard.2007.078527
- Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 26;15(8):1096-101. doi: 10.1038/nn.3161. Erratum in: *Nat Neurosci*. 2014 Sep;17(9):1286. PMID: 22837040; PMCID: PMC7097282.
- Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med*. 1995 Jun;27(3):369-77. doi: 10.3109/07853899509002590. PMID: 7546627.
- Pandurangan AK, Mohebal N, Esa NM, Looi CY, Ismail S, Saadatdoust Z. Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. *Int Immunopharmacol*. 2015 Oct;28(2):1034-43. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.019. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26319951.
- Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jul 2;8(7):a028951. doi: 10.1101/cshperspect.a028951. PMID: 29440325; PMCID: PMC6027932.
- Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett*. 2011 Dec 1;585(23):3747-57. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.064. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21477588.
- Petersen, M. Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem Rev* 12, 207–227 (2013). doi: 10.1007/s11101-013-9282-8
- Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Mostarica Stojkovic M, Miljković D. Nitric oxide inhibits CXCL12 expression in neuroinflammation. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jul;91(6):427-34. doi: 10.1038/icb.2013.23. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23732617.
- Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 May;14:35-45. doi: 10.1016/j.msard.2017.03.014. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28619429.
- Pike SC, Welsh N, Linzey M, Gilli F. Theiler's virus-induced demyelinating disease as an infectious model of progressive multiple sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2022 Oct 13;15:1019799. doi: 10.3389/fnmol.2022.1019799. PMID: 36311024; PMCID: PMC9606571.
- Plosker GL. Interferon- β -1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011 Jan;25(1):67-88. doi: 10.2165/11206430-000000000-00000. PMID: 21128695.
- Priyadarshi K, Shirsath K, Waghela NB, Sharma A, Kumar A, Pathak C. Surface modified PAMAM dendrimers with gallic acid inhibit, cell proliferation, cell migration and inflammatory response to augment apoptotic cell death in human colon carcinoma cells. *J Biomol Struct Dyn*. 2021 Nov;39(18):6853-6869. doi: 10.1080/07391102.2020.1802344. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32752940.
- Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:182-91. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.042. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25823807; PMCID: PMC7094661.
- Qin Y, Lu M, Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int*. 2008 Feb;32(2):224-8. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.08.028. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17920943.

- Quan W, Liu HX, Zhang W, Lou WJ, Gong YZ, Yuan C, Shao Q, Wang N, Guo C, Liu F. Cardioprotective effect of rosmarinic acid against myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppression of the NF- κ B inflammatory signalling pathway and ROS production in mice. *Pharm Biol.* 2021 Dec;59(1):222-231. doi: 10.1080/13880209.2021.1878236. PMID: 33600735; PMCID: PMC7894452.
- Ramsaransing GS, De Keyser J. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta Neurol Scand.* 2006 Jun;113(6):359-69. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00637.x. PMID: 16674602.
- Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci.* 2012 Jul 26;15(8):1074-7. doi: 10.1038/nn.3168. PMID: 22837037; PMCID: PMC7097342.
- Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Biol.* 2012;900:363-80. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4_18. PMID: 22933079.
- Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods.* 2004 Oct;293(1-2):127-42. doi: 10.1016/j.jim.2004.07.006. PMID: 15541283.
- Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, Duarte CM, Serra AT, Pinto R, Freitas M, Fernandes E, Silva-Lima B, Mota-Filipe H, Sepodes B. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 May;116(5):398-413. doi: 10.1111/bcpt.12335. Epub 2014 Nov 6. PMID: 25287116.
- Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2022 Jan 24;17:121-139. doi: 10.1146/annurev-pathol-052920-040318. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34606377.
- Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013 Oct 15;333(1-2):76-87. doi: 10.1016/j.jns.2013.03.002. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23578791; PMCID: PMC3726569.
- Rostami MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol.* 2009 Oct;40(2):139-56. doi: 10.1007/s12035-009-8077-9. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19629762.
- Ruprecht K. The role of Epstein-Barr virus in the etiology of multiple sclerosis: a current review. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020 Dec;16(12):1143-1157. doi: 10.1080/1744666X.2021.1847642. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33152255.
- Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K, Huitinga I, 't Hart BA, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 1995 Feb;56(2):207-17. doi: 10.1016/0165-5728(94)00154-g. PMID: 7860716.
- Sarkaki A, Farbood Y, Gharib-Naseri MK, Badavi M, Mansouri MT, Haghparast A, Mirshekar MA. Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug;93(8):687-94. doi: 10.1139/cjpp-2014-0546. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26222320.
- Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3758-63. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.047. Epub 2011 Sep 8. PMID: 21910991.

- Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3758-63. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.047. Epub 2011 Sep 8. PMID: 21910991.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PMID: 10653597.
- Seo JS, Choi J, Leem YH, Han PL. Rosmarinic Acid Alleviates Neurological Symptoms in the G93A-SOD1 Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurobiol.* 2015 Dec;24(4):341-50. doi: 10.5607/en.2015.24.4.341. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26713081; PMCID: PMC4688333.
- Shang AJ, Yang Y, Wang HY, Tao BZ, Wang J, Wang ZF, Zhou DB. Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutr Neurosci.* 2017 Apr;20(3):172-179. doi: 10.1080/1028415X.2015.1103460. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26796989.
- Shen YH, Wang LY, Zhang BB, Hu QM, Wang P, He BQ, Bao GH, Liang JY, Wu FH. Ethyl Rosmarinate Protects High Glucose-Induced Injury in Human Endothelial Cells. *Molecules.* 2018 Dec 19;23(12):3372. doi: 10.3390/molecules23123372. PMID: 30572638; PMCID: PMC6321336.
- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 2009 Jan;54(1):15-39. doi: 10.1038/jhg.2008.5. Epub 2009 Jan 9. PMID: 19158813.
- Siddiqui S, Kamal A, Khan F, Jamali KS, Saify ZS. Gallic and vanillic acid suppress inflammation and promote myelination in an in vitro mouse model of neurodegeneration. *Mol Biol Rep.* 2019 Feb;46(1):997-1011. doi: 10.1007/s11033-018-4557-1. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30569390.
- Sie C, Korn T, Mitsdoerffer M. Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Exp Neurol.* 2014 Dec;262 Pt A:18-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.03.009. Epub 2014 Mar 27. PMID: 24681001.
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol.* 2013 Aug;34(8):410-22. doi: 10.1016/j.it.2013.04.006. Epub 2013 May 21. PMID: 23707039; PMCID: PMC3752929.
- Singla E, Dharwal V, Naura AS. Gallic acid protects against the COPD-linked lung inflammation and emphysema in mice. *Inflamm Res.* 2020 Apr;69(4):423-434. doi: 10.1007/s00011-020-01333-1. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32144443.
- Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Tervaert JW, Damoiseaux J, Hupperts R. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2009 Aug 13;4(8):e6635. doi: 10.1371/journal.pone.0006635. PMID: 19675671; PMCID: PMC2721656.
- Sohrabi F, Dianat M, Badavi M, Radan M, Mard SA. Gallic acid suppresses inflammation and oxidative stress through modulating Nrf2-HO-1-NF- κ B signaling pathways in elastase-induced emphysema in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Oct;28(40):56822-56834. doi: 10.1007/s11356-021-14513-1. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34080114.
- Sosa RA, Murphey C, Robinson RR, Forsthuber TG. IFN- γ ameliorates autoimmune encephalomyelitis by limiting myelin lipid peroxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Sep

- 8;112(36):E5038-47. doi: 10.1073/pnas.1505955112. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26305941; PMCID: PMC4568689.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707. PMID: 15771584.
- Stanely Mainzen Prince P, Kumar MR, Selvakumari CJ. Effects of gallic acid on brain lipid peroxide and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011 Mar-Apr;25(2):101-7. doi: 10.1002/jbt.20365. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20957663.
- Stegnjaić G, Jevtić B, Lazarević M, Ignjatović Đ, Tomić M, Nikolovski N, Bjelobaba I, Momčilović M, Dimitrijević M, Miljković Đ, Stanisavljević S. Brain inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Dark Agouti rats with spinal cord homogenate. *Immunol Lett.* 2024 Jun;267:106852. doi: 10.1016/j.imlet.2024.106852. Epub 2024 Mar 19. PMID: 38508497.
- Stegnjaić G, Lazarević M, Diamantis DA, Djedović N, Jevtić B, Stanisavljević S, Dimitrijević M, Momčilović M, Tzakos AG, Miljković Đ. Phenethyl ester of rosmarinic acid ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett.* 2022 Dec;251-252:9-19. doi: 10.1016/j.imlet.2022.09.006. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36183900.
- Stegnjaić G, Tsailanis AD, Lazarević M, Gkalpinos VK, Djedovic N, Antoniou T, Stanisavljević S, Dimitrijević M, Momčilović M, Miljković Đ, Tzakos AG, Jevtić B. Phenethyl Ester of Gallic Acid Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Molecules.* 2022 Dec 10;27(24):8770. doi: 10.3390/molecules27248770. PMID: 36557903; PMCID: PMC9782083.
- Tanaka Y, Arima Y, Higuchi K, Ohki T, Elfeky M, Ota M, Kamimura D, Murakami M. EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4+ T Cells. *Bio Protoc.* 2017 Jul 5;7(13):e2370. doi: 10.21769/BioProtoc.2370. PMID: 34541112; PMCID: PMC8413655.
- Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2016 May;16(5):295-309. doi: 10.1038/nri.2016.36. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27087661.
- Thammason H, Khetkam P, Pabuprapap W, Suksamrarn A, Kunthalert D. Ethyl rosmarinate inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2018 Apr 5;824:17-23. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.042. Epub 2018 Jan 31. PMID: 2939115.
- Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guérin M, Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999 Aug;30(2):153-63. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00014-4. PMID: 10525172.
- Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T, Markovic M, Miljkovic D, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol.* 2001 Oct 1;119(2):183-91. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00391-5. PMID: 11585620.
- Tsiogkas SG, Apostolopoulou K, Mavropoulos A, Grammatikopoulou MG, Dardiotis E, Zafiriou E, Bogdanos DP. Gallic acid diminishes pro-inflammatory interferon- γ - and interleukin-17-producing sub-populations in vitro in patients with psoriasis. *Immunol Res.* 2023 Jun;71(3):475-487. doi: 10.1007/s12026-023-09361-9. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36754913; PMCID: PMC10185625.

- Vaitaitis GM, Yussman MG, Wagner DH Jr. A CD40 targeting peptide prevents severe symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2019 Jul 15;332:8-15. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.03.013. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30925295; PMCID: PMC6535109.
- Vukmanović S, Mostarica-Stojković M, Zalud I, Ramić Z, Lukić ML. Analysis of T cell subsets after induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in susceptible and resistant strains of rats. *J Neuroimmunol*. 1990 Apr;27(1):63-9. doi: 10.1016/0165-5728(90)90137-c. PMID: 2318958.
- Wang X, Zhao H, Ma C, Lv L, Feng J, Han S. Gallic acid attenuates allergic airway inflammation via suppressed interleukin-33 and group 2 innate lymphoid cells in ovalbumin-induced asthma in mice. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018 Nov;8(11):1284-1290. doi: 10.1002/alr.22207. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30191679.
- Wanleenuwat P, Iwanowski P. Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 Nov;36:101416. doi: 10.1016/j.msard.2019.101416. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31577986.
- Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, Langer-Gould A. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Sep;6(9):1905-1922. doi: 10.1002/acn3.50862. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31392849; PMCID: PMC6764632.
- Wei Y, Chen J, Hu Y, Lu W, Zhang X, Wang R, Chu K. Rosmarinic Acid Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Responses through the Inhibition of TLR4 and CD14 Expression and NF- κ B and NLRP3 Inflammasome Activation. *Inflammation*. 2018 Mar;41(2):732-740. doi: 10.1007/s10753-017-0728-9. PMID: 29318480.
- Weinberg AD, Bourdette DN, Sullivan TJ, Lemon M, Wallin JJ, Maziarz R, Davey M, Palida F, Godfrey W, Engleman E, Fulton RJ, Offner H, Vandenbark AA. Selective depletion of myelin-reactive T cells with the anti-OX-40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 1996 Feb;2(2):183-9. doi: 10.1038/nm0296-183. PMID: 8574963.
- Weissert R. Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats. *Methods Mol Biol*. 2016;1304:161-9. doi: 10.1007/7651_2014_177. PMID: 25630921.
- Welser-Alves JV, Milner R. Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β 1 in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem Int*. 2013 Jul;63(1):47-53. doi: 10.1016/j.neuint.2013.04.007. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23619393; PMCID: PMC3819935.
- Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol*. 1999 Nov 15;163(10):5278-86. PMID: 10553050.
- Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012 Jan;5(1):13-22. doi: 10.1177/1756285611425694. PMID: 22276073; PMCID: PMC3251901.
- Wu GF, Laufer TM. The role of dendritic cells in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007 May;7(3):245-52. doi: 10.1007/s11910-007-0037-z. PMID: 17488591.

- Wu X, Tian J, Wang S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2018 May 28;9:1112. doi: 10.3389/fimmu.2018.01112. PMID: 29892286; PMCID: PMC5985293.
- Wu Y, Li K, Zeng M, Qiao B, Zhou B. Serum Metabolomics Analysis of the Anti-Inflammatory Effects of Gallic Acid on Rats With Acute Inflammation. *Front Pharmacol.* 2022 Mar 22;13:830439. doi: 10.3389/fphar.2022.830439. PMID: 35392557; PMCID: PMC8981033
- www.atlasofms.org
- Xu Z, Zhang F, Sun F, Gu K, Dong S, He D. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Apr 22;(4):CD011076. doi: 10.1002/14651858.CD011076.pub2. PMID: 25900414.
- Yu S, Liu M, Hu K. Natural products: Potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol.* 2019 Feb;67:87-97. doi: 10.1016/j.intimp.2018.11.036. Epub 2018 Dec 8. PMID: 30537635.
- Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, Kiyono H. Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun.* 2001 Aug;17(1):17-25. doi: 10.1006/jaut.2001.0520. PMID: 11488634.
- Zendedel A, Beyer C, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *J Mol Neurosci.* 2013 Oct;51(2):567-72. doi: 10.1007/s12031-013-0026-4. Epub 2013 May 12. PMID: 23666824.
- Zhang M, Li N, Cai R, Gu J, Xie F, Wei H, Lu C, Wu D. Rosmarinic acid protects mice from imiquimod induced psoriasis-like skin lesions by inhibiting the IL-23/Th17 axis via regulating Jak2/Stat3 signaling pathway. *Phytother Res.* 2021 Aug;35(8):4526-4537. doi: 10.1002/ptr.7155. Epub 2021 May 18. PMID: 34008239.
- Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Feb;16(2):249-56. doi: 10.1093/intimm/dxh029. PMID: 14734610.
- Zhao J, Khan IA, Fronczek FR. Gallic Acid. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online.* 2011 Jan 12;67(Pt 2):o316-7. doi: 10.1107/S1600536811000262. PMID: 21523003; PMCID: PMC3051435.
- Zhao Y, Li D, Zhu Z, Sun Y. Improved Neuroprotective Effects of Gallic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles Against Ischemic Stroke. *Rejuvenation Res.* 2020 Aug;23(4):284-292. doi: 10.1089/rej.2019.2230. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31680647.
- Zhou B, Liu J, Wang Y, Wu F, Wang C, Wang C, Liu J, Li P. Protective Effect of Ethyl Rosmarinate against Ulcerative Colitis in Mice Based on Untargeted Metabolomics. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 23;23(3):1256. doi: 10.3390/ijms23031256. PMID: 35163182; PMCID: PMC8836019.
- Zhu JX, Shan JL, Hu WQ, Zeng JX, Shu JC. Gallic acid activates hippocampal BDNF-Akt-mTOR signaling in chronic mild stress. *Metab Brain Dis.* 2019 Feb;34(1):93-101. doi: 10.1007/s11011-018-0328-x. Epub 2018 Oct 3. PMID: 30280285.
- Zhu L, Gu P, Shen H. Gallic acid improved inflammation via NF- κ B pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol.* 2019 Feb;67:129-137. doi:

10.1016/j.intimp.2018.11.049. Epub 2018 Dec 10. Erratum in: *Int Immunopharmacol.* 2021 Oct;99:107815. PMID: 30544066.

Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008 Jul;4(7):384-98. doi: 10.1038/ncpneuro0832. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18578001.

BIOGRAFIJA AUTORA

Goran Stegnjaić je rođen 11. marta 1995. godine u Kninu, u Hrvatskoj. Osnovnu i srednju školu je završio u Beogradu. Školske 2014/15. godine je upisao Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Biologija. Osnovne akademske studije je završio 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,02. Iste godine je upisao master akademske studije na smeru Eksperimentalna fiziologija životinja i čoveka na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. 2019. godine je završio master studije, sa prosečnom ocenom 9,67. Eksperimentalni deo master rada pod nazivom „Ekspresija AKT 1/2/3 i ERK 1/2 u hipotalamusu pacova tokom incijalne faze metaboličkog odgovora na gladovanje”, je uradio pod mentorstvom dr Predraga Vujovića na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i odbranio sa ocenom 10. Doktorske akademske studije upisao je školske 2020/21. godine i položio je sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,86.

Goran je u novembru 2020. godine izabran u zvanje istraživač pripravnik, dok je u februaru 2021. godine zaposlen na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju preko 4. poziva za talentovane mlade istraživače koje je raspisalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Zvanje istraživač saradnik stekao je u februaru 2023. godine. Goran Stegnjaić je koautor 8 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Ima jedno saopštenje na skupovima međunarodnog značaja i četiri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, objavljena u časopisima M22 kategorije.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, Društva za neuronauke Srbije, a putem ovih i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS), Federacije evropskih društava za neuronauke (Federation of European neuroscience Societies, FENS).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Горан Стегњаић _____

Број индекса _____ М3015/2020 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај фенетил естара рузмаринске и галне киселине на ток болести и карактеристике имунских

ћелија укључених у етиопатогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Горан Стегњаић _____

Број индекса _____ М3015/2020 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада „Утицај фенетил естара рузмаринске и галне киселине на ток болести и карактеристике имунских ћелија укључених у етиопатогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“

Ментор _____ др Бојан Јевтић, др Марија Ацић Буквић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Утицај фенетил естара рузмаринске и галне киселине на ток болести и карактеристике имунских ћелија укључених у етиопатогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.