

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Filip T. Petković

**ULOGA AZOT-MONOKSIDA U
REGULACIJI EKSPRESIJE CXCL12 U
EKSPERIMENTALNOM AUTOIMUNSKOM
ENCEFALOMIJELITISU U PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Filip T. Petkovic

**THE ROLE OF NITRIC-OXIDE IN CXCL12
EXPRESSION REGULATION IN
EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE
ENCEPHALOMYELITIS IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

MENTORI:

dr Đorđe Miljković

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

dr Milena Kataranovski

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE :

dr Đorđe Miljković

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

dr Marija Mostarica-Stojković

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Milena Kataranovski

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

Ova doktorska disertacija urađena je na odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta ON173035 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića.

Hvala,

dr Đorđu Miljkoviću, mom mentoru, na prvim naučnim koracima, pristupu u radu kojim je uticao na moje učenje i napredak, na pomoći u eksperimentalnom radu i pomoći prilikom pisanja ove teze, na razumevanju i podršci koju mi je pružio u mojim profesionalnim i privatnim stremljenjima.

dr Mariji Mostarici-Stojković na posvećenosti ovom istraživanju, pre svega na eksperimentalnim i teorijskim savetima koji su unapredili ovu doktorsku disertaciju kako tokom njene eksperimentalne izrade, tako i tokom njenog pisanja.

dr Mileni Kataranovski na korisnim savetima prilikom izrade doktorske disertacije.

dr Miljani Momilović i Jani Blaževski (Odeljenje za Imunologiju, IBISS) na pomoći u eksperimentalnom radu.

dr Gordani Timotijević (IMGGI) na zajedničkom istraživanju izoforme CXCL12- γ .

dr Meliti Vidaković (Odeljenje za molekularnu biologiju, IBISS) na savetima koji su doveli do započinjanja ovog istraživanja.

dr Milici Manojlović-Stojanoski (Odeljenje za citologiju, IBISS) na izuzetnoj pomoći u analiziranju i interpretaciji rezultata dobijenih histološkim analizama.

Zahvaljujem se kolegama sa Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na prijateljskom pomaganju, savetima i prijatnom vremenu provedenom sa njima.

ULOGA AZOT-MONOKSIDA U REGULACIJI EKSPRESIJE CXCL12 U EKSPERIMENTALNOM AUTOIMUNSKOM ENCEFALOMIJELITISU U PACOVA

Rezime

Multipla skleroza (MS) je hronična, inflamatorna, demijelinizirajuća i degenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS), koja se najčešće javlja kod mlađih osoba. Smatra se da imunski sistem ima ključnu ulogu u patogenezi MS, odnosno da bolest nastaje usled autoimunskog odgovora usmerenog prema proteinima mijelinskog omotača. MS je veoma raznolika bolest u svom kliničkom ispoljavanju, što je najverovatnije posledica različitih molekulskih mehanizama koji su uključeni u njenu patogenezu. Usled destrukcije mijelinskog omotača i degeneracije aksona neurona, dolazi do deficita u motornim, senzornim i kognitivnim funkcijama obolelih, koji mogu biti prolaznog ili trajnog karaktera. Trenutnim terapijskim pristupima može se uticati na odlaganje pojave novih neuroloških ispada i može se usporiti hronično pogoršavanje stanja kod pacijenata, ali se ne omogućava njihovo izlečenje.

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišćeni eksperimentalni model za proučavanje patofiziologije MS. Upotreba ovog modela, koji oponaša autoimunsku patogenezu MS, dovela je do mnogih saznanja o mehanizmima neuroimunoloških procesa, to jest, o prelasku imunskih ćelija iz krvotoka u CNS, o njihovoj interakciji sa lokalnim ćelijama glije i neuronima i o sledstvenoj inflamaciji, kao istaknutom aspektu MS.

Hemokini su citokini koji imaju ključnu ulogu u regulaciji migracije imunskih ćelija na mesto inflamacije prilikom odbrane organizma od patogena ili tokom patoloških imunskih procesa, poput MS. Hemokini najčešće stimulišu imunski odgovor privlačenjem ćelija imunskog sistema na efektorska mesta, međutim neki od njih ispoljavaju i regulatorne ili antiinflamatorne uloge, poput CXCL12. CXCL12 deluje antiinflamatorno sprečavanjem prelaska autoreaktivnih imunskih ćelija iz perivaskularnog prostora u parenhim CNS-a, izazivanjem apoptoze autoreaktivnih T ćelija i stimulisanjem promene proinflamatornog karaktera ovih ćelija u antiinflamatorni. Sa druge strane azot-monoksid (NO) je molekul

čija preterana produkcija od strane inducibilne sintaze azot-monokida (eng. iNOS) tokom neuroinflamacije može uzrokovati mnoge štetne efekte po tkivo CNS-a. Visoke koncentracije NO povećavaju propustljivost krvno-moždane barijere, deluju citotoksično na oligodendrocite i neurone i ometaju adekvatno sprovođenje nervnih impulsa.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je uloga NO u regulaciji ekspresije CXCL12 u EAE-u u pacova podložnih njegovoj indukciji, Dark Agouti (DA), i pacova otpornih na njegovu indukciju, Albino Oxford (AO). U homogenatima kičmene moždine (HKM) na piku EAE-a detektovana je visoka ekspresija informacione RNK (iRNK) za CXCL12 kod AO pacova i niska kod DA pacova, što visoku ekspresiju ovog hemokina dovodi u vezu sa otpornošću na razvoj EAE-a. Sa druge strane ekspresija iRNK za iNOS, je bila visoka na piku EAE-a kod DA pacova i niska kod AO pacova, što implicira ulogu NO u razvoju EAE-a. Analizom koja je obuhvatila veliki broj uzoraka zdravih pacova i pacova u raznim fazama bolesti, uočen je odnos negativne korelacije između ekspresije iRNK za iNOS i CXCL12. Dalje, ispitivan je direktan uticaj NO na ekspresiju CXCL12 *in vitro* i *in vivo*. *In vitro*, NO je inhibirao ekspresiju iRNK za CXCL12 u malim krvnim sudovima (MKS) kičmene moždine i astrocitima. U astrocitima je NO inhibirao ekspresiju iRNK za CXCL12 smanjivanjem aktivacije p38 MAP kinaze. *In vivo* blokada aktivnosti iNOS u efektorskoj fazi EAE-a kod DA pacova dovela je do povećanja ekspresije iRNK za CXCL12 u HKM i MKS, kao i produkcije CXCL12 u tkivu kičmene moždine. Takođe, blokada aktivnosti iNOS uslovlila je slabije simptome EAE-a, potvrđujući ulogu NO u podsticanju neuroinflamacije. Ekspresija iRNK za CXCL12 bila je smanjena u HKM AO pacova nakon tretmana natrijum nitroprusidom, molekulom koji otpušta NO. Pored toga, ispitana je ekspresija iRNK za CXCL12- γ tokom EAE-a. Ekspresija ove izoforme takođe je bila viša kod AO pacova u poređenju sa DA pacovima. Zanimljivo je da je ova izoforma kod AO pacova najviše eksprimirana u vreme početka i oporavka od EAE-a kod DA pacova, za razliku od ekspresije ukupnog CXCL12, koji je najviše eksprimiran na piku EAE-a. Takođe, NO je smanjivao ekspresiju CXCL12- γ *in vivo* i *in vitro*.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj tezi pokazuju da NO inhibira ekspresiju CXCL12 u neuroinflamaciji. Takođe, ovi rezultati ističu mogućnost različitih, i možda komplementarnih uloga pojedinih izoformi hemokina CXCL12 u otpornosti na indukciju

EAE-a kod AO pacova. Imajući u vidu višestruke štetne efekte preterane produkcije NO tokom inflamacije u CNS-u i, sa druge strane, mnoge efekte CXCL12 koji ograničavaju i smanjuju neuroinflamaciju, inhibitorni efekat NO na ekspresiju CXCL12 predstavlja još jedan škodljiv efekat ovog molekula u patološkim stanjima CNS-a. Iz pomenutih razloga potencijalni terapijski pristupi, kojima bi se uticalo na smanjenje produkcije NO i sledstveno povećanje ekspresije CXCL12 u CNS-u, mogli bi da dovedu do ograničavanja autoimnskog odgovora prema CNS-u, i na taj način do smanjenja destrukcije tkiva CNS-a kod MS pacijenata.

Ključne reči: multipla skleroza, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, azot-monoksid, CXCL12, neuroinflamacija, astrociti

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj: 616.8-003.99 : 577.27(043.3)

THE ROLE OF NITRIC-OXIDE IN CXCL12 EXPRESSION REGULATION IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS IN RATS

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, demyelinating and degenerative disease of the central nervous system (CNS) that occurs preferentially in young adults. Immune system plays a key role in its pathogenesis. It is considered that MS develops due to an autoimmune response directed against myelin sheath components. MS is a very heterogeneous disease in its clinical manifestations, which is most probably a consequence of diverse molecular mechanisms involved in its pathogenesis. As a consequence of myelin sheath destruction and axonal degeneration, transient or permanent deficits in motor, sensory and cognitive functions appear in MS patients. Therapies which are currently in use decrease the frequency and the severity of acute attacks and slow down the rate of neurological deterioration, but do not cure the patients.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most widely used experimental model for studying pathophysiology of MS. The use of this model, which mimics autoimmune pathogenesis of MS, led to many discoveries about neuroimmunological processes, such as egression of immune cells from the blood stream into the CNS, immune cell interaction with resident glial cells and neurons and subsequent inflammation, as an important aspect of MS.

Chemokines are cytokines with a central role in regulation of immune cell migration at the site of inflammation during pathogen invasion and during pathological immune processes, such as MS. Most often, chemokines boost immune response by attracting immune cells at the effector sites. However, some chemokines, including CXCL12, exert regulatory or antiinflammatory roles. CXCL12 prevents egress of autoreactive immune cells from the perivascular space into the CNS parenchyma, induces autoreactive T cell apoptosis and stimulates shifting of proinflammatory phenotype of these cells towards antiinflammatory phenotype. On the other hand, nitric-oxide (NO) is a molecule whose excess production by inducible nitric-oxide synthase (iNOS) during neuroinflammation can

cause numerous adverse effects in the CNS. High concentrations of NO can increase blood-brain barrier permeability, exert cytotoxic effect on oligodendrocytes and neurons and disturb normal nerve impulse conduction.

In this thesis the effect of NO on regulation of CXCL12 expression in rat EAE was evaluated. To this end, a susceptible rat strain, Dark Agouti (DA), and a resistant rat strain, Albino Oxford (AO) were used. High expression of CXCL12 in spinal cord homogenates (SCH) of AO rats and low in SCH of DA rats at the peak of EAE were detected. This implied that high CXCL12 expression contributed to resistance of AO rats to EAE induction. Conversely, expression of iNOS was high in DA rats and low in AO rats at the peak of EAE, suggesting that NO contributes to EAE pathogenesis. By analyzing large number of samples, obtained from healthy or EAE rats of both strains, negative correlation between expression of messenger RNA (mRNA) for iNOS and CXCL12 was noticed. Further, effect of NO on CXCL12 mRNA expression *in vitro* and *in vivo* was evaluated. *In vitro*, CXCL12 mRNA expression in spinal cord blood vessels (SCBV) and astrocytes was inhibited by NO. In astrocytes NO inhibited CXCL12 mRNA expression by downregulating p38 MAP kinase activity. *In vivo* blockade of iNOS activity led to upregulation of CXCL12 mRNA expression in SCH and SCBV, as well as CXCL12 production in spinal cord tissue. Additionally, inhibition of iNOS activity ameliorated EAE symptoms, confirming harmful role of excessive NO production in neuroinflammation. CXCL12 mRNA expression was downregulated in SCH of AO rats, after treatment with NO donating molecule, sodium nitroprusside. Alongside, CXCL12- γ expression in the CNS during EAE was determined. Expression of this isoform was also higher in AO rats CNS compared to DA rats. However, the highest CXCL12- γ expression in AO rats was detected at the time of onset and the recovery of EAE in DA rats, unlike expression of total CXCL12 which was the highest at the peak of EAE. NO also inhibited CXCL12- γ mRNA expression *in vivo* and *in vitro*.

These results are showing that NO inhibits CXCL12 expression in neuroinflammation. Additionally, our results are suggesting the possibility of different and perhaps complementary roles of various CXCL12 isoforms in resistance of AO rats to EAE induction. Having in mind multiple adverse effects of high NO production during CNS

inflammation and effects of CXCL12 that downregulate neuroinflammation, inhibitory effect of NO on CXCL12 expression could be added to the list of harmful effects of this molecule in the autoimmune CNS pathology. For this reason, therapeutic approaches in which NO production would be restricted and subsequently CXCL12 expression upregulated within the CNS, could lead to reduction of autoimmune CNS response and, thus, to decrease of CNS tissue destruction in MS patients.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, nitric-oxide, CXCL12, neuroinflammation, astrocytes

Research area: Biology

Area of special interest: Immunobiology

UDC number: 616.8-003.99 : 577.27(043.3)

Skraćenice :

AG-aminoguanidin

AO-Albino Oxford

APĆ-antigen prezentujuće ćelije

BSA-goveđi albumin iz seruma (eng. bovine serum albumin)

CNS-centralni nervni sistem

ConASn –konkanavalinA supernatant (eng. concanavalinA supernatant)

CTL-citotoksični T limfociti (eng. cytotoxic T lymphocytes)

DA-Dark Agouti

DĆ-dendritske ćelije

DMSO-dimetil sulfoksid

dNTP- dezoksiribonukleotid-trifostat

DTT-ditiotreitol

DUSP-1-fosfataza dvojne specifičnosti-1 (eng. dual specificity phosphatase-1)

EAE-eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EG-elementalno gvožđe

eNOS-endotelska sintaza azot monoksida

ERK- vanćelijskim signalima regulisane kinaze (eng. extracellular signal regulated kinase)

FCS-serum fetusa govečeta (eng. fetal calf serum)

GFAP-glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. glial fibrilar acidic protein)

HIV-virus humane imunodeficijencije (eng. human immunodeficiency virus)

HKM-homogenat kičmene moždine

HRP-peroksidaza rena (eng. horse radish peroxidase)

IFN-interferon

IL-interleukin

iNOS-inducibilna sintaza azot monoksida

iRNK –informaciona ribonukleinska kiselina

KFA-kompletni Frojndov adjuvans

MHC-glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex)

MKS-mali krvni sudovi

MS-multipla skleroza

NF- κ B- (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

nNOS-neuronska sintaza azot monoksida

NOS-sintaza azot monoksida (eng. nitric oxide synthase)

p38 MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza (eng. mitogen activated protein kinase)

PBS-pufer fosfatnih soli (eng. phosphate buffer saline)

PĆ-peritoneumske ćelije

PI-3K fosfatidilinozitol-3 kinaze

PMSF-fenilmetilsulfonil fluorid

ra-receptor antagonist

Real time PCR- reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (eng. polymerase chain reaction)

RT- reverzna transkripcija

SDF-1 – stromal cell derived factor

SDS-natrijum dodecil sulfat (eng. sodium dodecyl sulfate)

SNP- natrijum nitroprusid (eng. sodium nitroprusside)

Th-pomoćnički T limfociti (eng. T helper)

TNF-faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor)

Treg-regulatorne T ćelije

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. Multipla skleroza	1
1.1.2 Patogeneza multiple skleroze	3
1.2.Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis	5
1.3. CXCL12 (SDF-1)	7
1.3.1. CXCL12 u centralnom nervnom sistemu	8
1.3.2. CXCL12- γ	9
1.4. Azot-monoksid	10
2.CILJEVI	13
2.MATERIJAL I METODE	15
3.1.Eksperimentalne životinje, indukcija EAE-a i procena kliničkih simptoma	15
3.2 Tretman imunizovanih DA pacova aminoguanidinom	16
3.3 Tretman imunizovanih AO pacova natrijum nitroprusidom	16
3.4. Reagensi, ćelije i ćelijske kulture	16
3.4.1. Dobijanje primarne kulture astrocita	17
3.4.2. Izolovanje malih krvnih sudova iz kičmene moždine	18
3.5. Detekcija nitrita Griess-ovom reakcijom	19
3.6. Određivanje nivoa ekspresije iRNK	19
3.6.1. Priprema uzoraka za reakciju lančanog umnožavanja	19
3.6.2. Izolovanje RNK	20

3.6.3. Reakcija reverzne transkripcije	20
3.6.4. Reakcija lančanog umnožavanja (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)	21
3.7. Imunoblot	22
3.7.1. Priprema uzoraka	22
3.7.2. Određivanje koncentracije proteina Lowry-jevom metodom	22
3.7.3. Elektroforeza, transfer uzoraka na membranu i detekcija	23
3.8. Histološka analiza	24
3.8.1. Priprema tkiva za analizu	24
3.8.2. Histološka analiza bojenjem hematoksilinom i eozinom	24
3.8.3. Histološka analiza metodom imunoperoksidaze	24
3.6.3. Morfometrijska merenja	25
3.9. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI	27
4.1. Imunizacija homogenatom kičmene moždine i kompletnim Frojndovim adjuvansom indukuje EAE u DA, ali ne i AO pacova	27
4.2. Različita kinetika ekspresije iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA i AO pacova tokom EAE-a	28
4.3. Imunizacija elementalnim gvožđem, kao adjuvansom, uzrokuje težu kliničku sliku EAE-a kod DA pacova, u odnosu na imunizaciju korišćenjem kompletnog Frojndovog adjuvansa	30
4.4. Razlike u ekspresiji iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine između HKM+EG i HKM+KFA imunizovanih DA pacova	31
4.5. Ekspresije iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 su obrnuto proporcionalne u EAE-u	32

4.6. Kinetika ekspresije iRNK za CXCL12- γ izoformu u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova tokom EAE-a	33
4.7. Niža ekspresija iRNK za CXCL12- γ u malim krvnim sudovima kičmene moždine DA pacova u odnosu na ekspresiju u AO pacova na piku EAE-a	35
4.8. Različit udeo ekspresije iRNK za CXCL12- γ u ekspresiji iRNK za ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova tokom EAE-a	36
4.9. In vivo inhibicija aktivnosti iNOS ublažava simptome EAE-a kod DA pacova	37
4.10. In vivo inhibicija aktivnosti iNOS povećava ekspresiju iRNK za CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima	38
4.11. In vivo inhibicija iNOS smanjuje produkciju NO, a povećava produkciju CXCL12 u tkivu kičmene moždine	39
4.12. In vivo inhibicija iNOS ne utiče na brojnost imunskih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu	41
4.13. Tretman SNP-om snižava ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine AO pacova	42
4.14. SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u malim krvnim sudovima DA pacova in vitro	43
4.15. SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima DA pacova in vitro	44
4.16. SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u C6 ćelijama in vitro	45
4.17. NO poreklom od peritonealnih ćelija smanjuje ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima DA pacova in vitro	46
4.18. SNP smanjuje aktivaciju p38 MAP kinaze u astrocitima DA pacova	47
4.19. Inhibitori p38 MAP kinaze inhibiraju ekspresiju iRNK za CXCL12, ali ne i za CXCL12- γ izoformu	48
4.20. ConASn, interleukin (IL)-17 i interferon (IFN)- γ povećavaju ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima DA pacova in vitro	50
4.21. SNP smanjuje ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima DA pacova stimulisanim ConASn in vitro	51

4.22. Ekspresija iRNK za izoformu CXCL12- γ koja migrira u jedarce nije detektovana u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima_____52

5. DISKUSIJA _____54

6. ZAKLJUČCI _____65

7. LITERATURA _____67

1.UVOD

1.1 Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) nepoznate etiologije, koju karakteriše progresivna demijelinizacija i neurodegeneracija (Lassmann i sar. 2001). Inflamacija, demijelinizacija i degeneracija aksona neurona, uzrokuju neadekvatno sprovođenje nervnih impulsa i sledstvene deficite u motornim, senzornim i kognitivnim funkcijama obolelih, koji mogu biti prolaznog ili trajnog karaktera (Lassmann, 2007, Sloane i sar. 2009).

MS se smatra multifaktorijalnom bolešću, čijem nastanku doprinose mnogi genetski i sredinski faktori. Neki aleli gena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex, MHC) (Gourraud i sar. 2012) i mnogi aleli MHC-nezavisnih gena, koji kodiraju proteine važne za funkcionisanje imunskog sistema doprinose nastanku MS. Pored MHC molekula, pomoću kojih se prezentuju antigeni T limfocitima, među MHC-nezavisnim genima ističu se geni za pomoćne molekule u prezentaciji antigena, CD40 (Jensen i sar. 2010) i CTLA-4 (Mkhikian i sar. 2011), zatim gen za β lanac T-ćelijskog receptora (Robinson i Kindt, 1992), geni za citokinske receptore interleukin (IL)-2RA i IL-7RA (Hafler i sar. 2007, Gregory i sar. 2007), gen za faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor, TNF) i jedan od njegovih receptora, TNFR1 (Wilson i sar. 1997, Gregory i sar. 2012) i drugi.

Smatra se da je uticaj nekih sredinskih faktora na funkcionisanje imunskog sistema i patogenezu MS takođe bitan. Infekcija Epštajn-Bar virusom (Owens i Bennett, 2012) najčešće se dovodi u vezu sa procesom molekulske mimikrije, kada se pokreće imunski odgovor protiv virusnih peptida sličnih sopstvenim peptidima CNS-a. Aktivirane T ćelije koje su sposobne da prepoznaju takve peptide, pokreću paralelno autoimunski odgovor usmeren prema sopstvenim antigenima CNS-a (Chastain i Miller, 2012). Deficijencija vitamina D, usled smanjenog izlaganja sunčevom zračenju (Mehta i sar. 2011), uzrokuje smanjenu ekspresiju HLA-DRB 1*15, alela MHC II klase. Smanjena ekspresija ovog molekula u detinjstvu dovodi do neadekvatne prezentacije sopstvenih antigena u timusu, neefikasnog procesa centralne tolerancije i preživljavanja većeg broja autoreaktivnih T ćelija (Handunnetthi i sar. 2010). Izostanak kontakta sa patogenima u detinjstvu dovodi se u vezu sa neadekvatnom regulacijom imunskog odgovora i može doprineti razvoju

autoimunskih bolesti, poput MS (Fleming i sar. 2011). Takođe, imunomodulatorni efekti duvanskog dima povećavaju rizik od razvoja MS kod pušača (Ascheiro i Munger, 2007).

MS najčešće ima relapsno-remitentni tok, okarakterisan smenjivanjem faza klinički manifestovanih neuroloških ispada i oporavka od kliničkih simptoma. Kod nekih pacijenata sa ovakvim tokom bolesti, ne dolazi do potpunog oporavka u fazama nakon neuroloških ispada, tako da bolest zadobija sekundarni progresivni tok. Faza oporavka od kliničkih simptoma može izostati već nakon prvog neurološkog ispada, tako da bolest biva okarakterisana kao primarna progresivna. Takođe, kod nekih pacijenata javlja se progresivna forma sa fazama oporavka, nazvana progresivno-relapsna forma (Confavreux i sar. 2000, Cañellas i sar. 2007, Hawker, 2011). Paralelno sa raznolikom kliničkom slikom, histopatološki nalazi obolelih od MS pokazuju značajnu heterogenost, u smislu tipa lezija, mehanizama njihovog nastanka, tipova ćelija i molekula koji najviše doprinose demijelinizaciji i neurodegeneraciji (Lassmann i sar. 2001). Pored toga, postoje sporenja da li MS predstavlja primarno autoimunsku ili neurodegenerativnu bolest, tj. da li su inicijalni koraci u patogenezi aktivacija autoreaktivnih limfocita u perifernim limfnim organima ili neurodegeneracija (Miljković i Spasojević, 2013).

Usled raznolikog kliničkog ispoljavanja, patoloških mehanizama i potencijalno različite etiologije, MS se sve češće smatra skupom više različitih bolesti (Aharoni, 2013). Nedavno izdvajanje neuromijelitis optike, koja je dugo smatrana formom MS, kao posebne bolesti sa jasno određenim mehanizmom patogeneze opravdava ovakvo mišljenje (Barnett i Sutton, 2012). Raznolikost mehanizama koji učestvuju u patogenezi MS ilustruje i činjenica da određena terapija koja ublažava bolest kod jedne grupe pacijenata, može biti bez efekta ili čak pogoršati njen tok u drugoj grupi (Tanaka i sar. 2009, Axtell i sar. 2013). Ono što je, ipak, zajedničko je izrazita inflamatorna komponenta, odnosno učešće ćelija imunskog sistema u patogenezi ove bolesti.

1.1.2 Patogeneza multiple skleroze

Patološke karakteristike MS podrazumevaju lezije u beloj i sivoj masi, okarakterisane demijelinizacijom, odumiranjem oligodendrocita, delimičnim ili potpunim gubitkom aksona, odumiranjem tela neurona u sivoj masi, praćene astrogliozom, tj. proliferacijom i povećanom aktivnošću astrocita, kao i poremećajima u funkcionisanju mitohondrija (Lassmann i sar. 2005, Haider i sar. 2011). Potpuni gubitak aksona i lezije u sivoj masi povezuju se sa trajnim neurološkim deficitima kod MS pacijenata (Bjartmar i sar. 2000).

Autoreaktivne T ćelije se smatraju ključnim u patogenezi MS. Među njima se posebno ističu CD4⁺ pomoćnički T limfociti (eng. T helper, Th), s obzirom da ove ćelije svojom aktivnošću pomažu aktivaciju CD8⁺ citotoksičnih T limfocita (CTL), B limfocita, privlače monocite i neutrofile (Miljković i Spasojević, 2013). Među Th limfocitima, Th1, koji proizvode interferon (IFN)- γ i Th17, koji proizvode IL-17 smatraju se glavnim patogenim ćelijskim populacijama u MS. Prema hipotezi koja predviđa autoimunske patogeneze MS, ove ćelije moraju biti aktivirane inicijalnim prepoznavanjem peptida CNS-a, prezentovanih u sklopu MHC molekula II klase na antigen prezentujućim ćelijama (APC) u perifernim limfnim organima, nakon čega cirkulacijom dospevaju do CNS-a, gde moraju biti reaktivirane istim antigenima i započeti sa produkcijom efektorskih molekula, citokina i hemokina (Petermann i Korn, 2011). Th limfociti, kao i autoreaktivni B limfociti, koji proizvode autoantitela, prisutni su uglavnom u perivaskularnom prostoru i u meningama, dok je njihova infiltracija u parenhim CNS-a retka (Lassmann i van Horssen, 2011). Th limfociti privlače makrofage, produkcijom IFN- γ , i neutrofile, produkcijom IL-17, čime se pojačava neuroinflamacija. Sa druge strane B limfociti mogu doprineti patogenezi, barem kod neke grupe pacijenata, produkcijom antitela protiv komponenti mijelinskog omotača (Krumbholz i sar. 2012).

U lezijama obolelih od MS, dominiraju CTL i makrofagi (Babbe i sar. 2000). CTL ispoljavaju citotoksično dejstvo, oslobađanjem perforina i granzima, ostvarivanjem direktnog kontakta sa oligodendrocitima i aksonima (Sobottka i sar. 2009). Makrofagi mogu direktno uticati na neurone i oligodendrocite produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika i

azota i proinflammatoryh citokina IL-1 β , IL-6 i TNF (Shin i sar. 2012, Benveniste, 1997). Pored ovih infiltrirajućih ćelija, destrukciji tkiva u aktivnim lezijama najviše doprinose lokalno prisutne aktivirane ćelije mikroglije, koje kao rezidentni makrofagi, takođe proizvode pomenute proinflammatory faktore (Benveniste, 1997, Jack i sar. 2005). Metabolički najaktivnije ćelije, oligodendrociti i nosioci funkcije CNS-a, neuroni, veoma su osetljive na štetno dejstvo ovih molekula, posebno azot-monoksida (Miljković i Spasojević, 2013). Astrociti su najbrojnije ćelije u CNS-u koje ostvaruju mnogobrojne uloge u njemu. Neke od uloga astrocita su u održavanju homeostaze kalijumovih jona, uklanjanju suvišnih neurotransmitera iz vanćelijske sredine, formiranju sinapsi, mijelinizaciji aksona, izgradnji krvno-moždane barijere (Zhang i Barres, 2010). Uloga astrocita u MS nije potpuno jasna i najčešće se ističe da može biti dvojaka. Drugim rečima, u zavisnosti od medijatora inflamacije, tokom MS, astrociti mogu zadobiti funkcije koje podstiču razvoj lezija ili funkcije koje utiču na ograničavanje njihovog formiranja (Brosnan i Raine, 2013).

Sa druge strane neke studije ističu potpuno odsustvo ćelija imunskog sistema u primarnim lezijama (Henderson i sar. 2009, Stys i sar. 2012). Ove lezije karakterišu odumiranje oligodendrocita, usled kojeg izostaje metabolička podrška mijelinskom omotaču. Takve promene su praćene prisustvom makrofaga poreklom od mikroglije ili iz perivaskularnog prostora, koji fagocituju izmenjeni mijelinski omotač (Barnett i sar. 2006). Ovi podaci govore u prilog hipotezi da neurodegeneracija predstavlja inicijalni korak u patogenezi MS, a ne autoimunost.

1.2 Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišćeni eksperimentalni model za proučavanje patofiziologije MS (Lassmann i van Horssen, 2011). Upotreba ovog modela, koji oponaša autoimunsku patogenezu MS, dovela je do mnogih saznanja o mehanizmima neuroimunoloških procesa, to jest prelasku imunskih ćelija iz krvotoka u CNS, njihove interakcije sa lokalnim ćelijama glije i neuronima i sledstvene inflamacije, kao istaknutog aspekta MS (Flugel i sar. 2001, Gold i sar. 2006). U prilog značajnosti EAE-a u razumevanju patoloških procesa u MS svedoči činjenica da su neke antiinflamatorne i imunomodulatorne terapije MS razvijene na osnovu eksperimenata korišćenjem ovog modela (Lassmann i van Horssen, 2011). Upotreba glatiramer acetata, mitoksantrona i natalizumaba u terapiji MS primeri su translacije znanja dobijenih u EAE-u. Ipak, teba imati na umu ograničenja i mane ovog modela prilikom tumačenja rezultata u kontekstu MS, s obzirom da su se mnoge terapije koje su imale dobro dejstvo u EAE-u pokazale kao neefikasne u MS ili su čak pogoršavale tok bolesti kod pacijenata (Baxter, 2007).

EAE se može indukovati imunizacijom eksperimentalnih životinja peptidima ili proteinima CNS-a u prisustvu adjuvansa (aktivni EAE) ili adoptivnim transferom aktiviranih T limfocita izolovanih iz aktivno imunizovanih životinja (pasivni EAE) (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009). Imunizacija podložnih životinjskih sojeva vrši se ubrizgavanjem imunizacione smeše, sačinjene od prečišćenih peptida mijelinskog omotača, poput baznog proteina mijelina, mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina ili proteolipidnog proteina, ili homogenata kičmene moždine (HKM) u prisustvu kompletnog Freundovog adjuvansa (KFA) ili elementalnog gvožđa (EG) kao adjuvansa (Miljković i sar. 2011, Miljković i sar. 2011). Nakon imunizacije u zadnje šape ili koren repa, APC preuzimaju, obrađuju antigene mijelina i prezentuju ih T limfocitima specifičnim za ove antigene u limfnom čvoru koji drenira mesto imunizacije. Aktivirani limfociti, uglavnom Th limfociti, proliferišu i u zavisnosti od citokinskog mikrokruženja diferenciraju se u Th1 i/ili Th17 subpopulacije (Kroenke i sar. 2008, Murphy i sar. 2010, Kuerten i Lehman, 2011). Aktivirani T limfociti cirkulacijom bivaju nošeni kroz ceo organizam, pri čemu će

neki deo populacije ovih ćelija stići do CNS-a, u koji mogu ući prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru ili barijeru koja postoji između krvi i cerebrospinalne tečnosti. Određene specijalizacije vaskulature CNS-a doprinose postojanju ovih barijera i specifičnom odnosu imunskog i nervnog sistema, kojim se sprečava nekontrolisan ulazak ćelija imunskog sistema u CNS. Krvno moždanu barijeru sačinjavaju endotelske ćelije malih krvnih sudova, povezane tesnim međućelijskim vezama. Njihov perivaskularni prostor je sa jedne strane obložen vaskularnom bazalnom laminom, koja naleže na abluminalnu stranu krvnih sudova, a sa druge strane slojem *glia limitans*, sačinjenim od astroglialne lamine i završnih stopala astrocita. Barijera krv-cerebrospinalna tečnost sprečava nekontrolisan prolazak ćelija iz krvi u cerebrospinalnu tečnost, uz pomoć tesno povezanih ćelija epitela horoidnog pleksusa, koje vrše sekreciju cerebrospinalne tečnosti u moždane komore (Abbott i sar. 2006, Holman i sar. 2011). Bez obzira na njihovu specifičnost za proteine CNS-a, tj. mijelina, aktivirani T limfociti mogu proći neoštećenu krvno-moždanu barijeru (Wekerle i sar. 1987). Međutim, za razliku od limfocita nespecifičnih za proteine CNS-a, ovakvi, CNS-specifični T limfociti se zadržavaju u CNS-u, konkretno u perivaskularnom prostoru (Lehman, 1998, Kuerten i Lehman, 2011, Kawakami i sar. 2004). U perivaskularnom prostoru lokalne APC prezentuju peptide mijelina autoreaktivnim T limfocitima, reaktivirajući ih. Reaktivirani T limfociti počinju sa produkcijom inflamatornih medijatora, citokina i hemokina, kojima privlače druge imunske ćelije, ostvaruju efektorske funkcije i aktiviraju lokalno prisutne glijalne ćelije (Becher i sar. 2006).

Inflamacija koja se javlja u EAE-u posredovana je inicijalnom infiltracijom Th1 i Th17 limfocita u CNS, infiltracijom makrofaga i aktivacijom mikroglije. Uloga CTL dugo se nije isticala kao značajna u EAE-u, dok u MS populacija ovih ćelija dominira u imunskom infiltratu i u bliskom je kontaktu sa oštećenim aksonima (Camara i sar. 2013, Lassmann i van Horssen, 2011). Neke skorašnje studije, ipak ističu značaj CTL u patogenezi EAE-a, stimulacijom razvoja Th1 ćelija u limfnim čvorovima i podsticanjem njihove infiltracije u CNS (Camara i sar. 2013). Makrofagi predstavljaju najznačajniju populaciju ćelija koje bivaju privučene u CNS, doprinoseći inflamaciji produkcijom, već pomenutih, inflamatornih medijatora azot-monoksida, TNF, IL-6 i IL-1 β , karakterističnih za njih (Benveniste, 1997, Shin i sar. 2012).

Indukovana inflamacija uzrokuje neurološke deficite, koji se manifestuju narušavanjem motornih funkcija životinje, oponašajući faze neuroloških ispada kod ljudi obolelih od MS. U zavisnosti od soja eksperimentalnih životinja i peptida mijelina koji se koristi u imunizaciji mogu se dobiti različiti tokovi bolesti kod životinja, na primer jedan prolazni neurološki ispad (monofazni EAE), više ispada sa periodom oporavka između ispada (relapsno-remitentni EAE) i hronični neurološki deficit (hronični EAE) (Souza-Moreira i sar. 2013). S obzirom na već pomenutu izrazitu heterogenost MS, veoma je važno postojanje različitih modela ove bolesti, koji oponašaju njen različit tok kod pacijenata.

1.3 CXCL12 (SDF-1)

CXCL12 spada u grupu hemoatraktantnih citokina, hemokina. Osnovna uloga hemokina u imunskom odgovoru je regulacija migracije imunskih ćelija na mesto inflamacije prilikom odbrane organizma od patogena ili tokom patoloških imunskih procesa (Li i Ransohoff, 2008). Klasifikacija hemokina izvršena je prema organizaciji dva ostatka aminokiseline cistenina blizu N-terminusa i za sada podrazumeva četiri grupe: CXC, C, CC, CX3C (Zlotnik i Yoshie, 2000). CXCL12 spada u CXC grupu hemokina. Komplementarna DNK za CXCL12 klonirana je 1993. godine i protein koji ona kodira prvobitno je nazvan SDF-1 (eng. stromal cell derived factor-1), s obzirom da je izolovan iz mišjih stromalnih ćelija kostne srži (Tashiro i sar. 1993). Godine 1996. od strane dve nezavisne grupe istraživača, identifikovan je receptor za CXCL12, inicijalno nazvan LESTR/fusin (Bleul i sar. 1996a, Oberlin i sar. 1996). Prvobitno se ovom receptoru pripisivala jedino uloga koreceptora pri infekciji Th limfocita virusom humane imunodeficijencije (eng. human immunodeficiency virus, HIV). Nakon što je utvrđeno da vezuje CXCL12, promenjeno mu je ime u CXCR4. Relativno nedavno, pronađen je i drugi receptor za CXCL12, CXCR7 (Balabanian i sar. 2005).

CXCL12 je široko eksprimiran molekul sa mnogobrojnim i esencijalnim ulogama u organizmu sisara. Pre svega neophodan je za pravilan razvoj mnogih organa, poput srca, mozga, hematopoetskog sistema, mišića (Nagasawa i sar. 1996, Tachibana i sar. 1998, Zhu i sar. 2005, Odemis i sar. 2005, Sapede i sar. 2005, Agarwal i sar. 2010). U imunskom

sistemu, ovaj hemokin reguliše razvoj T i B limfocita, doprinosi preživljavanju zrelih limfocita, kao i nastanku memorijskih T ćelija (Li i Ransohoff, 2008). CXCL12 deluje kao snažan hemoatraktant za monocite i limfocite, ali ne i za neutrofile (Bleul i sar. 1996b). Povišena ekspresija ovog hemokina dovodi se u vezu sa progresijom tumora i patogeneom hroničnih inflamatornih stanja poput reumatoidnog artritisa, inflamatorne bolesti creva, uveitisa, nefritisa i sistemskog lupusa (Momčilović i sar. 2012).

Postojanjem dva receptora za CXCL12 ističe se kompleksno dejstvo ovog hemokina, koji izgleda da ima različite efekte ukoliko se vezuje za CXCR4 ili CXCR7. Takođe, razlikuju se njegovi efekti ukoliko ih ostvaruje preko heterodimera CXCR4/CXCR7. Dosadašnji podaci sugerišu da CXCR7 može funkcionisati kao klasični signalni receptor (Odemis i sar. 2012), kao receptor koji uklanja CXCL12 iz vanćelijske sredine (Boldajipour i sar. 2008), zatim kao modulator funkcije CXCR4 heterodimerizacijom (Lipfert i sar. 2013.) ili kao neklasični hemokinski receptor, indukujući signalizaciju aktivacijom β arestina (Sanchez-Martin i sar. 2013). Različite funkcije CXCR7 su primećene u različitim ćelijama (Lipfert i sar 2013), tako da se zasad ne može govoriti o generalnoj ulozi ovog receptora u biološkim sistemima.

1.3.1 CXCL12 u centralnom nervnom sistemu

Ekspresija CXCL12 i njegovih receptora CXCR4 i CXCR7 detektovana je praktično u svim tipovima ćelija CNS-a (Tham i sar. 2001, Banisadr i sar. 2003, Tissir i sar. 2004, McKimmie i Graham, 2010). Važnost ovog hemokina i njegovih receptora ilustruje činjenica da miševi kojima nedostaju CXCL12, CXCR4 ili CXCR7 pokazuju različite abnormalnosti u razvoju CNS-a (Zou i sar. 1998, Lu i sar. 2002, Gerrits i sar. 2008), koje su vrlo često takvih razmera da ovakve životinje umiru još *in utero* ili u prvim nedeljama nakon rođenja.

Relativno niska konstitutivna ekspresija CXCL12 se može povećati u nekim patološkim stanjima CNS-a poput demencije koja prati infekciju HIV-om, tumora mozga, ishemije i neuroinflamacije (Rempel i sar. 2000, Rostasy i sar. 2003, Hill i sar. 2004, Metelitsa i sar. 2004, Peng i sar. 2006, Tabatabai i sar. 2006). Endotelske ćelije malih

krvnih sudova i astrociti predstavljaju glavne izvore inducibilne ekspresije CXCL12 u MS (Ambrosini i sar. 2005, Krumbholz i sar. 2006). Za razliku od drugih hemokina, npr. CCL19, CCL21 ili CCL20, koji podstiču inflamaciju u CNS-u, CXCL12 se smatra antiinflamatornim (Holman i sar. 2011). CXCL12 deluje antiinflamatorno sprečavanjem prelaska autoreaktivnih mononuklearnih ćelija iz perivaskularnog prostora u parenhim CNS-a (McCandless i sar. 2006), izazivanjem apoptoze autoreaktivnih T ćelija (Colamussi i sar. 2001) i potenciranjem promene proinflamatornog karaktera ovih ćelija u antiinflamatorni (Meiron i sar. 2008). Ove funkcije CXCL12 su omogućene ukoliko je ovaj hemokin eksprimiran na abluminalnoj strani malih krvnih sudova, odnosno u perivaskularnom prostoru (Cruz-Orengo i sar. 2011, McCandless i sar. 2008). Prethodne studije naše grupe takođe govore u prilog antiinflamatornoj ulozi CXCL12, s obzirom da se visoka eksprimiranost ovog hemokina povezuje sa otpornošću pacova na indukciju EAE-a (Miljković i sar. 2011).

1.3.2 CXCL12- γ

Alternativnim iskrajanjem primarnog RNK transkripta, dolazi do nastanka različitih izoformi CXCL12 (α , β , γ , δ , ϵ , ϕ) (Yu i sar. 2006). Među njima, CXCL12- α i CXCL12- β se smatraju klasičnim izoformama. Međusobno su vrlo slične, razlikuju se samo u 4 aminokiseline i pretpostavlja se da imaju identične biološke funkcije (De La Luz Sierra i sar. 2004). Sa druge strane, sekvenca od 30-ak amino kiselina na C-terminalnom domenu čini CXCL12- γ izoformu znatno drugačijom od prethodne dve (Segret i sar. 2007). CXCL12- γ se javlja u dve forme, sekretovanoj i formi koja migrira u jedarce. Nijedan drugi hemokin nema sposobnost ulaska u jedro, još specifičnije u jedarce. Za ovu funkciju je odgovoran specifičan region na C-terminalnom kraju peptida, označen kao signal za lokalizaciju u jedarce (eng. nucleolar localization signal). Ipak, da bi mu bilo omogućeno da uđe u jedro, neophodno je da ne poseduje signalni peptid na N-terminalnom domenu, koji inače omogućava sekreciju proteina. Translacijom nekanonskog start kodona CUG na spoju egzona 1 i 2, omogućava se sinteza proteina bez signalnog peptida (Torres i Ramirez, 2009). Pored toga, zahvaljujući jedinstvenom visoko katjonskom C-terminalnom domenu,

koga čine četiri preklapajuća BBXB heparan sulfat vezujuća motiva, CXCL12- γ izoforma poseduje visok afinitet za vezivanje glikozaminoglikana, posebno heparina. Ova strukturna specifičnost ga čini izuzetno potentnim haptotaktičnim proteinom (Rueda i sar. 2008). Ranije pomenute studije o protektivnim ulogama CXCL12 u neuroinflamaciji se ne bave ulogom pojedinačnih izoformi u ovom procesu.

1.4 Azot-monoksid

Azot-monoksid (NO) je reaktivna vrsta azota, koja nastaje u reakciji prevođenja amino kiseline L-arginin u L-citrulin, od strane enzima sintaze azot-monoksida (eng. nitric oxide synthase, NOS), u prisustvu kiseonika i koenzima NADPH (Palmer i sar. 1988, Alderton i sar. 2001). NOS je enzim koji se javlja u tri izoforme: endotelska (eNOS), neuronska (nNOS) i inducibilna (iNOS). eNOS i nNOS su konstitutivno eksprimirane u ćelijama endotela krvnih sudova i neuronima, dok je iNOS inducibilna forma, eksprimirana prevashodno u ćelijama imunskog sistema (Kanwar, 2009). Konstitutivne forme proizvode konstantno male količine NO (nM ili pM koncentracije), koji obavlja fiziološke funkcije, poput vazodilatacije i međućelijske komunikacije (Moncada, 1993, Smith i Lassmann, 2002). Inducibilna forma produkcijom visokih koncentracija NO (μ M), podstiče eliminaciju fagocitovanih mikroorganizama u makrofagima i neutrofilima. Osim ove efektorske uloge, NO produkovan od strane iNOS ispoljava i imunoregulatornu ulogu, suprimiranjem prezentacije antigena T ćelijama, proliferacije T i B limfocita u perifernim limfnim organima i produkcije proinflamatornih citokina IL-17 i IFN- γ (Jianjun i sar. 2013, Wei i sar. 1995, Sicher i sar. 1994, Albina i sar. 1991).

U hroničnim inflamatornim stanjima CNS-a, poput MS i eksperimentalnog modela EAE-a, primećuje se povećana ekspresija i aktivnost iNOS, koja uzrokuje produkciju visokih koncentracija NO (Smith i Lassmann, 2002). U CNS-u iNOS mogu eksprimirati infiltrirajući makrofagi, kao i rezidentne ćelije, mikroglia i u manjoj meri astrociti. Visoke koncentracije NO mogu na različite načine doprineti patogenezi MS i EAE-a. NO može podstaći neuroinflamaciju dilatacijom krvnih sudova u CNS-u, kojom se usporava tok krvi i olakšava kontakt imunskih ćelija sa endotelom krvnih sudova i njihov prolazak u CNS

(Smith i Lassmann, 2002). Propustljivost krvno-moždane barijere se dodatno povećava uticajem NO na proteine koji učestvuju u izgradnji tesnih međucelijskih veza između endotelskih ćelija (Yang i sar. 2013). Takođe, aktivnost enzima matriksnih metaloproteinaza, koji mogu doprineti narušavanju krvno-moždane barijere razgradnjom proteina vaskularne i astroglijske bazalne lamine, stimulisana je dejstvom NO i njegovih derivata (Maeda i sar. 1998, Agrawal i sar. 2006). NO se vrlo brzo vezuje sa superoksid anjon radikalom (O_2^-), formirajući peroksi-nitrit ($ONOO^-$), jedinjenje koje vrlo potentno vrši lipidnu peroksidaciju oligodendrocita i podstiče degeneraciju aksona (Cross i sar. 1997). Funkcionisanje mitohondrija se narušava pod dejstvom NO, što za posledicu ima poremećaje u produkciji ATP-a i povećanu produkciju O_2^- i H_2O_2 (Murphy, 2009). Već je pomenuto da se poremećaji u funkcionisanju mitohondrija ističu kao bitna karakteristika u patogenezi MS (Haider i sar. 2011). Pored toga, NO onemogućava adekvatno sprovođenje nervnih impulsa, verovatno nitrozilacijom i blokadom natrijumovih, kalijumovih, kalcijumovih jonskih kanala, kao i pumpe za natrijum i kalijum, kojom se generiše ATP (Renganathan i sar. 2002, Kureny i sar. 1994, Guzman i sar. 1995).

Direktan uticaj koji NO ima na autoreaktivne T limfocite koji infiltriraju CNS nije potpuno razjašnjen. Neke studije pokazuju da NO povećava encefalitogenost ovih ćelija (Mondal i sar. 2012), dok druge pokazuju da NO indukuje apoptozu u ovim ćelijama ili smanjuje ekspresiju adhezivnih molekula, kojima se T ćelije vezuju za endotel u procesu ekstravazacije (Kubes i sar. 1991, Okuda i sar. 1997, Zettl i sar. 1997). Prethodne studije naše grupe pokazale su da produkcija NO u CNS-u korelira sa jačinom kliničkih pokazatelja EAE-a u pacova, ističući značaj ovog molekula u patogenezi EAE-a (Miljković i sar. 2011).

Trenutni terapijski pristupi u lečenju MS podrazumevaju imunosupresivne i imunomodulatorne terapije. Ipak, nijedna terapija ne dovodi do izlečenja, već samo do odlaganja pojave neuroloških ispada ili doprinosi smanjivanju njihovog intenziteta. S obzirom na heterogenost ove bolesti, neophodni su različiti terapijski pristupi kod različitih grupa pacijenata, ili čak pojedinačnih pacijenata.

Jedan od molekula za koji je pokazano da u EAE-u ograničava inflamaciju u CNS-u i koji je stoga vredan razmatranja u novim terapeutskim konceptima je hemokin CXCL12. Ipak, nedovoljno se zna na koji način je regulisana ekspresija ovog molekula u CNS-u tokom neuroinflamacije. Od ključnog je značaja ispitati kojim mehanizmima je regulisana ekspresija CXCL12 u neuroinflamaciji, kako bi se manipulacijama tih procesa moglo uticati na modulaciju njegove ekspresije.

Ranije je pokazano da neuroinflamacija koja se javlja kod pacova nakon indukcije EAE-a dovodi do smanjenja ekspresije CXCL12 u fazi kada pacovi pokazuju najozbiljnije simptome bolesti (pik EAE-a). S obzirom da ključni proinflamatorni citokini u EAE-u, IFN- γ i IL-17 povećavaju ekspresiju CXCL12, postavilo se pitanje koji bi proinflamatorni faktor mogao biti odgovoran za smanjenje ekspresije CXCL12 na piku EAE-a. Mi smo se odlučili za ispitivanje uticaja jednog od ključnih proinflamatornih molekula, azot-monoksida, na ekspresiju CXCL12 u EAE-u. Kao model za analizu koristili smo genetski visokosrodne sojeve pacova Dark Agouti (DA), podložne indukciji EAE-a, i Albino Oxford (AO), otporne na indukciju EAE-a.

Pored toga, nepostojanje podataka u literaturi o eksprimiranosti izoforme CXCL12- γ u neuroinflamaciji navela nas je da ispitamo da li je ova izoforma eksprimirana u CNS-u zahvaćenom inflamacijom.

2. CILJEVI

Osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje uloge azot-monoksida (NO) u regulaciji ekspresije CXCL12 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE) u pacova. Predviđeno je da se ovaj cilj ostvari ispunjenjem sledećih konkretnih ciljeva:

1. Ispitati ekspresiju iRNK za CXCL12, CXCL12- γ i iNOS u kičmenoj moždini tokom EAE-a kod Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) pacova, i to:

- Kinetiku ekspresije iRNK za ukupni CXCL12 i iNOS u kičmenoj moždini tokom EAE-a kod DA i AO pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine i kompletnim Freundovim adjuvansom (HKM+KFA).
- Ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i iNOS u kičmenoj moždini kod DA i AO pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine i elementalnim gvožđem u vreme pika EAE-a kod DA pacova.
- Kinetiku ekspresije iRNK za CXCL12- γ u kičmenoj moždini tokom EAE-a kod DA i AO pacova imunizovanih HKM+KFA.
- Ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u malim krvnim sudovima kičmene moždine izolovanim iz DA i AO pacova imunizovanih HKM+KFA u vreme pika EAE kod DA pacova.
- Ekspresiju iRNK za izoformu CXCL12- γ koja migrira u jedarce, u centralnom nervnom sistemu.

2. Ispitati uticaj *in vivo* inhibicije aktivnosti iNOS kod DA pacova imunizovanih HKM+KFA na:

- Kliničku sliku EAE-a.
- Ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima.

- Produkciju azot-monoksida i ukupnog CXCL12 u kičmenoj moždini.
 - Brojnost imunskih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu tokom EAE-a.
3. Ispitati uticaj tretiranja AO pacova imunizovanih HKM+KFA natrijum nitroprusidom (eng. SNP), donorom NO, na:
- Kliničku sliku EAE-a.
 - Ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine.
4. Ispitati *in vitro* uticaj NO na ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ , i to:
- za ukupni CXCL12 u malim krvnim sudovima, astrocitima i C6 ćelijama
 - za CXCL12- γ u astrocitima
5. Ispitati ulogu p38 MAPK i/ili NF- κ B signalizacije u uticaju NO na ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ , i to ispitivanjem:
- uticaja NO na aktivaciju p38 MAP kinaze i NF- κ B u astrocitima *in vitro*
 - uticaja inhibicije p38 MAP kinaze na ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u astrocitima *in vitro*

3. MATERI JAL I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje, indukcija EAE-a i procena kliničkih simptoma

U istraživanjima koja su obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom korišćeni su pacovi ženskog pola genetski visokosrodnih sojeva Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO), starosti od 2-3 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ 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 (Odluka br.2-22/10). EAE je indukovao ubrizgavanjem 100 µl smeše, koju su činile jednake zapremine homogenata kičmene moždine pacova (HKM) u PBS-u (eng. phosphate buffered saline) (1g HKM/1ml PBS) i kompletnog Frojndovog adjuvansa (KFA, Difco, Detroit, SAD) (HKM+KFA). Alternativno, imunizaciona smeša je pravljen mešanjem elementalnog gvožđa (EG, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD; 100 mg EG/ml) i HKM u PBS-u (1g HKM/1ml PBS). Imunizaciona smeša je ubrizgavana intradermalno u zadnje šape. Pacovi su posmatrani svakodnevno u cilju praćenja pojave i razvoja kliničkih pokazatelja EAE-a. Pacovima su pripisivane vrednosti u skladu sa sledećom skalom: 0, odsustvo kliničkih pokazatelja; 1, slabost repa; 2, pareza zadnjih udova; 3, paraliza zadnjih udova; 4, stanje moribunda ili smrt. Vrednosti između navedenih su bile dodeljivane ukoliko su klinički pokazatelji bili slabiji od tipičnih za određenu vrednost. Različite faze EAE-a kod DA pacova su definisane na sledeći način: početak, 9-11 dan nakon imunizacije (dni), klinički skor (ks) 0.5-1; pik, 12-15 dni, ks 2-3.5; oporavak, 16-20 dni, ks 0-0.5. AO pacovi nisu pokazali znake bolesti. Uzorci tkiva AO pacova su izolovani paralelno sa uzorcima izolovanim iz DA pacova i stoga označeni u skladu sa fazom bolesti u kojoj su se nalazili DA pacovi.

3.2 Tretman imunizovanih DA pacova aminoguanidinom

Za tretman aminoguanidinom (AG) DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, kada se prvi neurološki ispadi obično javljaju kod DA pacova, započet je tretman aminoguanidin hidrohloridom (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), intraperitoneumski (i.p.) 400 mg/kg telesne težine ili PBS-om (kontrola) jednom dnevno. Kada je bolest dostigla maksimum u grupi koja je dobijala PBS, tretman je prekinut. Tada su životinje žrtvovane, a iz njih izolovane kičmene moždine. Kičmene moždine su dalje obrađene za histološke analize ili su homogenizovane i izolovani su mali krvni sudovi iz njih. Iz homogenata kičmene moždine i malih krvnih sudova izolovana je RNK.

3.3 Tretman imunizovanih AO pacova natrijum nitroprusidom

Za tretman natrijum nitroprusidom (eng. sodium nitroprusside, SNP), donorom azot monoksida, AO i DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, kada se prvi neurološki ispadi obično javljaju kod DA pacova, započet je tretman AO pacova SNP-om (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) (i.p. 1 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), jednom dnevno. Kada je bolest dostigla maksimum kod DA pacova, AO pacovi su žrtvovani, izolovane su kičmene moždine i homogenizovane. Iz homogenata kičmene moždine izolovana je RNK.

3.4 Reagensi, ćelije i ćelijske kulture

RPMI-1640 medijum i serum fetusa govečeta (eng. fetal calf serum, FCS) nabavljeni su od PAA Laboratories (Pasching, Austrija). Goveđi albumin iz seruma (eng. bovine serum albumin, BSA) kupljen je od Fluka (Buch, Nemačka). Dimetil sulfoksid (DMSO) i SNP kupljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD). Citokini korišćeni za stimulaciju su bili IL-1 β , TNF, IFN- γ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i IL-17 (R&D Systems, Minneapolis, SAD). Medijum koji je korišćen za ćelijsku kulturu bio je HEPES-buffered RPMI-1640 medijum sa dodatkom 5% FCS-a, jugocilina, gentamicina i nistatina

(Galenika, Beograd, Srbija). PBS je pravljen od: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1.76 mM KH₂PO₄ (svi LachNer, Neratovice, Češka) i imao je vrednost pH 7.4. Čelije slezine izolovane su iz slezina netretiranih DA pacova. Slezine su mehanički homogenizovane, propuštene kroz 40- μ m najlonsku filter mrežicu i dobijena suspenzija sakupljena je centrifugiranjem. Čelije slezine (5 miliona/ml) stimulisane su konkanavalinom A (ConA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD; 5 mg/ml) 48 h i nakon toga supernatanti ćelijskih kultura (ConASn) su sakupljeni. C6 ćelijska linija pacovskog astrocitoma (donacija Dr. P. Tranque, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Španija) održavana je u medijumu za ćelijsku kulturu do korišćenja u eksperimentima. Rezydentne peritoneumske ćelije dobijene su iz zdravih DA pacova ispiranjem peritoneumske šupljine hladnim PBS-om. C6 ćelije su sađene 1.5 x 10⁵/ml/bunaru u ploče za ćelijsku kulturu sa 24 bunara (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Ove ćelije su stimulisane rekombinantnim pacovskim citokinima IL-1 β , TNF, IFN- γ (svi po 10ng/ml) i IL-17 (50 ng/ml) i tretirane SNP-om u koncentraciji od 200 μ M. Nakon 24h inkubacije ćelije su sakupljene za izolaciju RNK, dok su supernatanti ćelijskih kultura sakupljeni za merenje koncentracije nitrita. Iz zdravog DA pacova izolovano je srce, koje je mehanički usitnjeno makazama i homogenizovano. Iz pripremljenog homogenata srca izolovana je RNK.

3.4.1 Dobijanje primarne kulture astrocita

Astrociti su izolovani iz kulture mešovutih ćelija glije, koje su pripremljene iz mozgov novorođenih DA pacova, prema proceduri po McCarthy i de Vellis (McCarthy i de Vellis, 1980). Iz pacova starih do 3 dana izolovani su mozgovi. Uklonjene su meninge, tkivo je mehanički usitnjeno makazama i homogenizovano. Na taj način dobijeni homogenati mozgov resuspendovani su u RPMI medijumu za ćelijsku kulturu obogaćenom 10% FCS-om i glukozom (4 g/l) (LachNer, Neratovice, Češka) i posađeni u falkone za ćelijsku kulturu. Astrociti su prečišćeni ponavljanom tripsinizacijom (0.25% tripsin i 0.02% EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i ponovnim sađenjem. Čelije korišćene u ovim eksperimentima su dobijene nakon treće tripsinizacije i više od 95% ćelija je ekspimiralo glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. glial fibrilar acidic protein, GFAP), marker astrocita, dok je manje od 3% ćelija ekspimiralo CD11b, marker mikrogije,

analizom na protočnom citofluorimetru. Astroцити су сађени 1.5×10^5 /ml/bunaru u ploče za ćelijsku kulturu sa 24 bunara (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Stimulisani su ConASn (20%) i tretirani SNP-om u koncentraciji od 200 μ M. Nakon 24h inkubacije ćelije su sakupljene za izolaciju RNK, dok su supernatanti ćelijskih kultura sakupljeni za merenje koncentracije nitrita. Pored toga astroцити су su gajeni u odsustvu ili prisustvu IFN- γ (10 ng/ml) + IL-17 (50 ng/ml). Nakon 24h inkubacije ćelije su sakupljene za izolaciju RNK. Za kokultivaciju sa peritoneumskim ćelijama, astroцити су сађени 1×10^5 /bunaru u ploče za ćelijsku kulturu sa 24 bunara (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Peritoneumske ćelije su sađene 3×10^6 u inserte za ćelijsku kulturu (Nunc, Roskilde, Danska), koji su stavljeni u bunare u kojima su gajeni astroцити. Nakon perioda kokultivacije od 24h, inserti su uklonjeni, astroцити су sakupljeni za izolaciju RNK, dok su supernatanti ćelijskih kultura sakupljeni za merenje koncentracije nitrita. Pored toga, astroцити су nakon stimulacije ConASn (20%) i izlaganja dejstvu SNP-a (200 μ M) izloženi pojedinačnom dejstvu inhibitora aktivnosti p38 MAP kinaze, SB 202190 (10 μ M) i SB 203580 (10 μ M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Dodatno, astroцити су izloženi pojedinačnom dejstvu inhibitora aktivnosti p38 MAP kinaze, SB 202190 (10 μ M) i SB 203580 (10 μ M), bez prisustva SNP-a. Nakon 6h inkubacije astroцити су sakupljeni za izolaciju RNK.

3.4.2 Izolacija malih krvnih sudova iz kičmene moždine

Mali krvni sudovi (MKS) su izolovani iz kičmenih moždina uz pomoć procedure Ge i Pachter (Ge i Pachter, 2006). Meninge i veliki krvni sudovi su uklonjeni iz kičmenih moždina, koje su usitnjene i homogenizovane u PBS-u. Na takav način dobijeni homogenati su centrifugirani i resuspendovani u 6 ml 18% rastvora dekstrana (Serva, Heidelberg, Nemačka) u RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 5% FCS-a i centrifugirani (3000g, 20 minuta, 4 °C). Izdvojeni sloj poreklom od mijelinskog omotača na površini je odstranjen, kao i supernatant. Talog koji sadrži krvne sudove resuspendovan je u PBS-u. Suspenzija krvnih sudova propuštena je kroz 40 μ m mrežicu za ćelije (Becton Dickinson Labware, New Jersey, SAD) da bi se odstranile ćelije krvi. Nakon ispiranja mrežice PBS-om, MKS su sakupljeni sa mrežice i centrifugirani (1000g, 3 minuta, 4 °C). Dobijeni talog MKS je resuspendovan i ravnomerno raspoređen u ploče za ćelijsku kulturu sa 24 bunara

(Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). MKS su stimulisani ConASn (20%) i tretirani SNP-om u koncentraciji od 200 μ M. Nakon 24h inkubacije MKS su sakupljeni za izolaciju RNK, dok su supernatanti kultura sakupljeni za merenje koncentracije nitrita

3.5 Detekcija nitrita Griess-ovom reakcijom

Griess-ovu reakciju smo koristili za merenje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura. Konačni produkti metabolizma azot monoksida (NO) u ćelijskim kulturama su nitriti i nitrati koji stoje u stabilnom međuodnosu. Stoga, merenjem nitrita može se doći do zaključka o proizvodnji NO tokom kultivacije. Griess-ov rastvor je pravljen mešanjem jednakih zapremina rastvora 0.1% 2-(1-naftilamino)etilamin dihlorida (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i rastvora 1% sulfanilamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u 5% H₃PO₄ (Zorka, Šabac, Srbija) neposredno pre korišćenja. Supernatantu u kome smo želeli da izmerimo koncentraciju nitrita dodavan je Griess-ov rastvor u jednakoj zapremini. Kao pokazatelj postojanja nitrita u supernatantu razvijala se roze boja, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji nitrita u rastvoru. Vrednosti su dobijene merenjem apsorbance u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006; LKB, Roma, Italija) na 570 nm. Kao standard za prevođenje dobijenih vrednosti u koncentracije nitrita koristili smo sukcesivna razblaženja natrijum nitrita, NaNO₂ (Merck, Darmstadt, Nemačka)

3.6 Određivanje nivoa ekspresije iRNK

3.6.1. Priprema uzoraka za reakciju lančanog umnožavanja

Nakon inkubacije, tretiranim ćelijskim kulturama, izolovanim homogenatima kičmene moždine ili izolovanim malim krvim sudovima dodavano je po 500 μ l rastvora za izolaciju RNK (Total RNA Isolation Kit, Metabion, Martinsried, Nemačka). Ovako pripremljeni uzorci čuvani su u epruvetama u zamrzivaču na -20°C. Na ovaj način je odrađen 1. korak u izolaciji RNK.

3.6.2. Izolovanje RNK

Uzorci su dopunjavani sa po 100 μ l hloroforma (Merck, Darmstadt, Nemačka), vrtloženi i ostavljeni 15 minuta na 4°C, a zatim centrifugirani. Nakon centrifugiranja na 12000 g u trajanju od 20 minuta na 4°C u epruvetama su se jasno videla tri sloja: gornji, u kome se nalazila RNK; srednji, u kome se nalazila DNK; i donji u kome su proteini. Gornji, vodeni sloj prebacivan je u čiste epruvete, a ostatak je odbacivan. U epruvete je dodavano po 300 μ l izopropanola (Zorka, Šabac, Srbija), njihov sadržaj je vrtložen, a one su potom ostavljane 10 min na -20°C. Zatim su epruvete centrifugirane 20 minuta na 12000 g na 4°C. RNK je precipitirana na dnu, a supernatanti su odlivani. Talog je zatim pran dodavanjem 700 μ l etanola (Zorka, Šabac, Srbija), vrtloženjem i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 12000 g na 4°C. Potom je odlivan etanol, a talog RNK je sušen i finalno rastvaran u destilovanoj vodi.

3.6.3. Reakcija reverzne transkripcije

Reakcija reverzne transkripcije započinjana je dodavanjem po 1 μ l nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i po 1 μ l smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija) rastvorenoj RNK. Uzorci su dopunjavani sa po 10 μ l vode. Kao kontrola za eventualnu kontaminaciju služila je voda kojoj su dodavani nasumični prajmeri i dNTP, i koja je označena kao negativna kontrola. Po mešanju, rastvorena RNK je denaturisana na 70 °C 10 minuta, posle čega su uzorci stavljeni 2 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 μ l 5 puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5 x reaction buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija), po 1 μ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas, Vilnius, Litvanija), po 0.5 μ l inhibitora RNAze (Fermentas, Vilnius, Litvanija), i uzorci su dopunjavani sa po 2.5 μ l vode do ukupne zapremine od 20 μ l. Zatim su uzorci mešani i inkubirani na 25°C, 15 minuta, a potom na 42°C, 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70°C, 10 minuta i 95°C, 3 minuta. Uzorci sa komplementarnom DNK su čuvani na 4°C do dalje upotrebe.

3.6.4. Reakcija lančanog umnožavanja (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)

Kvantitativni PCR („Real-time“ PCR) korišćen je za analizu relativne ekspresije informacione RNK (iRNK). U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bunara adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmpTM Optical, Applied Biosystems, Karlsbad, California, SAD) i u svaki od bunara dodavano je po 10 μ l reakcione smeše SYBR Green (Applied Biosystems, Karlsbad, California, SAD) i po 1 μ l specifičnih prajmera (10 μ M) koji prepoznaju sekvencu DNK komplementarnu iRNK od interesa (Metabion, Martinsried, Nemačka) ili sekvencu DNK komplementarnu iRNK za β -aktin (referentna iRNK) (Metabion, Martinsried, Nemačka). Potom je u svaki bunar dodavano po 4 μ l odgovarajućeg uzorka komplementarne DNK razblažene 10 puta (dodavanjem po 180 μ l vode u svaki uzorak). Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Bunari su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Karlsbad, California, SAD), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1000 g, prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Karlsbad, California, SAD). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95 $^{\circ}$ C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95 $^{\circ}$ C i 1 minut na 60 $^{\circ}$ C. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7000 System software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems, Karlsbad, California, SAD). Nivo ekspresije ispitivane iRNK standardizovan je u odnosu na ekspresiju iRNK za β -aktin detektovane u istom bunaru i iskazan kao 2^{-dCt} gde je dCt razlika između Ct vrednosti iRNK od interesa i referentne iRNK. Korišćeni su sledeći parovi prajmera: β -aktin 5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT-3' i 5'-CCA GCG CAGCGA TAT CG-3'; CXCL12 5'-GAT TCT TTG AGA GCC ATG TC-3 i 5'-GTC TGT TGT TGC TTT TCA GC-3'; iNOS 5'-TTC CCA TCG CTC CGC TG-3' i 5'-CCG GAG CTG TAG CAC TGC A-3'; CXCL12- γ 5'-AGC CAG TCA GCC TGA GCT AC-3' i 5'-CCC CAC TTT TTC TTC TCT GC-3'; CXCL12- γ SP 5'-AGC CAG TCA GCC TGA GCT AC-3' i 5'-CCC CAC TTT TTC TTC TCT GC-3'.

3.7 Imunoblot

3.7.1 Priprema uzoraka

Astrociti su stimulirani ConAsn u prisustvu ili odsustvu SNP-a (200 μ M) u periodu od 6h. Nakon tog perioda ćelije su sakupljene za imunoblot analizu. Ćelijski lizati su pripremljeni korišćenjem hladnog rastvora za liziranje 62.5 mM Tris-HCl (Fluka, Buch, Nemačka) pH6.8, 2% sodium dodecyl sulfata (SDS, Applichem, Darmstadt, Nemačka), 10% glycerol (Zorka, Šabac, Srbija), 50 mM dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). U rastvor su neposredno pre korišćenja dodavani inhibitori proteaza; 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 1 μ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Od trenutka liziranja ćelija počinju procesi kao što su defosforilacija, denaturacija i proteoliza, koji se usporavaju držanjem uzoraka na ledu. Lizati su kuvani 5 minuta na 100 °C i više puta provučeni kroz nastavak pipete radi razbijanja oslobođene DNK na što sitnije delove i smanjenja viskoznosti uzoraka. Nakon centrifugiranja (20000g, 20 minuta, 4 °C), supernatanti sa rastvorenim proteinima su prebačeni u nove epruvete dok je talog sa ćelijskim debrisom i DNK odbačen.

3.7.2 Određivanje koncentracije proteina Lowry-jevom metodom

Koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija merena je Lowry-jevom metodom (Lowry i sar., 1951). Uzimano je 20 μ l uzoraka razblaženih 10 puta u destilovanoj vodi i mešano (uz snažno vrtloženje) sa 300 μ l rastvora 2 % Na_2CO_3 (Carlo Erba, Milano, Italija) u 0.1 M NaOH (LachNer, Neratovice, Češka), 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Zorka, Šabac, Srbija) i 2 % K-Na-tartarat (Alkaloid, Skopje, Makedonija) u H_2O , pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 μ l Folin-Ciocalteu reagensa (Mol, Beograd, Srbija) razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 minuta, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka merena je na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče. Za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje su određivane

koncentracije proteina u uzorcima, korišćen je rastvor BSA (0.1-1 mg/ml) u destilovanoj vodi.

3.7.3. Elektroforeza, transfer uzoraka na membranu i detekcija

Zapremina uzorka u kojoj se nalazilo 30 µg proteina mešana je u odnosu 4:1 sa standardnim puferom za nalivanje na gel za elektroforezu, 4xLemli pufer (1M Tris-HCl pH 6.8, 20% SDS, 0.2 M β-merkaptioetanol (Applchem, Darmstadt, Nemačka), 0.004% bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 20% glicerol (LachNer, Neratovice, Češka)) i proteini su razdvojeni elektroforezom na 12% SDS-poliakrilamidnom gelu. Po završenoj elektroforezi sledio je transfer na polivinil difluoridnu membranu. Transfer je izvršen korišćenjem polusuvog sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Muenchen, Nemačka) na 5 mA/cm². Nespecifično vezivanje antitela blokirano je 1h na sobnoj temperaturi sa 5% BSA u PBS-u sa 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), a zatim su membrane inkubirane preko noći na 4°C sa antitelima specifičnim za p38 MAP kinazu, p-p38 MAP kinazu (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), NF-kB ili p-NF-kB (Abcam, Cambridge, MA, SAD) rastvorenim u 1% BSA u PBS-u sa 0.1% Tween-20. Potom je usledila inkubacija u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (ECL donkey anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked, GE Healthcare, Buckinghamshire, Engleska, UK). Vezana antitela detektovana su hemiluminiscencijom (ECL, GE Healthcare, Engleska, UK). Količina proteina merena je denzitometrijski upotrebom programa Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, SAD) i predstavljena odnosom između totalnih i fosforilisanih formi proteina.

3.8 Histološka analiza

3.8.1 Priprema tkiva za analizu

Za histološku analizu korišćeni su DA pacovi iz eksperimenata u kojima su tretirani AG-om. Kada je EAE dostigao maksimum kod kontrolne grupe svi pacovi su žrtvovani (12. dan nakon imunizacije). Kičmene moždine su izolovane i fiksirane u 4% paraformaldehidu (Serva, Heidelberg, Nemačka) rastvorenom u PBS-u preko noći na 4 °C. Nakon fiksacije, uzorci su držani po 24h u 10%, 20% i 30% rastvoru saharoze (LachNer, Neratovice, Češka) u PBS-u na 4 °C. Tkivo je zatim ukalupljeno korišćenjem medijuma za ukalupljivanje za sečenje na kriostatu (Killik, Milano, Italija). Poprečni preseći kičmene moždine debljine 10 µm dobijeni su sečenjem na kriostatu. Odmah nakon sečenja preseći su stavljeni na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, MA, SAD). Nakon toga uzorci su čuvani na -20 °C do upotrebe.

3.8.2 Histološka analiza bojenjem hematoksilinom i eozinom

Preseći koji su prethodno nanošeni na predmetna stakla izlagani su bojenju hematoksilinom (BioOptica, Milano, Italija) u trajanju od 1 minuta i bojenju eozinom (Molar, Budapest, Mađarska) u trajanju od 1 minuta. Hematoksilin boji ćelijska jedra, dok eozin boji proteine u citoplazmi. Uzorci su zatim sprovedeni sukcesivno kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70%, 86% i 100%) i ksilol (Zorka, Šabac, Srbija). Nakon čega su pokriveni pokrovnim staklom korišćenjem DPX-a (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Preseći su posmatrani i slikani na mikroskopu Axiovert 200M, korišćenjem softvera AxioVision 4.5 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

3.8.3 Histološka analiza metodom imunoperoksidaze

Preseći koji su prethodno nanešeni na predmetna stakla inkubirani su u rastvoru 1 % H₂O₂ (Zorka, Šabac, Srbija) u metanolu (Zorka, Šabac, Srbija) 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se eliminisala aktivnost endogene peroksidaze. Sledilo je blokiranje uz pomoć 10 % pacovskog seruma u 2% BSA, 0.05% Triton X 100 (Fluka, Buch, Nemačka) u PBS-u u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su inkubirani preko noći na

4°C sa antitelima specifičnim za nitrotirozinske ostatke na proteinima; rabbit anti-nitrotyrosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) ili specifičnim za CXCL12; rabbit anti-rat CXCL12 (eBioscience ili Santa Cruz, San Diego, SAD). Primarna antitela su detektovana korišćenjem sekundarnog antitela konjugovanog sa biotinom; biotinylated goat anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) inkubiranjem u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Sledilo je inkubiranje uzoraka sa ekstravidin-peroksidazom (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Nakon toga su uzorci inkubirani 1 minut sa supstratom 3,3'-diaminobenzidinom (Dako, Glostrup, Danska) na sobnoj temperaturi i na kraju bojeni hematoksilinom u trajanju od 1 minuta. Uzorci su zatim sprovedeni sukcesivno kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70%, 86% i 100%) i ksilol. Nakon toga su pokriveni pokrovnim staklom korišćenjem DPX-a. Preseci su posmatrani i slikani na mikroskopu Axiovert 200M, korišćenjem softvera AxioVision 4.5 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

3.8.4 Morfometrijska merenja

Morfometrijska analiza kojom smo određivali volumensku gustinu CXCL12 imunocitohemijski pozitivnih ćelija rađena je uz pomoć newCAST stereološkog softverskog paketa (VIS – Visiopharm Integrator System, version2.12.1.0; Visiopharm; Danska). Mikroskop (Olympus BX-51) je opremljen motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1 μ m. Pomeranje stočića po z-osi kontrolisano je mikrokatorom (Heidenhain MT1201, IL, SAD) sa preciznošću od 0.2 μ m. Za mikroskop je vezana CCD video kamera (PixeLink, Ontario, Kanada). Pri analizi korišćeni su planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 10x. NewCast stereološki sistem generisao je interaktivnu stereološku mrežicu. Volumenska gustina (VV) je relativna stereološka veličina koja pokazuje koliki udeo ukupnog prostora pripada proučavanoj fazi i izražava se u procentima. U morfometrijskim merenjima korišćena su dva preseka po životinji (uzorku) međusobno udaljena 50 μ m. Ovaj parametar se izračunava tako što se broj tačaka koje padaju na proučavanu fazu (CXCL12 imunocitohemijski pozitivnih ćelija) podeli sa ukupnim brojem tačaka unutar testnog sistema.

$$VV(\%)=Pp/Ptx100$$

Pp - broj pogodaka na CXCL12 imunocitohemijski pozitivne ćelije

Pt - broj pogodaka na belu i sivu masu kičmene moždine unutar testnog polja

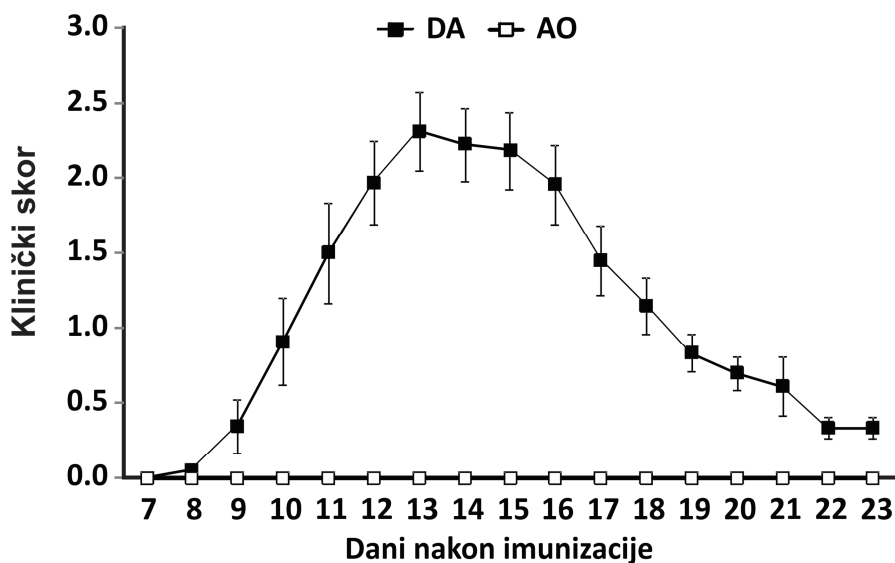
3.9 Statistička obrada podataka

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti +/- standardna devijacija (SV +/- SD), SV +/- SD ili SV +/- standardna greška (eng. standard error, SE) dobijene u više nezavisnih eksperimenata. Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti korišćen je Studentov t-test. Vrednost parametra p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom. Za analiziranje korelacije korišćen je Perason-ov test.

4. REZULTATI

4.1. Imunizacija homogenatom kičmene moždine i kompletnim Frojndovim adjuvansom indukuje EAE u DA, ali ne i AO pacova

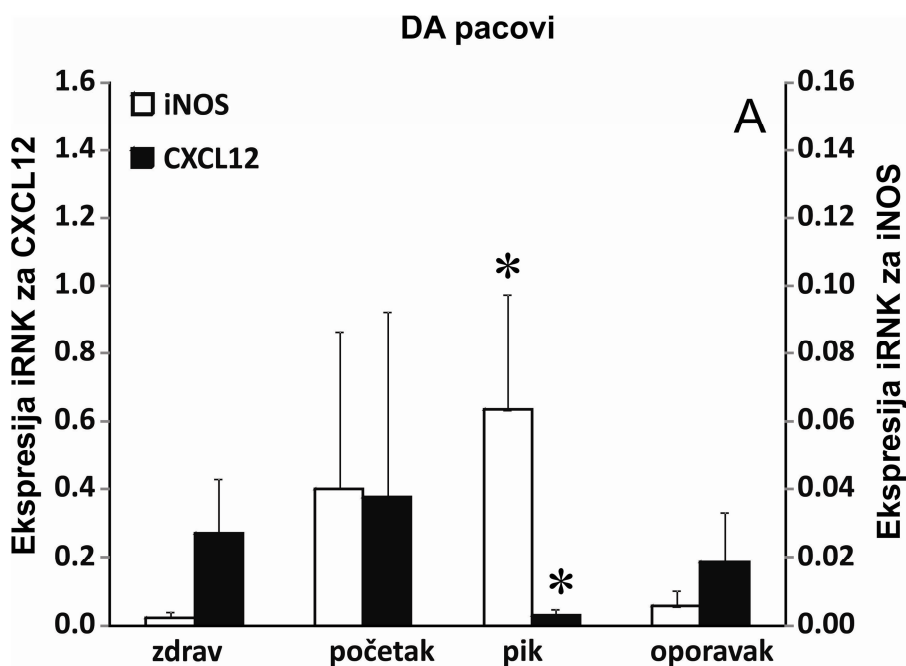
Nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine (HKM) i kompletnim Frojndovim adjuvansom (KFA) DA pacovi su razvili akutni monofazni tip EAE-a, koji se karakteriše pojavom slabosti repa, koja prelazi u parezu i paralizu zadnjih udova, nakon čega se pacovi oporavljaju od kliničkih pokazatelja bolesti. Sa druge strane, kod AO pacova se nisu mogli primetiti klinički pokazatelji bolesti (Slika 1).

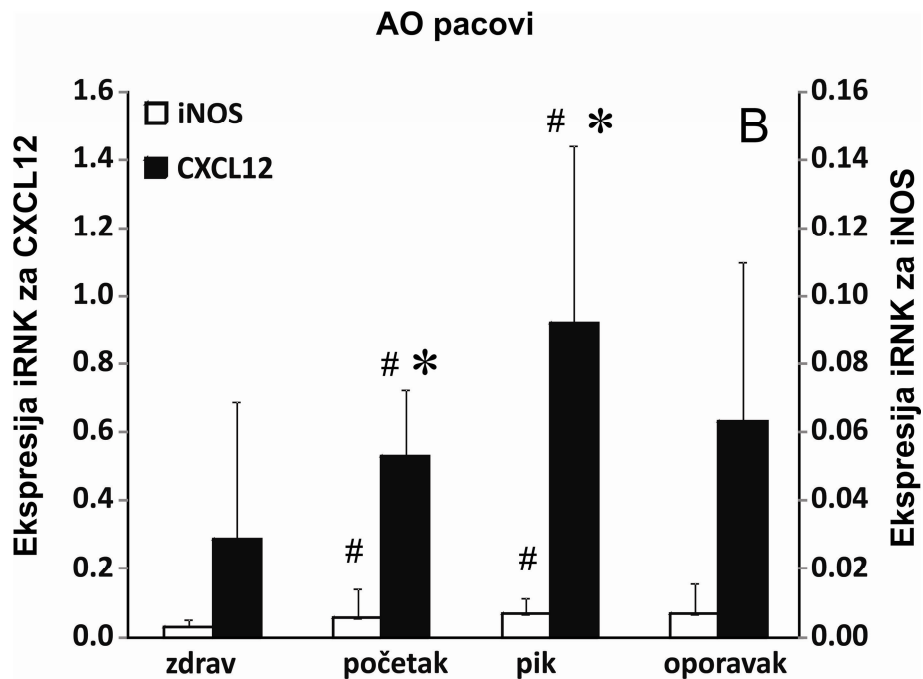


Slika 1. Klinička slika EAE-a kod DA i AO pacova imunizovanih HKM+KFA. EAE je indukovao ubrizgavanjem HKM+KFA, intradermalno u zadnje šape. Pacovima su pripisivane vrednosti u skladu sa sledećom skalom: 0, odsustvo kliničkih pokazatelja; 1, slabost repa; 2, pareza zadnjih udova; 3, paraliza zadnjih udova. Vrednosti između navedenih su bile dodeljivane ukoliko su klinički pokazatelji bili slabiji od tipičnih za određenu vrednost. Klinički skor imunizovanih AO i DA pacova predstavljen je kao srednja vrednost \pm SE 30 životinja po grupi.

4.2 Različita kinetika ekspresije iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA i AO pacova tokom EAE-a

Od ranije je poznato da je ekspresija CXCL12 u CNS-u AO pacova povišena, dok je kod DA pacova smanjena, u fazi kada je EAE na piku kod DA pacova (Miljković et al. 2011). Sada smo uporedo analizirali ekspresiju iRNK za iNOS i CXCL12 u HKM imunizovanih DA i AO pacova, u različitim fazama EAE-a. Kod DA pacova ekspresija iRNK za iNOS se povećavala kako je bolest napredovala i dostigla maksimum na piku EAE-a. Upravo u toj fazi ekspresija iRNK za CXCL12 bila je na najnižem nivou kod DA pacova (Slika 2A). Kod AO pacova ekspresija iRNK za CXCL12 se povećavala kako je bolest napredovala i dostigla maksimum kada je EAE bio na piku kod DA pacova, dok je u fazi oporavka ekspresija iRNK za CXCL12 počela da se smanjuje. Ekspresija iRNK za iNOS je kod AO pacova bila na niskom nivou čitavim tokom EAE-a (Slika 2B). Uočljivo je da povišenje ekspresije iRNK za iNOS prethodi smanjenju ekspresije iRNK za CXCL12 u DA pacova.

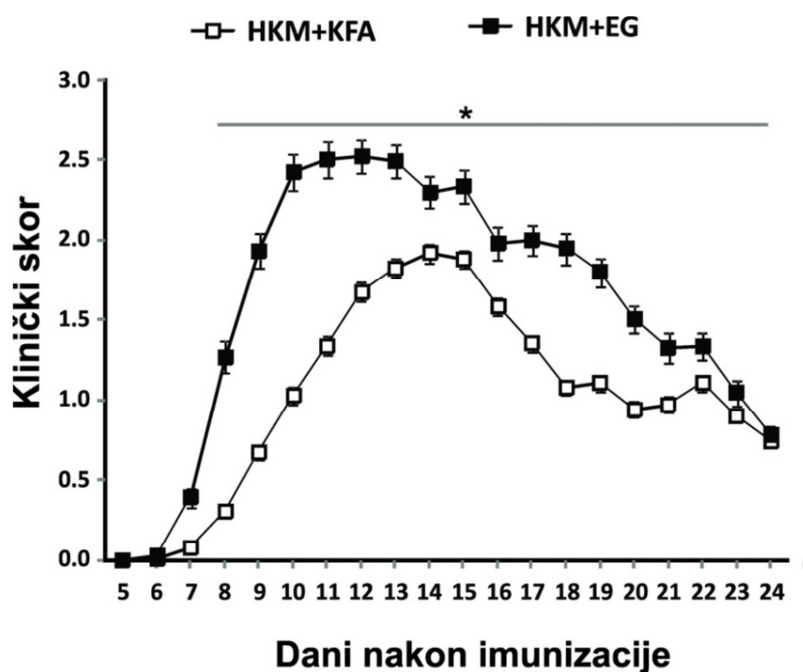




Slika 2. Kinetika ekspresije iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 u HKM AO i DA pacova tokom EAE-a. HKM su dobijeni iz DA i AO pacova imunizovanih HKM+KFA u različitim fazama EAE-a ili iz zdravih, neimunizovanih DA i AO pacova. Različite faze EAE-a kod pacova su definisane na sledeći način: početak, 9-11 dan nakon imunizacije (dni), klinički skor (ks) 0.5-1; pik, 12-15 dni, ks 2-3.5; oporavak, 16-20 dni, ks 0-0.5. RNK je izolovana iz HKM i RT-Real time PCR je urađen. Uzorci iz najmanje tri nezavisna eksperimenta korišćeni su u analizi. Broj analiziranih HKM iz svake faze EAE-a je bio 10, izuzev za zdrave pacove, gde je analizirano 6 uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost + SD (A,B). * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku u poređenju sa zdravim pacovima. # $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između DA i AO uzoraka (A u odnosu na B).

4.3 Imunizacija elementalnim gvoždem, kao adjuvansom, uzrokuje težu kliničku sliku EAE-a kod DA pacova, u odnosu na imunizaciju korišćenjem kompletnog Frojndovog adjuvansa

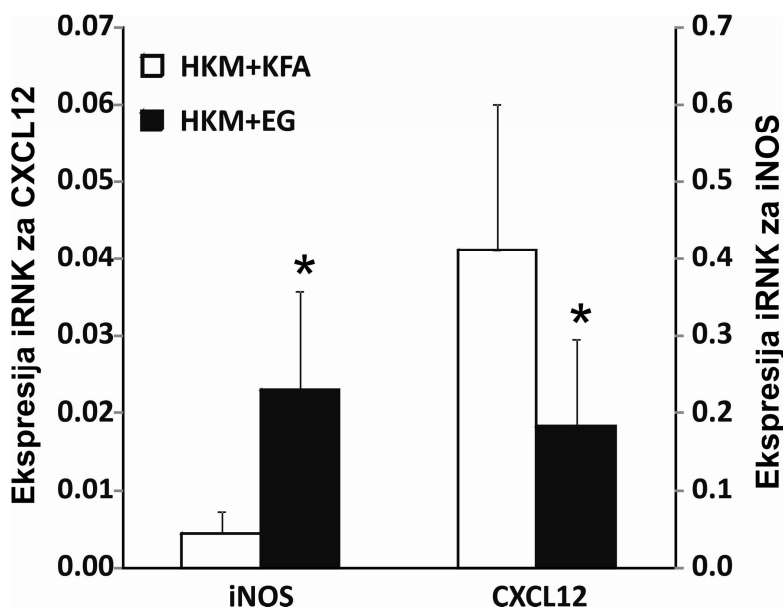
Nakon imunizacije HKM+elementalno gvožđe (EG) DA pacovi su razvili hiperakutni tip EAE-a. Kod HKM+EG imunizovanih pacova ranije su se javili prvi klinički pokazatelji bolesti, bolest je brže napredovala i simptomi bolesti na piku EAE-a bili su teži, u poređenju sa DA pacovima imunizovanim HKM+KFA (Slika 3).



Slika 3. Klinička slika DA pacova imunizovanih HKM+EG ili HKM+KFA. EAE je indukovao kod DA pacova ubrizgavanjem HKM+EG ili HKM+KFA, intradermalno u zadnje šape. Pacovima su pripisivane vrednosti u skladu sa sledećom skalom: 0, odsustvo kliničkih pokazatelja; 1, slabost repa; 2, pareza zadnjih udova; 3, paraliza zadnjih udova. Vrednosti između navedenih su bile dodeljivane ukoliko su klinički pokazatelji bili slabiji od tipičnih za određenu vrednost. Klinički skor imunizovanih pacova predstavljen je kao srednja vrednost +/- SE 20 pacova po grupi. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između pacova imunizovanih HKM+KFA i HKM+EG.

4.4 Razlike u ekspresiji iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine između HKM+EG i HKM+KFA imunizovanih DA pacova

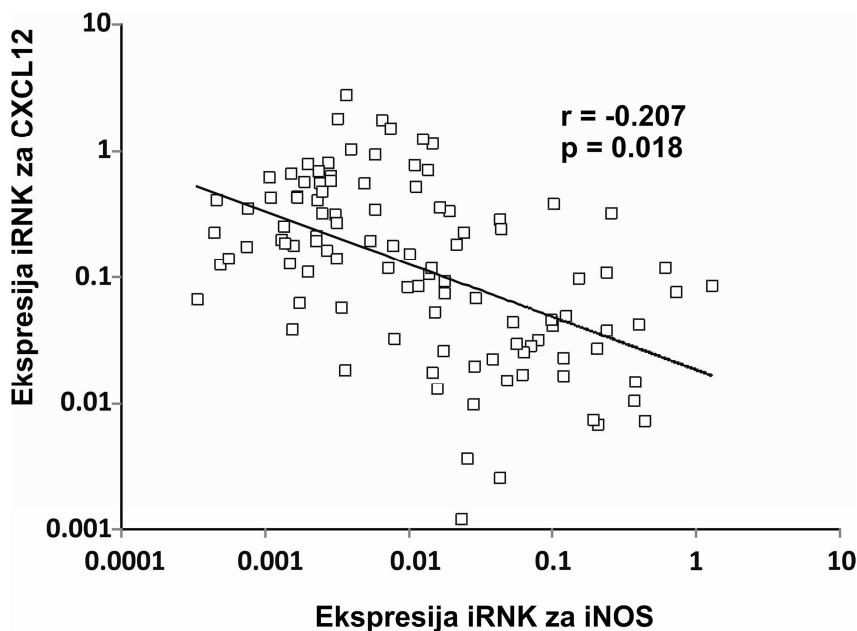
Od ranije je poznato da je težina kliničke slike kod DA pacova, koji razvijaju hiperakutni tip EAE-a nakon imunizacije HKM+elementalno gvožđe (EG) u vezi sa visokom produkcijom NO u CNS-u (Miljković et al. 2011). Stoga smo želeli da utvrdimo da li visoka produkcija NO u CNS-u DA pacova imunizovanih HKM+EG korelira sa redukcijom ekspresije iRNK za CXCL12. Ova pretpostavka se pokazala kao tačna, s obzirom da smo detektovali višu ekspresiju iRNK za iNOS i nižu ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 na piku EAE-a kod DA pacova imunizovanih HKM+EG u poređenju sa pacovima imunizovanim HKM+KFA, koji razvijaju blaži oblik bolesti (Slika 4).



Slika 4. Ekspresija iRNK za iNOS i CXCL12 u HKM DA pacova imunizovanih HKM+KFA ili HKM+KFA na piku EAE-a. HKM su dobijeni iz DA pacova imunizovanih HKM+KFA ili HKM+EG na piku EAE-a. RNK je izolovana iz HKM i RT-Real time PCR je urađen. Uzorci iz najmanje tri nezavisna eksperimenta korišćeni su u analizi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost + SD. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između HKM+KFA i HKM+EG imunizovanih DA pacova.

4.5 Ekspresija iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 su obrnuto proporcionalne u EAE-u

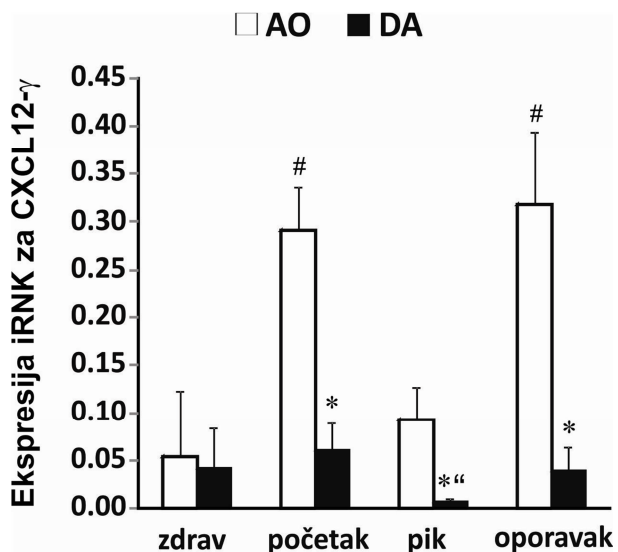
Da bismo dodatno ispitali vezu između ekspresije iNOS i CXCL12 urađena je analiza koja je obuhvatila veliki broj uzoraka uzimajući u obzir zdrave pacove i pacove u različitim fazama bolesti. Sveukupno je analizirano 106 uzoraka kičmenih moždina DA i AO pacova, bilo zdravih bilo imunizovanih HKM+KFA ili HKM+EG. Jasna negativna korelacija između ekspresije iRNK za iNOS i ukupni CXCL12 je utvrđena (Slika 5). Ovi rezultati su ukazali da bi NO, glavni produkt aktivnosti iNOS, mogao biti odgovoran za inhibiciju ekspresije CXCL12 tokom EAE-a kod DA pacova.



Slika 5. Korelacija ekspresije iRNK za iNOS i CXCL12 u HKM DA i AO pacova, zdravih ili imunizovanih HKM+KFA ili HKM+EG. HKM su dobijeni iz DA i AO pacova imunizovanih HKM+KFA ili HKM+EG u različitim fazama EAE-a ili iz zdravih, ne-imunizovanih DA i AO pacova. RNK je izolovana iz HKM i RT-Real time PCR je urađen. Broj analiziranih HKM je bio 106. r predstavlja koeficijent korelacije ekspresije iRNK za iNOS i CXCL12. $p < 0.05$ predstavlja koeficijent verovatnoće, koji ukazuje na statistički značajnu negativnu korelaciju između ekspresije iRNK za iNOS i CXCL12.

4.6 Kinetika ekspresije iRNK za CXCL12- γ izoformu u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova tokom EAE-a

Ekspresija specifične izoforme hemokina CXCL12, CXCL12- γ , merena je u HKM AO i DA pacova imunizovanih HKM+KFA i u zdravih (ne-imunizovanih) pacova. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ bila je slična kod zdravih pacova oba soja. Povećala se značajno kod AO pacova, ali ne i kod DA pacova u fazi početka bolesti kod DA pacova. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ bila je značajno smanjena kod oba soja u fazi pika kod DA pacova, zatim se značajno povećala u fazi oporavka kod AO pacova. Uočljivo je da je kinetika ekspresije iRNK za CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine bila slična kod AO i DA pacova. Ipak, u svim fazama bolesti ekspresija CXCL12- γ bila je viša kod AO nego kod DA pacova. Takođe, ni u jednoj fazi ekspresija CXCL12- γ u DA pacova nije bila viša u odnosu na ekspresiju u zdravih pacova (Slika 6).

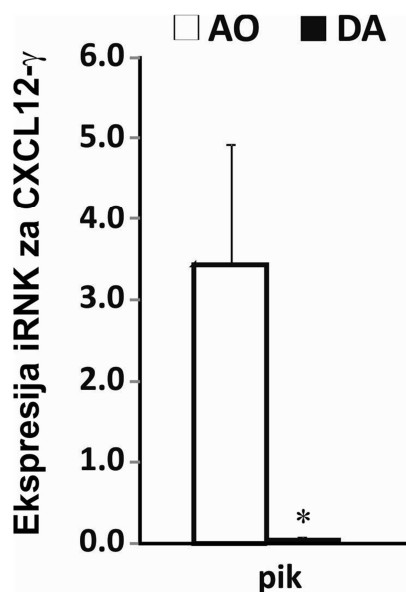


Slika 6. Kinetika ekspresije iRNK za CXCL12- γ izoformu u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova tokom EAE-a. Pacovi su imunizovani HKM+KFA i žrtvovani na početku, piku ili u fazi oporavka od EAE-a u DA pacova. Zdravi (ne-imunizovani) pacovi su takođe korišćeni u eksperimentu. Kičmene moždine su izolovane u određenim fazama bolesti i homogenizovane. RNK je izolovana iz homogenata i RT-Real time PCR je urađen. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ predstavljena je kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih iz 6 pacova po grupi. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

$p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku u poređenju sa zdravim pacovima i pacovima na piku bolesti u okviru soja, * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na uzorke na početku i oporavku od bolesti u okviru soja pacova.

4.7 Niža ekspresija iRNK za CXCL12- γ u malim krvnim sudovima kičmene moždine DA pacova u odnosu na ekspresiju u AO pacova na piku EAE-a

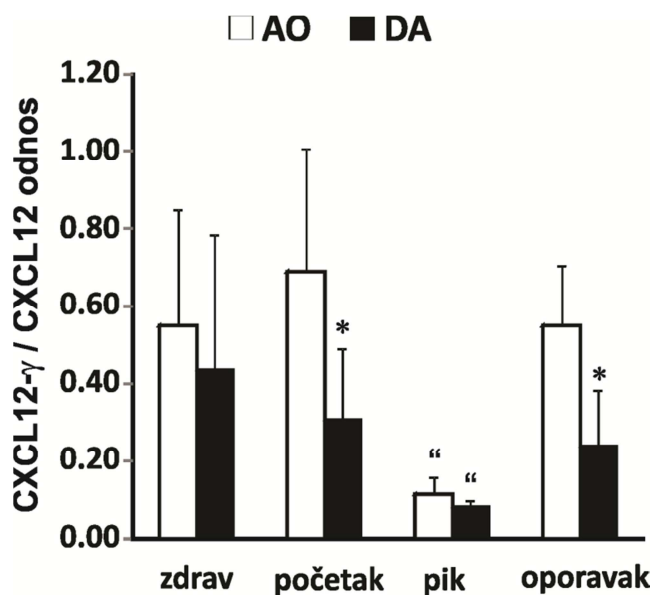
Ćelije endotela malih krvnih sudova (MKS) predstavljaju jedan od glavnih izvora hemokina CXCL12 u neuroinflamaciji. Iz tog razloga ekspresija CXCL12- γ izoforme merena je u MKS izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova na piku EAE-a. Pokazalo se da je ekspresija iRNK za CXCL12- γ višestruko veća u MKS AO pacova u poređenju sa MKS DA pacova (Slika 7).



Slika 7. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ u malim krvnim sudovima kičmene moždine AO i DA pacova na piku EAE-a. Pacovi su imunizovani HKM+KFA i žrtvovani na piku EAE-a kod DA pacova. Kičmene moždine su izolovane i MKS izolovani iz njih. RNK je izolovana iz malih krvnih sudova i RT-Real time PCR je urađen. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ predstavljena je kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih iz 6 pacova. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

4.8 Različiti udeo ekspresije iRNK za CXCL12- γ u ekspresiji iRNK za ukupni CXCL12 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova tokom EAE-a

Odnos ekspresije iRNK za izoformu CXCL12- γ i iRNK za sve izoforme CXCL12 takođe je analiziran kod zdravih i pacova imunizovanih HKM+KFA. Ovaj odnos je bio sličan kod zdravih AO i DA pacova, kao i na maksimumu bolesti kod DA pacova. (Slika 8). Ipak, primetan je značajno veći udeo ekspresije iRNK za CXCL12- γ u ekspresiji svih izoformi ovog hemokina kod AO pacova na početku bolesti i u fazi oporavka DA pacova (Slika 8). Ovi rezultati jasno pokazuju da je visoka ekspresija CXCL12- γ u CNS-u, specifična za AO soj pacova, otporan na indukciju EAE-a.

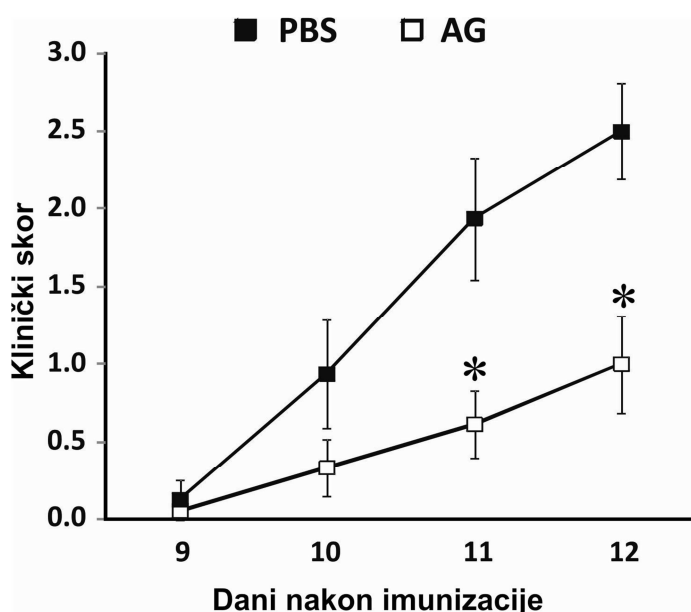


Slika 8. Odnos ekspresije iRNK za CXCL12- γ i za ukupni CXCL12 kičmenoj moždini AO i DA pacova.

Pacovi su imunizovani HKM+KFA i žrtvovani na početku, piku ili u fazi oporavka od EAE-a kod DA pacova. Zdravi (ne-imunizovani) pacovi su takođe korišćeni u eksperimentu. Kičmene moždine su izolovane i homogenizovane. RNK je izolovana iz HKM i RT-Real time PCR je urađen. Odnos ekspresije iRNK za CXCL12- γ i ekspresije iRNK za ukupni CXCL12 predstavljani su kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih iz 6 pacova po grupi. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova, “ $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na uzorke na početku i oporavku od bolesti u okviru soja pacova.

4.9 *In vivo* inhibicija aktivnosti iNOS ublažava simptome EAE-a u DA pacova

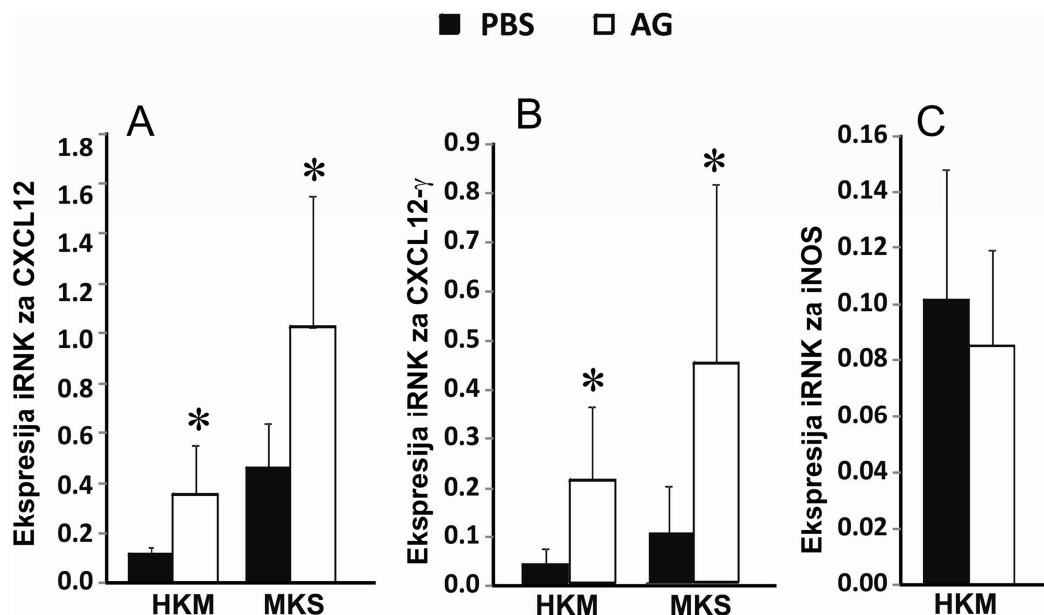
Da bismo ispitali važnost NO za patogenezu EAE-a, DA pacove imunizovane u cilju razvijanja EAE-a, tretirali smo aminoguanidinom (AG), selektivnim inhibitorom aktivnosti iNOS. Cilj eksperimenta bio je da utvrdimo da li inhibicija iNOS u toku EAE-a ima uticaj na težinu bolesti. S obzirom da nam je cilj bio da inhibiramo aktivnost iNOS u efektorskoj fazi bolesti, tretman DA pacova započet je 9. dana nakon imunizacije (kada se prvi simptomi EAE-a kod DA pacova najčešće javljaju). Pacovi su praćeni do faze kad je bolest dostigla maksimum u kontrolnoj grupi (grupa koja je dobijala PBS). AG tretman je ublažio kliničke pokazatelje EAE-a u tretiranih pacova (Slika 9).



Slika 9. *In vivo* inhibicija aktivnosti iNOS u efektorskoj fazi EAE-a u DA pacova. DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, pacovi su tretirani jednom dnevno AG-om (i.p. 400 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), dok bolest nije dostigla svoj maksimum u grupi koja je dobijala PBS (12. dan nakon imunizacije). U ovoj fazi procenjen je klinički tok bolesti. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost +/- SD vrednosti dobijenih u tri nezavisna eksperimenta (9 pacova po grupi). * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između AG i PBS.

4.10 *In vivo* inhibicija aktivnosti iNOS povećava ekspresiju iRNK za CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima

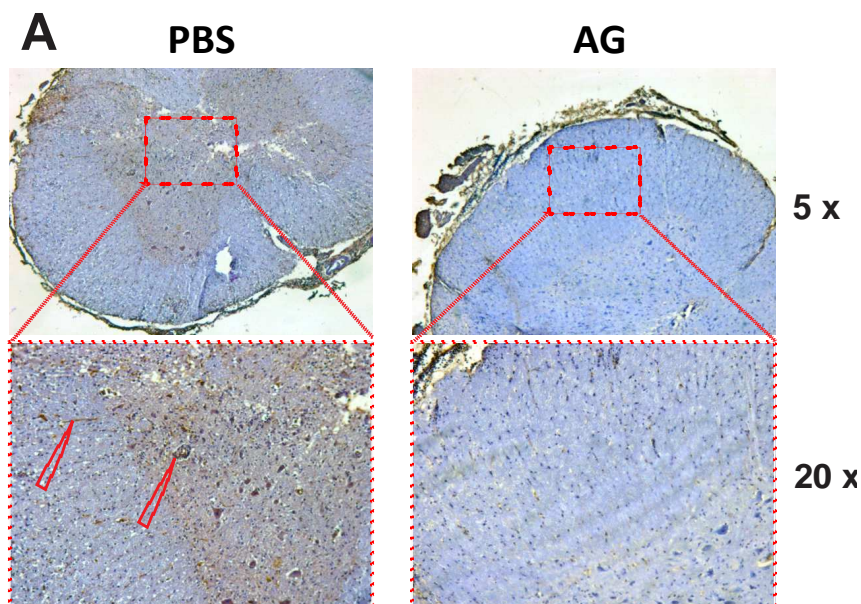
Pored uticaja na klinički tok EAE-a, želeli smo da ispitamo važnost NO u regulaciji ekspresije CXCL12 u neuroinflamaciji *in vivo*. S obzirom na to, u fazi kada je bolest dostigla maksimum u kontrolnoj grupi (grupa koja je dobijala PBS) životinje su žrtvovane i ispitana je ekspresija iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u HKM i MKS. AG tretman je povećao ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u HKM i MKS (Slika 10A,B). AG nije uticao na ekspresiju iRNK za iNOS (Slika 10C).

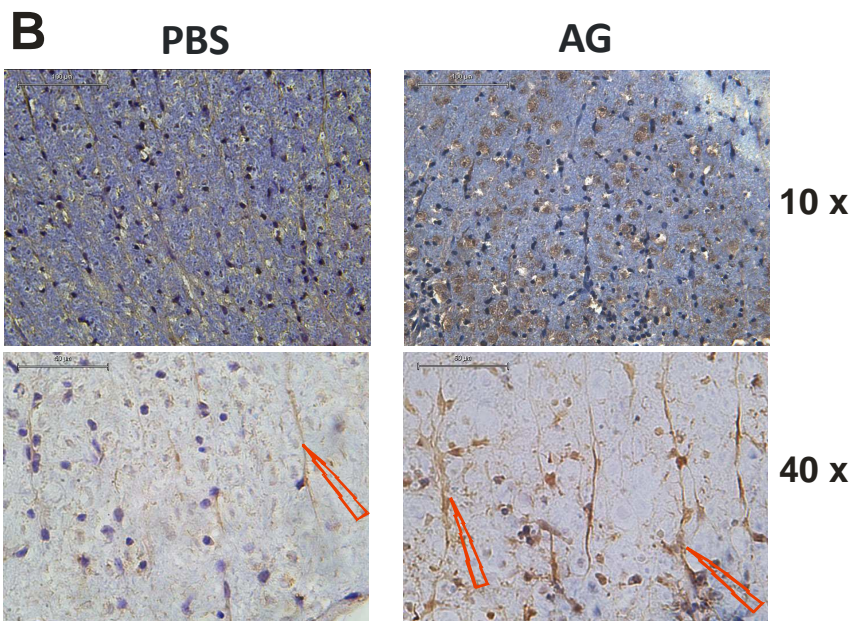


Slika 10. Efekat *in vivo* inhibicije aktivnosti iNOS u efektorskoj fazi EAE-a u DA pacova na ekspresiju iRNK za CXCL12, CXCL12- γ i iNOS u HKM i MKS. DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, pacovi su tretirani jednom dnevno AG-om (i.p. 400 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), dok bolest nije dostigla svoj maksimum u grupi koja je dobijala PBS (12. dan nakon imunizacije). U ovoj fazi životinje su žrtvovane i kičmene moždine su izolovane. Kičmene moždine su homogenizovane i mali krvni sudovi su izolovani, iz kojih je izolovana RNK i RT-Real time PCR je urađen. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost + SD vrednosti dobijenih u tri nezavisna eksperimenta (9 pacova po grupi). * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između AG i PBS.

4.11 *In vivo* inhibicija iNOS smanjuje produkciju NO, a povećava produkciju CXCL12 u tkivu kičmene moždine

Dodatno, ispitivali smo uticaj inhibicije aktivnosti iNOS na produkciju CXCL12 u tkivu kičmene moždine. AG tretman je efikasno smanjio produkciju NO, što smo utvrdili imunohistohemijskim bojenjem nitrotirozinskih ostataka na proteinima kičmene moždine (Slika 11A). Paralelno, imunohistohemijskim bojenjem potvrđena je povećana ekspresija CXCL12 u kičmenim moždinama pacova tretiranih AG-om (Slika 11B). CXCL12 pozitivne ćelije lokalizovane su skoro u potpunosti u beloj masi kičmene moždine u obe gupe. Bojenje relativno slabog intenziteta u kontrolnoj grupi primećeno je u ćelijama sa dugim, tankim, nerazgranatim nastavcima koji se pružaju ka pialnoj površini, predstavljajući najverovatnije fibrozne astrocite. CXCL12 pozitivna mesta u pacova tretiranih AG-om širila su se od ćelijskih nastavaka dublje u parenhim kičmene moždine. Takođe krvni sudovi su bili pozitivni na CXCL12. Ukupno, gustina CXCL12 pozitivnih struktura u beloj masi kičmene moždine bila je značajno veća u pacova tretiranih AG-om u odnosu na kontrolnu grupu (8.0 +/- 1.0 % prema 5.0 +/- 1.2 %).

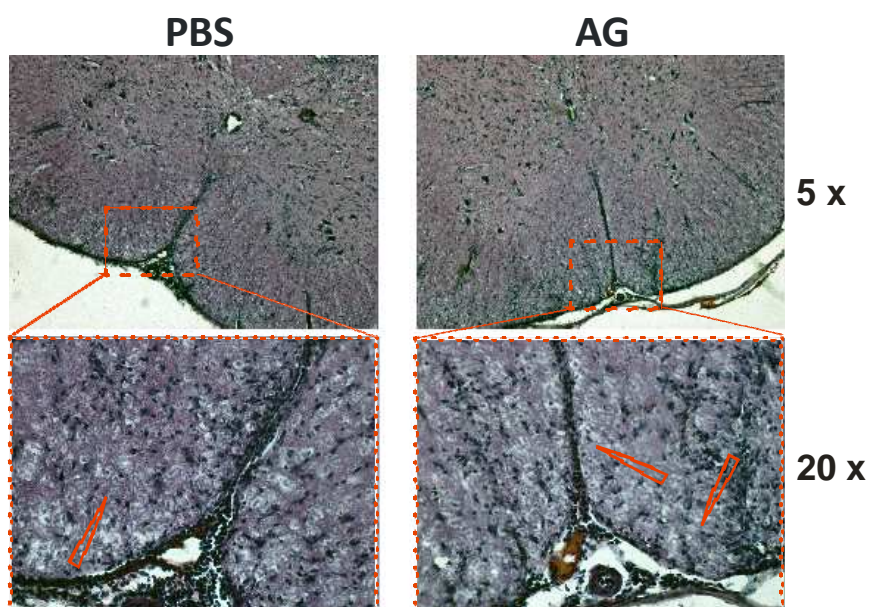




Slika 11. Uticaj AG-a na ekspresiju CXCL12 u kičmenoj moždini. DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, pacovi su tretirani jednom dnevno AG-om (i.p. 400 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), dok bolest nije dostigla svoj maksimum u grupi koja je dobijala PBS (12. dan nakon imunizacije). U ovoj fazi, životinje su žrtvovane, kičmene moždine izolovane i pripremljene za histološku analizu. Preseci kičmenih moždina su obeleženi antitelima specifičnim za nitrotirozin (A) ili antitelima specifičnim za CXCL12 (B). Reprezentativni preseci predstavljeni su na slikama A i B sa uveličanjem naznačenim pored fotografija. Delovi preseka prikazani većim uveličanjem predstavljaju pravougaonikom uokvirene delove fotografije snimljene manjim uveličanjem (A, B). Strukture pozitivne na nitrotirozin (A) i CXCL12 (B) naznačene su strelicama.

4.12 *In vivo* inhibicija iNOS ne utiče na brojnost imunskih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu

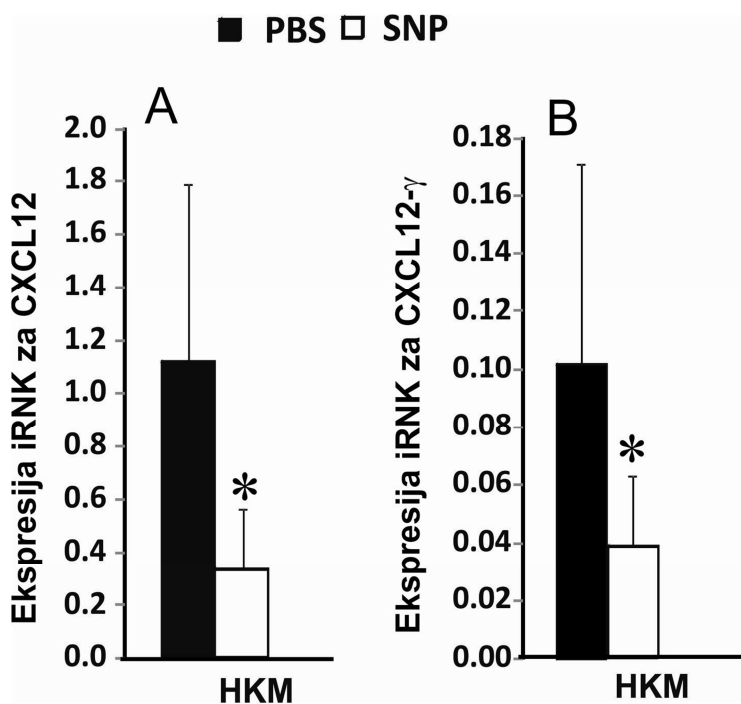
Uobičajeno je da broj imunskih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu tokom EAE-a pozitivno korelira sa kliničkim pokazateljima bolesti. Iako su AG-om tretirani pacovi pokazali slabije simptome EAE-a, značajne razlike u brojnosti imunskih ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu između kontrolne grupe i grupe koja je tretirana AG-om nisu primećene (Slika 12).



Slika 12. Uticaj AG-a na ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu. DA pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, pacovi su tretirani jednom dnevno AG-om (i.p. 400 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), dok bolest nije dostigla svoj maksimum u grupi koja je dobijala PBS (12. dan nakon imunizacije). U ovoj fazi, životinje su žrtvovane, kičmene moždine izolovane i pripremljene za histološku analizu. Preseci su obojeni hematoksilinom i eozinom. Reprezentativni preseci predstavljeni su na slici sa uveličanjem naznačenim pored fotografija. Delovi preseka prikazani većim uveličanjem predstavljaju pravougaonikom uokvirene delove fotografije snimljene manjim uveličanjem. Ćelije koje su infiltrirale kičmenu moždinu naznačene su strelicama.

4.13 Tretman SNP-om snižava ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine AO pacova

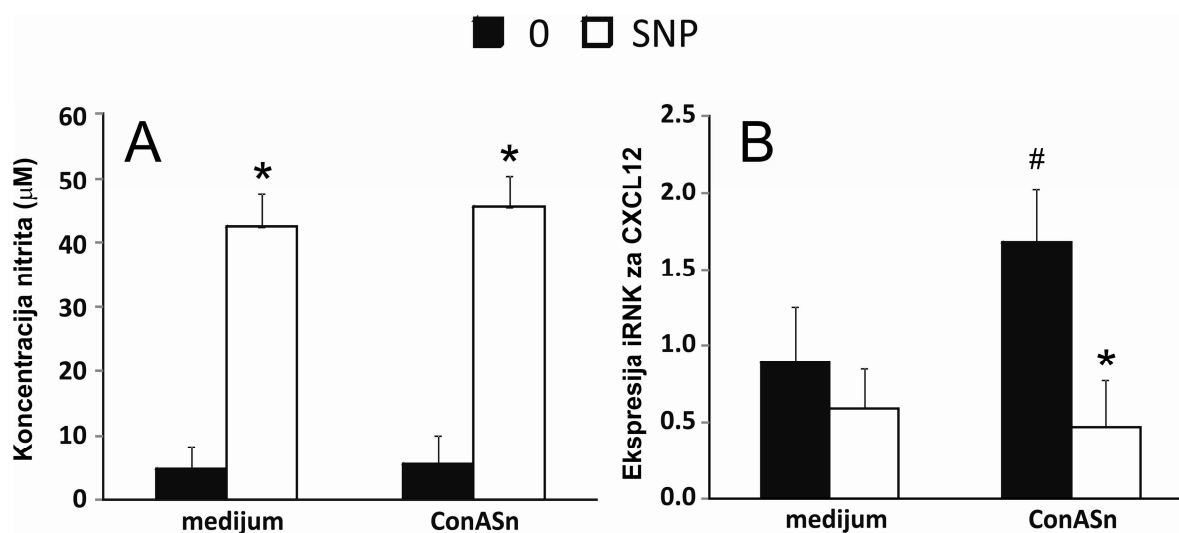
Uporedo sa DA pacovima, imunizovani su i AO pacovi. 9. dana nakon imunizacije (kada se prvi simptoma bolesti kod DA pacova najčešće javljaju), započet je tretman AO pacova natrijum nitroprusidom (eng. sodium nitroprusside, SNP), NO donorom. Tretman je trajao dok EAE nije dostigao maksimum kod imunizovanih DA pacova. SNP je redukovao ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatu kičmene moždine AO pacova u fazi kada je bolest dostigla maksimum kod DA pacova (Slika 13A,B). Ipak, tretman SNP-om nije indukovao kliničke simptome EAE-a u imunizovanih AO pacova.



Slika 13. Efekat tretmana AO pacova SNP-om na ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ . AO pacovi su imunizovani HKM+KFA. Počev od 9. dana nakon imunizacije, pacovi su tretirani jednom dnevno SNP-om (i.p. 1 mg/kg telesne težine) ili PBS-om (kontrola), dok bolest nije dostigla svoj maksimum u DA pacova paralelno imunizovanih (dani 12-14 nakon imunizacije). U ovoj fazi AO pacovi su žrtvovani, kičmene moždine izolovane i homogenizovane. Izolovana je RNK i RT-Real time PCR je urađen. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između kontrolne grupe (PBS) grupe tretirane SNP-om.

4.14 SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u malim krvnim sudovima DA pacova *in vitro*

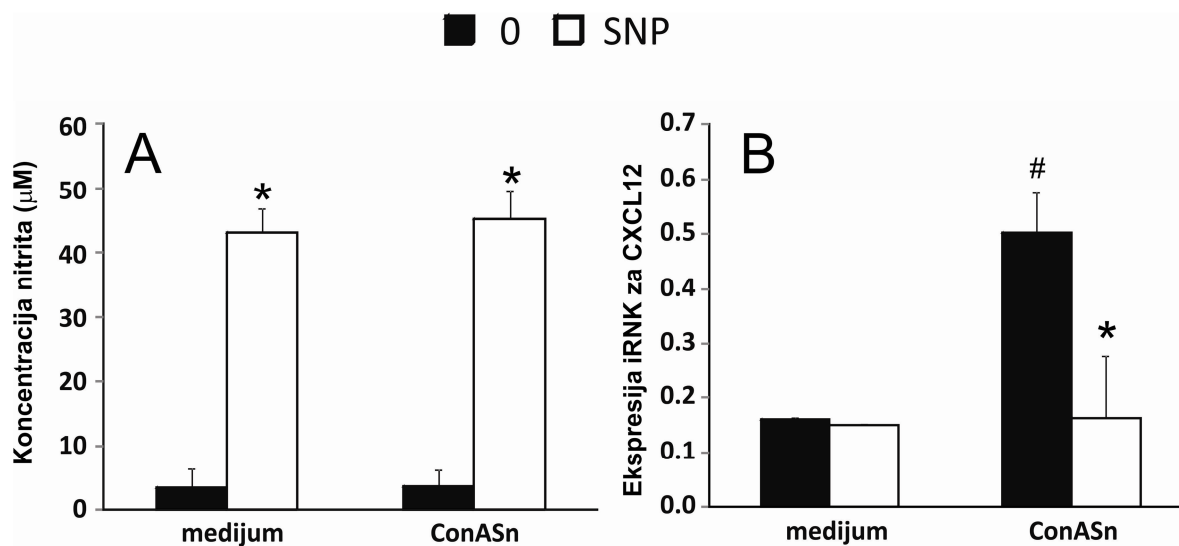
Da bismo dalje testirali našu pretpostavku da je NO odgovoran za inhibiciju ekspresije iRNK za CXCL12 u CNS-u, MKS, značajni producenti CXCL12 u neuroinflamaciji, izloženi su dejstvu SNP-a. Sa ciljem simuliranja inflamatornog okruženja u CNS-u, koje karakteriše EAE, nastalog oslobađanjem medijatora iz infiltrirajućih imunskih ćelija, ćelijske kulture su simultano stimulisane ConASn (objašnjenje u Materijal i Metode). ConASn je stimulisao ekspresiju iRNK za CXCL12 u MKS (Slika 14B). SNP je oslobodio visoke količine NO (Slika 14A) i značajno inhibirao ekspresiju iRNK za CXCL12 u MKS stimulisanim ConASn (Slika 14B). Ovi eksperimenti jasno ukazuju na ulogu NO u inhibiciji ekspresije iRNK za CXCL12 u MKS.



Slika 14. Uticaj SNP-a na ekspresiju iRNK za CXCL12 u MKS. MKS su tretirani SNP-om (200 μM) u odsustvu (medijum) ili prisustvu 20% ConASn (A,B). RNK je izolovana iz MKS i RT-Real time PCR je urađen (B). U supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija nitrita (A). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih u tri nezavisna eksperimenta. *p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između kultura tretiranih SNP-om i netretiranih. #p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između kultura gajenih u medijumu i kultura stimulisanih ConASn.

4.15 SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima DA pacova *in vitro*

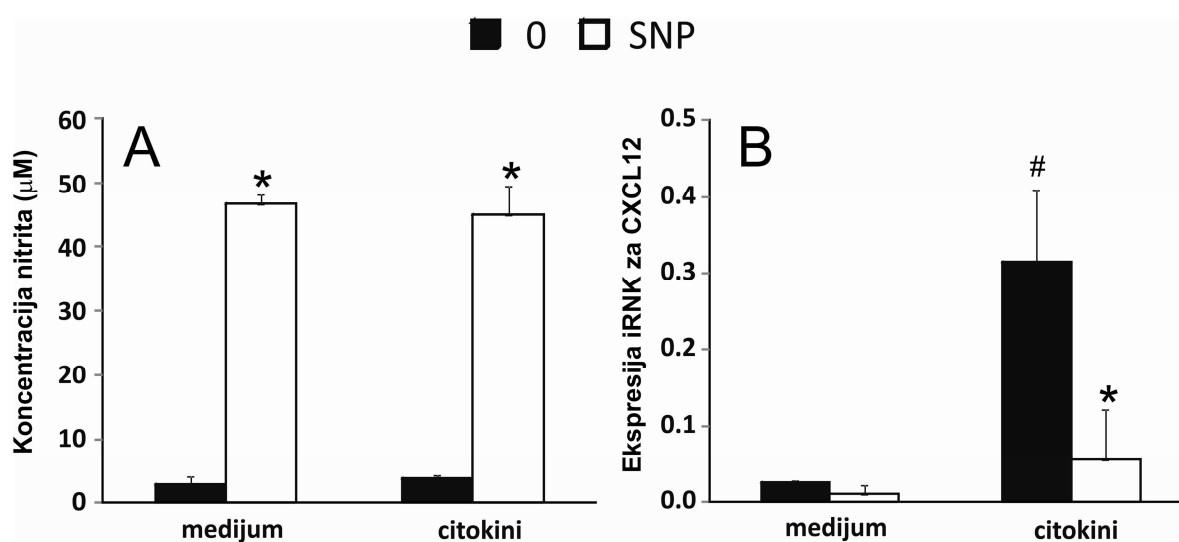
Da bismo testirali našu pretpostavku da je NO odgovoran za inhibiciju ekspresije iRNK za CXCL12 u CNS-u, astrociti, istaknuti producenti CXCL12 u neuroinflamaciji, izloženi su dejstvu SNP-a. Kao i MKS, astrociti su simultano stimulisani ConASn. ConASn je stimulisao ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima (Slika 15B). SNP je oslobodio visoke količine NO (Slika 15A) i značajno inhibirao ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima stimulisanim ConASn (Slika 15B). Ovi eksperimenti su pokazali da NO inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima.



Slika 15. Uticaj SNP-a na ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima. Astrociti su tretirani SNP-om (200 μ M) u odsustvu (medijum) ili prisustvu 20% ConASn (A,B). RNK je izolovana iz astrocita i RT-Real time PCR je urađen (B). U supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija nitrita (A). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih u tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između kultura tretiranih SNP-om i netretiranih. # $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između kultura gajenih u medijumu i kultura stimulisanih ConASn.

4.16 SNP inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u C6 ćelijama *in vitro*

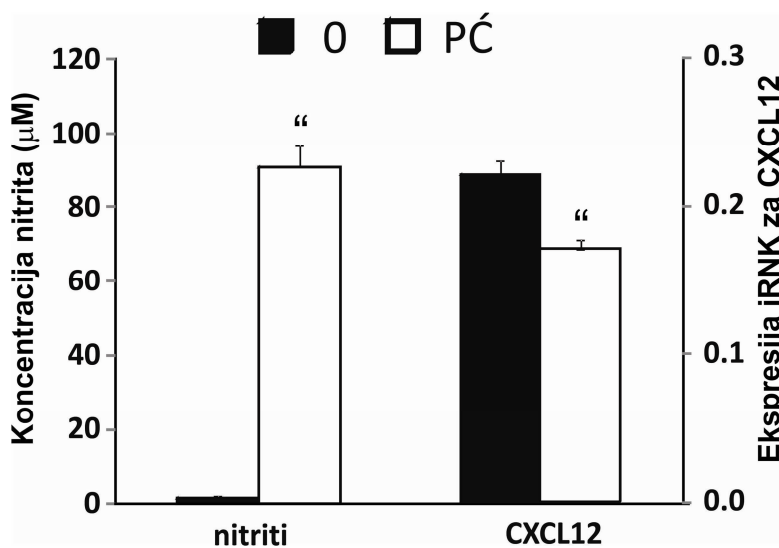
S obzirom na način dobijanja, prisustvo određene proporcije ćelija mikroglije neizbežno je u primarnoj kulturi astrocita. Ovaj podatak treba imati u vidu kada se tumače rezultati dobijeni sa primarnom kulturom astrocita. Iz tog razloga uticaj SNP-a na C6 ćelijsku liniju astrocita je analiziran. Kako vijabilitet C6 ćelija može biti narušen stimulacijom ConASn (nepublikovano zapažanje), ove ćelije su stimulisane IL-1 β , TNF, IFN- γ i IL-17. Mešavina pomenutih proinflamatornih citokina indukovala je ekspresiju iRNK za CXCL12 u C6 ćelijama, dok je SNP oslobađanjem značajne količine NO inhibirao ekspresiju iRNK za CXCL12 u ovim ćelijama (Slika 16A,B). Dakle, rezultati dobijeni sa primarnom ćelijskom kulturom astrocita ponovljeni su sa ćelijskom linijom astrocita. Ovi eksperimenti su potvrdili da NO inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima.



Slika 16. Uticaj SNP-a na ekspresiju iRNK za CXCL12 u C6 ćelijama. C6 ćelije su tretirane SNP-om (200 μ M) u odsustvu (medijum) ili prisustvu mešavine citokina IL-1 β (10ng/ml) + TNF (10ng/ml) + IFN- γ (10ng/ml) + IL-17 (50ng/ml) (citokini, A,B). RNK je izolovana iz C6 ćelija i RT-Real time PCR je urađen (B). U supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija nitrita (A). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih u tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između kultura tretiranih SNP-om i netretiranih. # $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između kultura gajenih u medijumu i kultura stimulisanih mešavinom citokina.

4.17 NO poreklom od peritoneumskih ćelija smanjuje ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima DA pacova *in vitro*

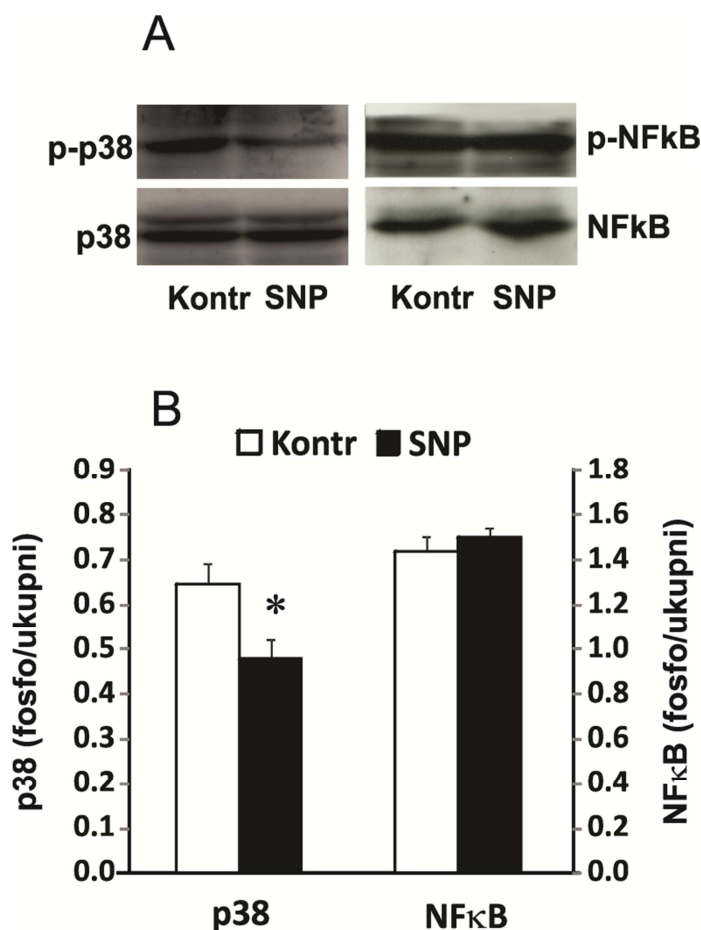
Dodatno, testiran je uticaj NO poreklom iz ćelijskog izvora na ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima. Peritoneumske ćelije (PĆ) su uglavnom sačinjene od makrofaga (više od 60%), najistaknutijih producenata NO u imunskom sistemu. Iz tog razloga astrociti su kokultivisani sa PĆ. Merenje oslobođenog NO u supernatantima ćelijske kokulture potvrdilo je da su PĆ značajni producenti NO (Slika 17). Ekspresija iRNK za CXCL12 u astrocitima kokultivisanim sa PĆ je bila niža u odnosu na ekspresiju u astrocitima gajenim u medijumu bez PĆ (Slika 17). Sveukupno, ovi *in vitro* rezultati pokazuju da NO inhibira ekspresiju iRNK za CXCL12 u ćelijama CNS-a.



Slika 17. Uticaj NO poreklom od PĆ na ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima. Astrociti su kultivisani sami ili kokultivisani sa peritoneumskim ćelijama (PĆ), koje su posađene u inserte za ćelijsku kulturu i stavljene u bunare u koje su prethodno posađeni astrociti. RNK je izolovana iz astrocita i RT-Real time PCR je urađen. U supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija nitrita. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost + SD rezultata dobijenih u tri nezavisna eksperimenta. **p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između astrocita gajenih u prisustvu i odsustvu PĆ.

4.18 SNP smanjuje aktivaciju p38 MAP kinaze u astrocitima DA pacova

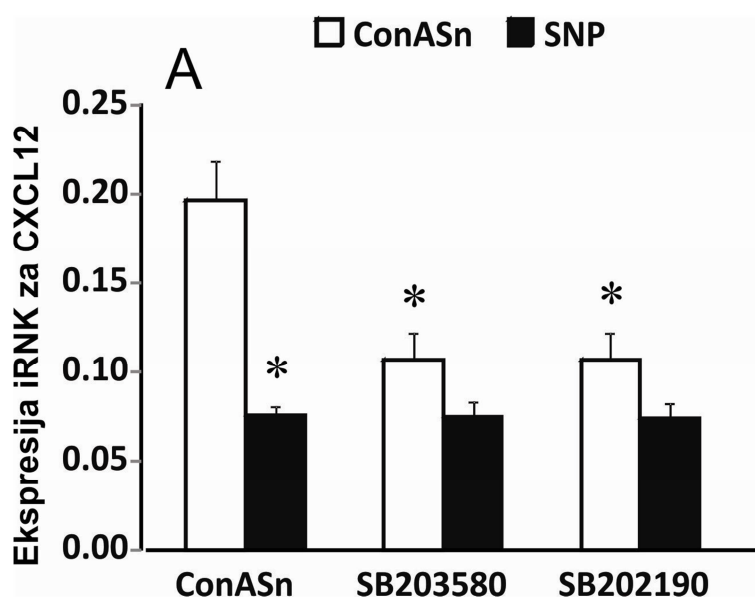
Da bismo ispitali unutarćelijsku signalizaciju odgovornu za inhibiciju ekspresije CXCL12 u astrocitima, analiziran je uticaj SNP-a na aktivaciju p38 MAP kinaze i NF- κ B. Kao pokazatelj aktivacije ispitivan je nivo fosforilacije ovih molekula. SNP je smanjio ConASn-indukovanu fosforilaciju p38 MAP kinaze, ali nije imao uticaj na aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B u astrocitima (Slika 18A,B).

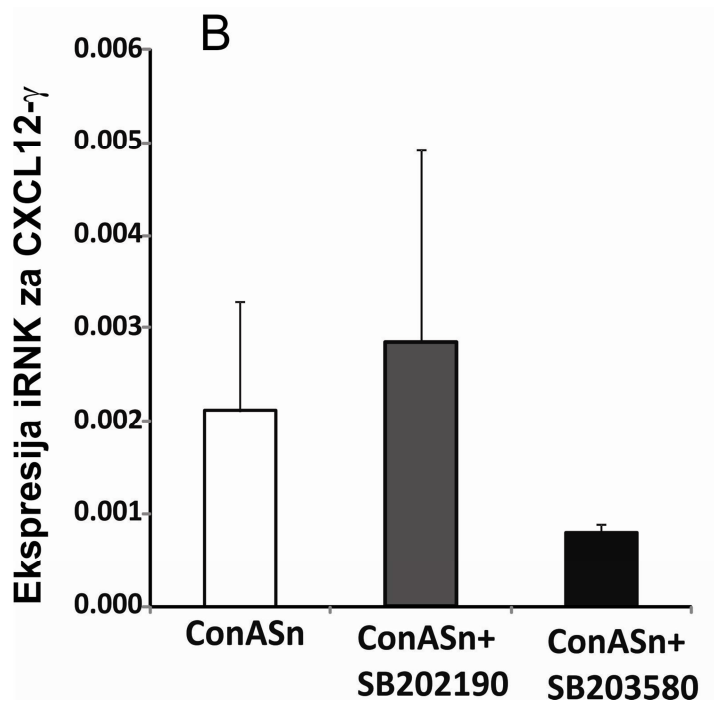


Slika 18. Uticaj SNP-a na signalizaciju p38 MAP kinaze u astrocitima. Astroцити су стимулирани 20% ConASn (Kontr) и третирани SNP-ом (200 μ M). Након периода инкубације (6h), астрoцити су лизирани и на тај начин добијени узорци су коришћени за имуноблот. Репрезентативни резултати имуноблота представљени су на слици А. Резултати на графiku B представљају средње вредности + SD резултата добијених у два независна експеримента. * $p < 0.05$ представља статистички значајну разлику између астрoцита стимулираних ConASn и астрoцита стимулираних ConASn и третираних SNP-ом.

4.19 Inhibitori p38 MAP kinaze inhibiraju ekspresiju iRNK za CXCL12, ali ne i za CXCL12- γ izoformu

Prethodni rezultati su ukazali na to da bi redukcija aktivacije p38 MAP kinaze mogla biti u vezi sa inhibiranjem ekspresije CXCL12 u astrocitima pod dejstvom NO. Da bismo ispitali ovu pretpostavku astrociti su stimulisani ConASn i tretirani inhibitorima aktivacije p38 MAP kinaze, SB203580 i SB202190. Oba inhibitora su smanjila ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima do veoma sličnog nivoa kao i SNP (Slika 19A). Pored toga, simultanom primenom inhibitora i SNP-a dobijen je isti efekat inhibicije CXCL12, kao kada je primenjen samo SNP, što implicira da je upravo signalizacija putem p38 MAP kinaze važna za inhibiciju ekspresije iRNK za ukupni CXCL12 u astrocitima pod uticajem NO. Sa druge strane inhibitori nisu imali uticaja na ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima. (Slika 19B).

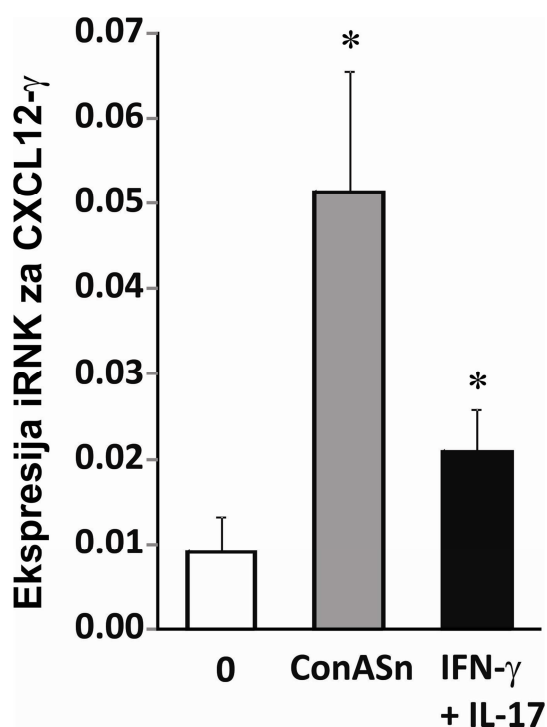




Slika 19. Uticaj inhibitora p38 MAP kinaze na ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u astrocitima. Astroцити DA pacova su stimulisani 20% ConASn i tretirani SNP-om (200 μ M) i/ili sa SB203580 (10 μ M) i/ili sa SB202190 (10 μ M). Nakon perioda inkubacije (6h), izolovana je RNK i RT-Real time PCR je urađen (A,B). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti + SD rezultata dobijenih u dva nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između astrocitа stimulisanih ConASn i astrocitа stimulisanih ConASn i tretiranih SNP-om ili SB203580 ili SB202190.

4.20 ConASn, interleukin (IL)-17 i interferon (IFN)- γ povećavaju ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima DA pacova *in vitro*

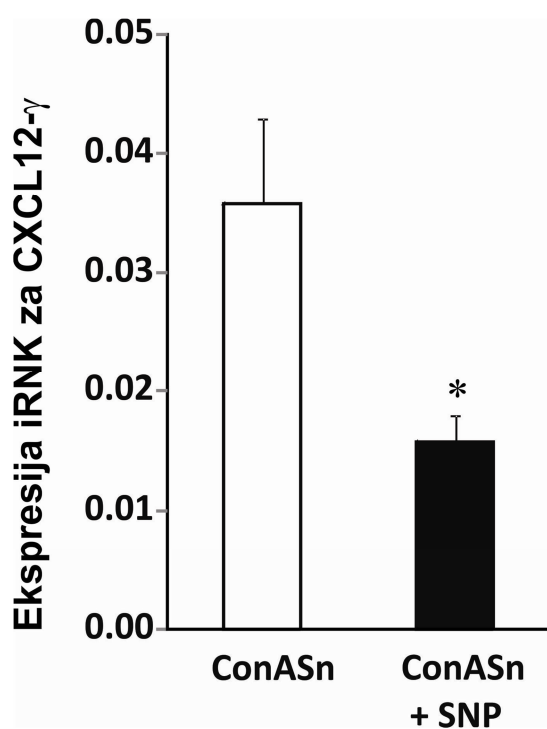
Sledeći cilj nam je bio da ispitamo da li je CXCL12- γ izoforma eksprimirana u astrocitima i da ispitamo uticaj proinflamatornih medijatora na njenu ekspresiju u ovim ćelijama *in vitro*. Astroцити, izolovani iz novorođenih DA pacova, stimulisani su ConASn ili IFN- γ +IL-17. Ekspresija CXCL12- γ detektovana je u nestimulisanim astrocitima i pod uticajem oba tretmana bila je povišena (Slika 20). Dakle, ekspresija CXCL12- γ indukovana je u astrocitima u inflamatornim uslovima.



Slika 20. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ u astrocitima. Astroцити DA pacova (1.5×10^5 /ml) su gajeni u odsustvu (0) ili prisustvu ConASn (20%) ili IFN- γ (10 ng/ml) + IL-17 (50 ng/ml). Nakon 24h inkubacije, RNK je izolovana i RT-Real time PCR urađen. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost + SD. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnim uzorcima (0).

4.21 SNP smanjuje ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima DA pacova stimulisanim ConASn *in vitro*

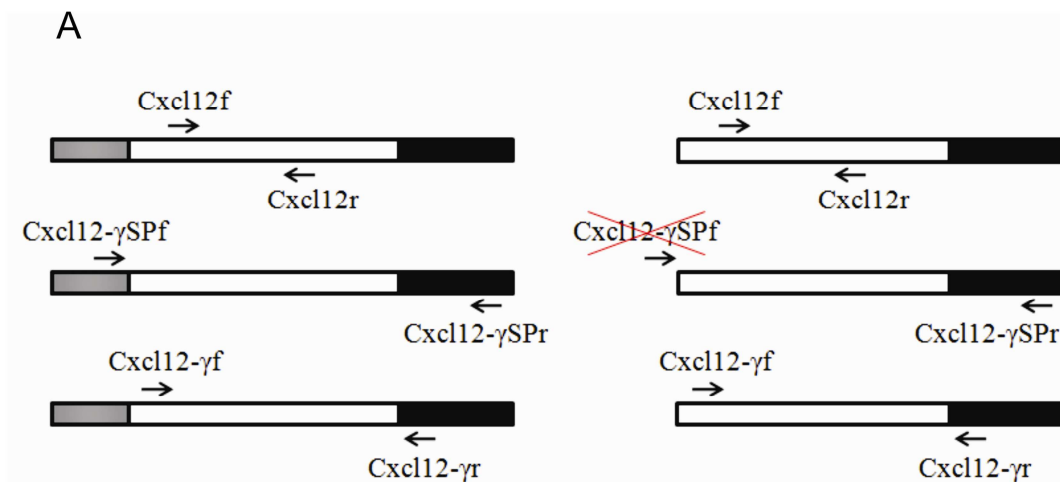
Da bismo testirali da li NO *in vitro* moduliše ekspresiju CXCL12- γ izoforme u astrocitima, ove ćelije su stimulisane ConASn i izložene dejstvu SNP-a, NO donirajućeg molekula. Ekspresija CXCL12- γ bila je značajno smanjena kada su ConASn-stimulisani astrociti tretirani SNP-om (Slika 21). Ovaj rezultat je pokazatelj da NO inhibira ekspresiju CXCL12- γ izoforme u astrocitima.

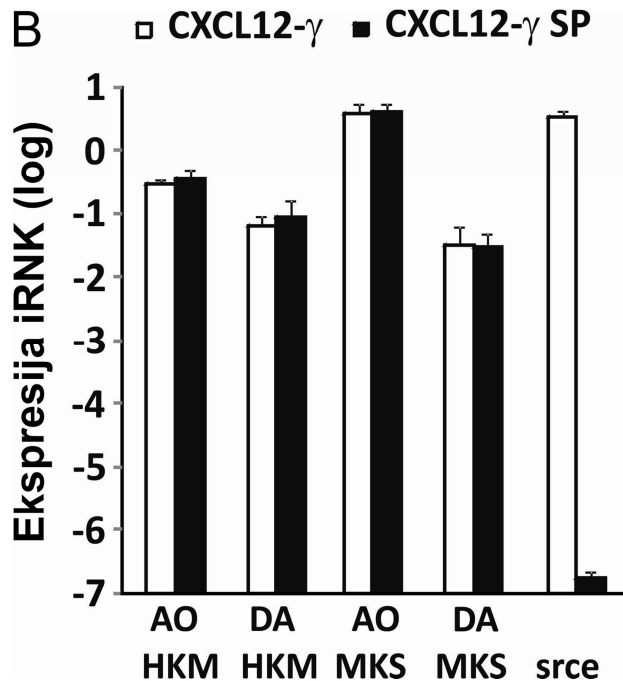


Slika 21. Uticaj SNP-a na ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u ConASn stimulisanim astrocitima. Astrociti DA pacova (1.5×10^5 /ml) stimulisani su ConASn (20%), u odsustvu ili prisustvu SNP-a (200 μ M). Nakon 24h inkubacije, RNK je izolovana i RT-Real time PCR urađen. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta predstavljani su kao srednja vrednost + SD. * $p < 0.05$ predstavlja statistički značajnu razliku između ConASn i ConASn+SNP tretiranih astrocita.

4.22 Ekspresija izoforme CXCL12- γ koja migrira u jedarce nije detektovana u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima

Da bismo istražili da li je forma CXCL12- γ koja migrira u jedarce eksprimirana u CNS-u tokom neuroinflamacije, urađen je RT-Real time PCR sa prajmerima koji specifično prepoznaju sve izoforme CXCL12- γ , kao i sa prajmerima koji umnožavaju jedino one komplementarne DNK koje poseduju kod za signalni peptid, CXCL12- γ SP (prikazano na Slici 17A). Ono što je važno napomenuti je da samo alternativno iskrojene varijante CXCL12- γ bez signalnog peptida imaju sposobnost migracije u jedarce. Stoga, razlika u ekspresiji iRNK detektovana korišćenjem CXCL12- γ prajmera i CXCL12- γ SP prajmera ukazuje na postojanje forme koja migrira u jedarce. Ipak, takva razlika nije detektovana u HKM, niti u MKS kod AO i DA pacova na piku EAE-a (Slika 22B). Da bismo proverili da li je metodologija koju smo koristili adekvatna uradili smo RT-Real time PCR i na uzorcima homogenata srca DA pacova, koje je služilo kao pozitivna kontrola. Detektovana je mnogostruko viša ekspresija CXCL12- γ u poređenju sa CXCL12- γ SP (Slika 22B), što govori da postoji visoka ekspresija forme koja migrira u jedarce u uzorcima srca i da je primenjena metodologija adekvatna.





Slika 22. Detekcija ekspresije iRNK za CXCL12- γ izoformu koj migrira u jedarce. Šematski prikaz metodologije (A). Šematski prikaz čitave komplementarne DNK za CXCL12- γ (levo) i kraće alternativno iskrojene varijante CXCL12- γ komplementarne DNK bez sekvence koja kodira signalni peptid (desno). Strelice ukazuju na poziciju prajmera. CXCL12 f/r - prajmeri koji umnožavaju sve izoforme CXCL12; CXCL12- γ SP f/r - prajmeri koji umnožavaju CXCL12- γ izoformu sa signalnim peptidom i CXCL12- γ f/r - prajmeri koji umnožavaju izoforme CXCL12- γ sa signalnim peptidom i bez njega. Sivi pravougaonik predstavlja sekvencu za signalni peptid, dok crni pravougaonik predstavlja C-terminus specifičan za CXCL12- γ izoformu koji sadrži signal za lokalizaciju u jedarce. Ekspresija iRNK za CXCL12- γ izoformu koja migrira u jedarce (B). Pacovi su imunizovani HKM+KFA i žrtvovani na piku EAE-a kod DA pacova. RNK je izolovana iz homogenata kičmene moždine, malih krvnih sudova i homogenata srca i RT-Real time PCR je urađen. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost+SD dobijena od 6 pacova po grupi, izuzev kod uzorka srca koje je izolovano iz jednog pacova i rezultat predstavljen kao srednja vrednost+SD više uzoraka homogenizovanogsrca.

5. DISKUSIJA

Ishod autoimunskih reakcija usmerenih prema CNS-u, koje karakterišu EAE i MS, zavisi od sposobnosti encefalitogenih imunskih ćelija da prođu barijere koje postoje između krvi i CNS-a. S obzirom da endotelske ćelije malih krvnih sudova i astrociti predstavljaju glavne gradivne elemente krvno-moždane barijere, ekspresija imunomodulatornih molekula od strane ovih ćelija ima ključnu ulogu u sprečavanju ili omogućavanju prodora autoreaktivnih imunskih ćelija u parenhim CNS-a. Pokazano je da mnogi hemokini i njihovi receptori imaju istaknutu ulogu u ovom procesu, čijom se interakcijom omogućava specifična migracija i prolazak limfocita kroz krvno-moždanu barijeru ili barijeru krv-cerebrospinalna tečnost. Značajan broj radova ističe višestruka antiinflamatorna svojstva hemokina CXCL12 u različitim fazama tokom neuroinflamacije. Ovaj hemokin se može vezati za dendritske ćelije (DC) u limfnim čvorovima, omogućavajući im da inhibitorno deluju na proliferaciju Th ćelija i sekreciju IFN- γ (Santiago et al. 2012). Dalje, blokada receptora CXCR4 dovodi do povećane ekspresije proinflamatornih citokina IL-2, TNF i IFN- γ , a smanjene antiinflamatornog citokina IL-10 u kičmenoj moždini tokom EAE-a (McCandless i sar. 2006). Specifična prostorna ekspresija CXCL12 omogućava njegovo anti-inflamatorno dejstvo. Naime, ukoliko je ovaj hemokin prisutan na abluminalnoj strani krvnih sudova CNS-a, u perivaskularnom prostoru, očekuje se da će ispoljiti antiinflamatorno dejstvo, zadržavanjem mononuklearnih ćelija u njihovom prodoru ka parenhimu CNS-a (McCandless i sar. 2006), indukcijom apoptoze (Colamussi i sar. 2000, Colamussi i sar. 2001, Herbein i sar. 1998) i regulatornog fenotipa ovih ćelija. CXCL12 indukuje promenu proinflamatornog karaktera ćelija koje su najodgovornije za neuroinflamaciju u EAE-u, Th ćelija i makrofaga. Makrofagi povećavaju produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10, a smanjuju produkciju TNF i IL-12, nakon stimulacije sa CXCL12. Slično, u Th ćelijama se povećava produkcija IL-10, a smanjuje produkcija TNF, nakon stimulacije sa CXCL12 (Meiron i sar. 2008). Ipak, početni procesi u neuroinflamaciji remete ekspresiju CXCL12 na abluminalnoj strani krvnih sudova, dozvoljavajući prolazak mononuklearnih ćelija iz perivaskularnog prostora, kroz astroglialnu laminu u parenhim CNS-a (McCandless i sar. 2009). Promene u prostornoj ekspresiji CXCL12 primećene su i u MS. Naime, kod zdravih individua i kod MS pacijenata na mestima koja nisu pogođena inflamacijom, CXCL12 je eksprimiran na

abluminalnoj strani krvnih sudova, dok se kod MS pacijenata sa aktivnim lezijama ekspresija CXCL12 primećuje na luminalnoj strani krvnih sudova, zajedno sa povećanom ekspresijom CXCR4 na infiltrirajućim leukocitima (McCandless i sar. 2008). Produkcija CXCL12 nije poželjna samo u regionu krvno moždane barijere, jer se u slučaju kada dođe do neurodegeneracije i demijelinizacije, CXCL12 ističe kao ključan faktor za privlačenje CXCR4⁺ prekursora oligodendrocita na mesto degeneracije oligodendrocita, nadomešćivanje ovog deficta i remijelinizaciju (Banisadr i sar. 2011, Patel i sar. 2010). Precizniji mehanizam indukcije remijelinizacije ističe aktivaciju TNFR2 na astrocitima, kojom se indukuje ekspresija CXCL12 u ovim ćelijama (Patel i sar. 2012).

Analizom ekspresije iRNK za ukupni CXCL12 tokom različitih faza EAE-a kod DA pacova, kod kojih se javljaju klinički simptomi, utvrdili smo da je ekspresija ovog hemokina značajno smanjena na piku bolesti. Sa druge strane, kod AO pacova, kod kojih se ne primećuju nikakvi simptomi EAE-a, ekspresija iRNK za ukupni CXCL12 povišena je na početku bolesti u odnosu na ekspresiju kod zdravih pacova, a dostiže maksimum kada je EAE na piku kod DA pacova. Ovaj rezultat implicira aktivnu ulogu CXCL12 u otpornosti AO pacova na razvoj EAE-a. Ovakva pretpostavka slaže se sa našim ranijim rezultatima kojima je pokazano da se blokiranjem receptora CXCR4, uz pomoć AMD3100, izaziva teža klinička slika EAE-a u AO pacova, praćena većom infiltracijom imunskih ćelija u parenhim CNS-a i demijelinizacijom (Miljković i sar. 2011, McCandless i sar. 2006). Između zdravih AO i DA pacova nije bilo razlike u ekspresiji iRNK za CXCL12 u CNS-u, što znači da neki od molekula koji posreduju u neuroinflamaciji modulišu ekspresiju ovog hemokina. S obzirom da su DA pacovi pogođeni jakom neuroinflamacijom nakon imunizacije, zanimalo nas je koji bi to proinflamatorni molekul mogao biti odgovoran za smanjenje ekspresije iRNK za CXCL12 na piku EAE-a, uzimajući u obzir da se proinflamatorni citokini IFN- γ , IL-17, IL-1 β i IL-6 najčešće ističu kao stimulatori ekspresije ovog hemokina (Colonge i sar. 2010, Peng i sar. 2006, Kim i sar. 2007, Liu i Dorovina-Zis, 2009). Pored toga što stimuliše ekspresiju CXCL12 u astrocitima (Calderon i sar. 2006, Peng i sar. 2006), proinflamatorni citokin IL-1 β indukuje patološku relokalizaciju njegove ekspresije sa abluminalne na luminalnu stranu endotelskih ćelija krvnih sudova u induktivnoj fazi EAE-a. To je veoma bitan korak u patogenezi EAE-a, jer

su endotelske ćelije MKS, pored astrocita, glavni konstituenti krvno-moždane barijere i značajan izvor CXCL12 u perivaskularnom prostoru (Calderon i sar. 2006, Krumboltz i sar. 2006). Kao što je već rečeno, ovakva prostorna promena ekspresije CXCL12 onemogućava njegovo antiinflamatorno dejstvo, što doprinosi pojavi kliničkih simptoma (McCandless i sar. 2009). Ipak, u endotelskim ćelijama izolovanim iz ljudskog mozga primećeno je da proinflamatorni citokini TNF, IFN- γ i IL-1 β smanjuju ekspresiju CXCL12 (Liu i Dorovina-Zis, 2009). Pored podataka da IL-1 β stimuliše ekspresiju CXCL12 u astrocitima, Peng i sar. ističu da solubilni TNF i IFN- γ ne modifikuju ekspresiju ovog hemokina. Međutim, sam IFN- γ snižava ekspresiju CXCL12 indukovanu uticajem IL-1 β (Peng i sar. 2006). U našim eksperimentima primećeno je da solubilni TNF, sam ili u sadejstvu sa IFN- γ i IL-17, stimuliše ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima (nepublikovano zapažanje). Takođe, pokazano je da se aktivacijom TNFR2 na astrocitima indukuje ekspresija CXCL12 (Patel et al. 2012). Ovaj receptor je prevashodno aktiviran transmembranskom formom TNF, kojoj se pripisuje protektivna uloga u EAE-u i MS (Van Hauwermeiren i sar. 2011, Caminero i sar. 2011), eksprimiranoj na samim astrocitima, ali i na mikrogliji (Patel i sar. 2012). Pored toga, solubini bazni protein mijelina, protein mijelinskog omotača koji se oslobađa tokom demijelinizacije u MS, takođe stimuliše produkciju CXCL12 u astrocitima (Calderon i sar. 2006, Peng i sar. 2006). Takođe, i u našim eksperimentima uočeno je da IFN- γ i IL-17 stimulišu ekspresiju CXCL12 u astrocitima (Blaževski i sar. 2013). Pored toga, primetno je da nakon imunizacije dolazi do infiltracije imunskih ćelija koje sekretuju IFN- γ i IL-17 i u CNS AO pacova, međutim višestruko manje u poređenju sa DA pacovima (Miljković i sar. 2011). Th1 i Th17 ćelije, glavni producenti IFN- γ i IL-17, su prve ćelije koje prolaze kroz krvno-moždanu barijeru, tako da se može pretpostaviti da pod uticajem ovih citokina dolazi do trenutnog povećanja ekspresije CXCL12. Nakon inicijalnog ulaska Th1 i Th17 ćelija u CNS dolazi do privlačenja makrofaga i aktiviranja glijanih ćelija, mikroglije i astrocita.

Jedan od najistaknutijih efektorskih molekula makrofaga i mikroglije, koji doprinosi patologiji EAE-a je NO. S obzirom na to, odlučili smo da ispitamo ekspresiju iRNK za iNOS, enzima čijom se aktivnošću proizvodi NO, tokom EAE-a. Ispostavilo se da kod DA pacova ekspresija iRNK za iNOS raste tokom EAE-a, dostižući maksimum na piku bolesti.

Sa druge strane, kod AO pacova ekspresija iRNK za iNOS ostaje na niskom nivou čitavim tokom EAE-a. Ovaj rezultat je potvrdio očekivanu pozitivnu korelaciju ekspresije iNOS sa pojavom kliničkih simptoma i progresijom EAE-a. Pored toga, povećanje ekspresije iRNK za iNOS prethodi smanjenju ekspresije iRNK za CXCL12 kod DA pacova, što govori da bi produkt aktivnosti iNOS, NO, mogao biti odgovoran za smanjenje ekspresije iRNK za CXCL12. Ova hipoteza bi mogla da objasni i visoku ekspresiju iRNK za CXCL12 na piku EAE-a kod AO pacova. Moguće je da je relativno mali broj infiltrirajućih Th1 i Th17 ćelija dovoljan da svojom aktivnošću povisi ekspresiju ovog hemokina, a da naknadni izostanak produkcije NO omogućava prezervaciju njegove ekspresije. Pozitivna korelacija ekspresije CXCL12 sa slabijim simptomima bolesti i pozitivna korelacija ekspresije iNOS sa jačim simptomima bolesti potvrđena je i poređenjem ekspresije iRNK za ove molekule između DA pacova imunizovanih HKM+KFA i HKM+EG. Naime, kod DA pacova imunizovanih HKM+EG primetili smo snažnije simptome EAE-a, višu ekspresiju iRNK za iNOS, a nižu ekspresiju iRNK za CXCL12 u odnosu na DA pacove imunizovane HKM+KFA. Poznato je od ranije da imunizacija korišćenjem EG izaziva simptome EAE-a kod pacova soja Brown Norway, koji su inače otporni na indukciju EAE-a. Pojava simptoma EAE-a kod ovih pacova uzrokovana je visokom aktivacijom mikroglije i perivaskularnih makrofaga, a poznato je da je NO jedan od najznačajnijih efektorskih molekula ovih ćelija (Staykova i sar. 2008). Sveukupnom analizom naših rezultata utvrđen je odnos negativne korelacije između ekspresije iRNK za iNOS i CXCL12 u kičmenoj moždini tokom EAE-a. Na osnovu ovih rezultata postavili smo hipotezu da bi NO mogao biti odgovoran za sniženu ekspresiju CXCL12 u neuroinflamaciji.

S obzirom da su naši početni eksperimenti ukazivali da povećana aktivnost iNOS, i sledstvena produkcija NO, na početku EAE-a dovodi do smanjenja ekspresije CXCL12 na piku bolesti kod DA pacova, opredelili smo se da blokiramo aktivnost iNOS, primenom AG-a, u efektorskoj fazi bolesti (početak i pik). DA pacovi koji su bili tretirani AG-om pokazali su smanjene simptome EAE-a u poređenju sa pacovima koji su primali PBS. Ovaj rezultat je potvrdio štetnu ulogu visoke produkcije NO u CNS-u tokom neuroinflamacije. Poznato je da hronično visoke koncentracije NO izazivaju brojne neželjene efekte u CNS-u poput, narušavanja integriteta krvno-moždane barijere, citotoksičnosti prema

oligodendrocitima i neuronima, ometanja adekvatnog sprovođenja nervnih impulsa, degeneracije aksona i drugih (Smith i Lassmann, 2002). Inhibiciju aktivnosti iNOS u CNS-u, primenom AG-a, potvrdili smo detekcijom nitro-tirozinskih grupa na proteinima kičmene moždine. Kod pacova tretiranih AG-om bilo je značajno manje nitro-tirozinskih grupa, koje nastaju vezivanjem NO za tirozinske grupe proteina, u poređenju sa pacovima koji su bili tretirani PBS-om. NO ima složenu ulogu u EAE-u, koja zavisi od tkiva u kome se produkuje i faze tokom razvoja EAE. Iz tog razloga se u literaturi mogu pronaći oprečni rezultati blokiranja aktivnosti iNOS u EAE-u. Naime, često su kao eksperimentalni model korišćeni miševi kojima nedostaje gen za iNOS (''knock-out'') (Dalton i Wittmer, 2005, Fenyk-Melody i sar. 1998) ili je aktivnost iNOS bila blokirana od trenutka imunizacije, primenom AG-a, selektivnog inhibitora aktivnosti iNOS (Okuda i sar. 1998, Cowden i sar. 1998). U prvom slučaju ''knock-out'' miševima nedostaje iNOS celog života, tako da mnogi nepredviđeni mehanizmi mogu biti uključeni kako bi se nadomestio nedostatak ovog enzima. U drugom slučaju inicijalnom blokadom aktivnosti iNOS, sprečava se produkcija NO u perifernim limfnim organima, u kojima se inicira autoimunski odgovor usmeren prema CNS-u. U perifernim limfnim organima NO ispoljava regulatornu ulogu. NO ograničava preteranu aktivaciju limfocita i njihovu proliferaciju, inhibiranjem prezentacije antigena od strane APC ovim ćelijama (Dalton i Wittmer, 2005, Sicher i sar. 1994). Stoga, odsustvom NO izostaje regulacija ekspanzije autoreaktivnih limfocita i može se očekivati snažniji autoimunski odgovor. Nije potpuno jasno na koji način NO utiče na infiltrirajuće limfocite u CNS-u, iako neke studije pokazuju da izaziva apoptozu kod ovih ćelija (Okuda i sar. 1997, Zettl i sar. 1997). U relapsno-remitentnom modelu EAE-a, tretman AG-om, počev od pojave prvih kliničkih simptoma bolesti, 10 dana zaredom, doveo je do teže kliničke slike i brže pojave drugog neurološkog ispada, tj. relapsa (Okuda i sar. 1998). Sa druge strane, postoje studije u kojima je AG smanjio simptome EAE-a, kada je primenjivan od istog dana kada su životinje imunizovane (Shin i sar. 2000) ili nakon indukcije EAE-a pasivnim transferom aktiviranih autoreaktivnih T limfocita (Zhao i sar. 1996).

Pored uticaja na kliničku sliku, detektovana je viša ekspresija iRNK za CXCL12 kod pacova tretiranih AG-om u odnosu na pacove tretirane PBS-om u homogenatima kičmene moždine i MKS na piku EAE-a. Pored toga, histološka analiza kičmene moždine

pokazala je znatno višu ekspresiju proteina CXCL12 kod pacova tretiranih AG-om u odnosu na pacove tretirane PBS-om. Ovi rezultati jasno pokazuju da NO inhibira ekspresiju CXCL12. Pored toga, najviša ekspresija CXCL12 primećena je na fibroznim astrocitima u parenhimu kičmene moždine. Visoka ekspresija CXCL12 u parenhimu CNS potvrđuje da ovaj hemokin ne učestvuje samo u sprečavanju prolaska imunskih ćelija kroz krvno-moždanu barijeru, već da ispoljava aktivnu ulogu u parenhimu CNS-a tokom neuroinflamacije.

Još jedan eksperiment kojim smo pokazali inhibitorni uticaj NO na ekspresiju CXCL12 *in vivo* je bio tretman AO pacova SNP-om. Kao što je već spomenuto, AO pacove karakteriše niska ekspresija iNOS i produkcija NO, pri čemu se ovi parametri ne menjaju ni nakon njihove imunizacije. Tretman AO pacova SNP-om od 9. do 12. dana nakon imunizacije smanjio je ekspresiju iRNK za CXCL12 u homogenatima kičmene moždine. U našem eksperimentu smanjenje ekspresije iRNK za CXCL12 nije uslovilo pojavu simptoma EAE-a kod rezistentnih AO pacova. Ono što je uočljivo je da je inhibicija CXCL12 bila delimična i da je ekspresija ovog hemokina i dalje bila značajno viša kod AO pacova koji su tretirani SNP-om nego kod DA pacova na piku bolesti. To bi moglo biti jedno od objašnjenja zašto SNP nije uspeo da indukuje pojavu simptoma EAE-a kod AO pacova.

Ovi rezultati jasno pokazuju da je aktivnost iNOS i sledstvena produkcija NO odgovorna za snižavanje ekspresije CXCL12 u CNS-u tokom neuroinflamacije. Slabiji simptomi EAE-a kod pacova tretiranih AG-om mogu se pripisati sniženoj produkciji NO, koji bi inače uzokovao mnoge direktne efekte koji pojačavaju bolest, kao i povećanoj produkciji CXCL12, koji ima antiinflamatornu ulogu.

Međutim, uprkos efektu AG-a na tok EAE-a, nije bilo razlike u broju imunskih ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu DA pacova tretiranih AG-om i kontrolne grupe. Takođe, tretman AG-om nije doveo do promena u ekspresiji iRNK za IFN- γ , IL-17, TNF, TGF- β i IL-10 u homogenatu kičmene moždine u odnosu na kontrolnu grupu. To ne isključuje mogućnost da je bilo modulacije ekspresije iRNK za neke od pomenutih citokina u imunskim ćelijama koje su infiltrirale kičmenu moždinu, međutim takva analiza nije urađena. Moguće je da je smanjenje produkcije NO i povećanje produkcije CXCL12

uticalo na aktivaciono stanje ovih ćelija i njihov fenotip. S obzirom da je pokazano da CXCL12 indukuje Treg IL-10⁺ fenotip T ćelija (Meiron i sar. 2008), može se pretpostaviti da je povišena ekspresija CXCL12 u CNS-u pacova tretiranih AG-om indukovala antiinflamatorni fenotip imunskih ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu. U studiji u kojoj je ispitivan direktan efekat CXCL12 na neuroinflamaciju tokom EAE-a, blokadom CXCR4, uz pomoć AMD3100, nije bilo razlike u ukupnom broju mononuklearnih ćelija koje su infiltrirale kičmenu moždinu između kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa AMD3100 (McCandless i sar. 2006). Ipak, blokada aktivnosti CXCR4 dovela je do teže kliničke slike EAE-a, razvoja Th1 limfocita i demijelinizacije, a niže produkcije IL-10. Takođe, kod AMD3100 tretiranih životinja bilo je značajno više aktiviranih ćelija mikroglije. Dakle, prema ovim autorima, aktivacija mikroglije mnogo više doprinosi patologiji EAE-a u odnosu na infiltrirajuće imunske ćelije. U jednoj ranijoj studiji, koja je podrazumevala sličnu eksperimentalnu postavku našoj, pokazano je da se primenom AG-a tokom EAE-a povećava ekspresija gena za anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- β u kičmenoj moždini (Brenner i sar. 1997).

Prethodno pomenuti *in vivo* rezultati pokazali su da NO smanjuje ekspresiju CXCL12 u kičmenoj moždini tokom neuroinflamacije. Međutim, da bismo preciznije utvrdili kako glavni konstituenti krvno-moždane barijere, astrociti i MKS ekspimiraju iRNK za CXCL12 pod dejstvom NO pristupili smo *in vitro* eksperimentima. Astroците i MKS smo izložili dejstvu donora NO, SNP-a, u prisustvu inflamatornih medijatora koji čine ConASn, sa ciljem oponašanja inflamatornog okruženja. C6 ćelijsku liniju astrocita izložili smo dejstvu mešavine pro-inflamatornih citokina IFN- γ , IL-17, TNF i IL-1 β , s obzirom da se dejstvom ConASn narušava vijabilitet ovih ćelija. Ovakva eksperimentalna postavka simulira dejstvo endogenog NO, poreklom od makrofaga, mikroglije i astrocita u inflamatornom okruženju. Prisustvo inflamatornih medijatora povicilo je ekspresiju iRNK za CXCL12, dok je prisustvom SNP-a, ekspresija iRNK ovog hemokina bila inhibirana u astrocitima, MKS i C6 ćelijama. Pored toga, želeli smo da vidimo da li NO poreklom iz ćelijskog izvora ima isti uticaj na ekspresiju iRNK za CXCL12 u astrocitima. Iz tog razloga kokultivisali smo astrocite i peritoneumske ćelije (PĆ). PĆ predstavljaju većinski makrofage, najpotentnije producente NO u imunskom sistemu. Njihova sposobnost da

produkuju NO, je potvrđena visokom akumulacijom nitrita u supernatantima kultura u našem eksperimentu. Ekspresija iRNK za CXCL12 bila je smanjena u astrocitima kokultivisanim sa PC u odnosu na astrocite koji su bili kultivisani sami. Naši *in vitro* rezultati su potvrdili da NO direktno utiče na inhibiciju ekspresije CXCL12 u astrocitima i MKS, što je veoma značajno, s obzirom da ove ćelije predstavljaju najpotentniji izvor ovog antiinflamatornog hemokina u neuroinflamaciji (Calderon i sar. 2006, Ambrosini i sar. 2005, Krumboltz i sar. 2006). Ovo predstavlja dodatni način kojim NO može potpomoći neuroinflamaciju svojim aktivnostima u regionu krvno-moždane barijere, s obzirom da je poznato da ovaj molekul može povećati njenu propustljivost vazodilatacijom i uticajem na proteine međucelijskih veza endotelskih ćelija (Smith i Lassmann, 2002, Yang i sar. 2013).

NO je uključen i u post-translacionu modifikaciju proteina, putem nitro-tironizacije i S-nitrozilacije tiolskih grupa, na taj način menjajući nivo njihove aktivnosti (Stamler i sar. 2001). Neke studije ističu mogućnost da proces nitrozilacije proteina funkcioniše na istom principu kao i proces fosforilacije, tj. da je uslovljen balansom u aktivnosti enzima koji dodaju ili oduzimaju NO grupe proteinima (Lai i sar. 2001, Lane i sar. 2001). S obzirom na to, vrlo je moguće da na ove načine NO utiče i na aktivnost proteina koji učestvuju u regulaciji genske ekspresije. Iz tog razloga nas je zanimalo da li neki od signalnih molekula koji mogu biti modifikovani pod dejstvom NO učestvuju u regulaciji ekspresije iRNK za CXCL12 u astrocitima. Naši eksperimenti su pokazali da NO donor, SNP, smanjuje aktivaciju p38 mitogenima aktivirane protein (MAP) kinaze u astrocitima, što koincidira sa inhibicijom ekspresije iRNK za CXCL12. Primenom inhibitora p38 MAP kinaze, SB203580 i SB202190, smanjena je ekspresija iRNK za CXCL12. Pored toga, simultanom primenom pomenutih inhibitora aktivnosti p38 MAP kinaze i SNP-a, ekspresija iRNK za CXCL12 je bila slično inhibirana kao i u slučaju njihove pojedinačne primene. Sve ovo je jasno ukazalo da bi NO mogao da smanjuje ekspresiju CXCL12 u astrocitima inhibicijom p38 signalnog puta MAP kinaze.

Neke studije su već pokazale da supstance koje otpuštaju NO, NOSH-aspirin i dietilamin-NONOat, smanjuju aktivaciju p38 MAP kinaze u astrocitima i mikrogliji (Lee i sar. 2013, Cai i sar. 2011). p38 MAP kinaza spada u grupu kinaza, koje imaju značajnu ulogu u ćelijskom odgovoru na spoljašnje inflamatorne signale, koji rezultuje produkcijom

citokina (Bachstetter i Van Eldik, 2010). U zavisnosti od nishodnih molekula koje aktivira, p38 MAP kinaza može indukovati različit ćelijski odgovor, proinflamatorni ili antiinflamatorni. Aktivacijom kinaze MK2 dolazi do indukcije ekspresije klasičnih proinflamatornih citokina TNF, IL-1 β i IL-6. Sa druge strane, aktivacijom kinaze MSK 1/2 indukuje se ekspresija imunosupresivnih molekula IL-10, IL-1 ra (eng. receptor antagonist) i fosfataze dvojne specifičnosti 1 (eng. dual specificity phosphatase 1, DUSP 1) (Bachstetter i Van Eldik, 2010). Takođe, pokazano je da aktivacija p38 MAP kinaze štiti astrocite od apoptoze indukovane pod dejstvom TNF (Barca et al. 2008). Brojne studije su pokazale da inhibicija p38 MAP kinaze utiče na inhibiciju aktivacije tipičnog proinflamatornog transkripcionog faktora NF-kB (Koistinaho M. i Koistinaho J. 2002, Sasha i sar. 2007, Gorska i sar. 2007). Naši eksperimenti su pokazali da smanjenje aktivacije p38 MAP kinaze nije uticalo na nivo aktivacije NF-kB, tj. nije detektovana razlika u nivou ekspresije fosforilisane i nefosforilisane forme NF-kB. To ne isključuje mogućnost da je aktivacija NF-kB modifikovana nekim drugim mehanizmom, nezavisnim od fosforilacije, kao što je acetilacija (Sasha i sar. 2007).

Poznato je takođe da je aktivnost p38 MAP kinaze bitna za stimulaciju ekspresije iNOS i produkciju NO (Yo i sar. 2008). Može se pretpostaviti da se mehanizmom negativne povratne sprege reguliše odnos aktivacije p38 MAP kinaze i produkcije NO. Drugim rečima, moguće je da aktivacija p38 MAP kinaze stimuliše produkciju NO, koji naknadno utiče na smanjivanje aktivnost p38 MAP kinaze i sledstveno smanjenje produkcije NO. Rezultat da je pojedinačnom primenom inhibitora p38 MAP kinaze, kao i njihovom simultanom primenom sa SNP-om ekspresija iRNK za CXCL12 bila slično inhibirana, sugeriše da je u našim eksperimentima inhibicija signalizacije putem p38 MAP kinaze direktno odgovorna za inhibitorni uticaj NO na ekspresiju CXCL12 u astrocitima. Takođe, postoje podaci koji ističu ključnu ulogu vanćelijskim signalima regulisane kinaze (eng. extracellular signal regulated kinase, ERK) i fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI-3K) u stimulaciji ekspresije CXCL12 u astrocitima pod dejstvom IL-1 β (Calderon i sar. 2006). Ovi rezultati ističu mogućnost povećanja ekspresije antiinflamatornog hemokina CXCL12 stimulacijom aktivnosti pomenutih signalnih molekula.

Pretpostavlja se da različite izoforme CXCL12 imaju različite uloge u biološkim sistemima (Rueda i sar. 2008). Nepostojanje podataka u literaturi o ekspresiji specifične izoforme, CXCL12- γ , u CNS-u tokom neuroinflamacije, bio je razlog da ispitamo ekspresiju iRNK za ovu izoformu CXCL12 u različitim fazama EAE-a. Kinetika ekspresije ove izoforme bila je vrlo slična kod oba soja pacova, s tim što je u svakoj fazi nakon indukcije EAE-a ekspresija iRNK za CXCL12- γ bila značajno viša kod AO pacova. Kod zdravih pacova oba soja nije bilo razlike u ekspresiji iRNK za ovu izoformu. Očigledno je da ekspresija CXCL12- γ pozitivno korelira sa rezistencijom AO pacova na indukciju EAE-a, ali i da je njena ekspresija smanjena na piku bolesti. Upravo u toj fazi EAE-a ekspresija ukupnog CXCL12 je najviša kod AO pacova. Dalje smo uporedili koliki je udeo CXCL12- γ u ekspresiji ukupnog CXCL12. Primetili smo da je udeo ove izoforme značajno viši kod AO pacova na početku i oporavku od bolesti, a upravo u tim fazama je detektovana i njena najviša ekspresija. Ova analiza ukazuje da u ekspresiji ukupnog CXCL12 na piku EAE-a kod AO pacova učestvuju druge izoforme, najverovatnije α i β . Dalje, ovi rezultati ističu mogućnost različitih, i možda komplementarnih uloga pojedinih izoformi hemokina CXCL12 u otpornosti na indukciju EAE-a kod AO pacova. CXCL12- γ poseduje visok afinitet vezivanja za komponente vanćelijskog matriksa, posebno za heparan sulfat (Rueda i sar. 2008). Jedna studija pokazuje da se CXCL12 vezuje za heparan sulfat na DĆ u limfnim čvorovima, pri čemu se CXCL12- γ izoforma vezuje najvećim afinitetom. Ovo vezivanje uslovljava da DĆ koje imaju vezan CXCL12 na svojoj površini smanjuju proliferaciju T ćelija i njihovu sekreciju IFN- γ (Santiago et al. 2012). Može se pretpostaviti da povišen udeo CXCL12- γ na početku bolesti ima ulogu u smanjivanju sposobnosti DĆ, koje infiltriraju CNS tokom neuroinflamacije (Serafini i sar. 2000), kao i rezidentnih APĆ, da re-aktiviraju autoreaktivne T ćelije, koje su nosioci neuroinflamacije.

Interesantan i jedinstven fenomen predstavlja unutarćelijska ekspresiranost alternativno iskrojene izoforme CXCL12- γ . Pored toga, ne samo da se ova varijanta CXCL12- γ ne sekretuje van ćelije, ona se zahvaljujući specifičnoj signalnoj sekvenci na C-terminalnom kraju peptida, transportuje u jedarce. Iz tog razloga ispitali smo da li se u CNS-u tokom neuroinflamacije, ekspresira izoforma CXCL12- γ koja se transportuje u jedarce. U tkivu CNS-a nismo detektovali ovu izoformu, iako smo potvrdili da je ona

prisutna u srcu pacova, kao što je inicijalno opisano (Torres i Ramirez, 2009). Biološki značaj postojanja alternativno iskrojene izoforme CXCL12- γ koja migrira u jedarce nije poznat. Može se pretpostaviti da ova izoforma nema ulogu u modulaciji neuroinflamacije, s obzirom na odsustvo njene eksprimiranosti u tkivu CNS-a koje je pogođeno inflamacijom.

U različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim postavkama pokazali smo da pored toga što NO inhibira ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12, takođe inhibira i ekspresiju iRNK za CXCL12- γ izoformu. Navedeno je da je primenom inhibitora p38 MAP kinaze u našim eksperimentima, smanjena ekspresija iRNK za ukupni CXCL12. Međutim, inhibicija aktivnosti p38 MAP kinaze nije modulirala ekspresiju iRNK za CXCL12- γ izoformu u astrocitima. To znači da je NO smanjio ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima, nezavisno od uticaja na p38 MAP kinazu. Ovi rezultati govore da p38 MAP kinaza nije uključena u inhibiciju ekspresije CXCL12- γ izoforme. Pored toga, imajući u vidu da se primenom inhibitora p38 MAP kinaze smanjuje ekspresija ukupnog CXCL12, nameće se zaključak da je ova kinaza uključena u modulaciju ekspresije neke/ih druge/ih izoformi CXCL12.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj tezi pokazuju da NO inhibira ekspresiju CXCL12 u neuroinflamaciji. Imajući u vidu višestruke štetne efekte preterane produkcije NO tokom inflamacije u CNS-u i, sa druge strane, mnoge efekte CXCL12 koji ograničavaju i smanjuju neuroinflamaciju, inhibitorski efekat NO na ekspresiju CXCL12 predstavlja još jedan škodljiv efekat ovog molekula u patološkim stanjima CNS-a. Iz pomenutih razloga potencijalni terapijski pristupi, kojima bi se uticalo na ograničavanje produkcije NO i sledstveno povećanje ekspresije CXCL12 u CNS-u, mogli bi da dovedu do smanjenja destrukcije tkiva CNS-a kod MS pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije, a na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata došli smo do sledećih zaključaka:

- Ekspresija iRNK za ukupni CXCL12 kod DA pacova blago raste na početku, značajno se smanjuje na piku i opet blago raste u fazi oporavka od EAE-a. Kod AO pacova ekspresija iRNK za ukupni CXCL12 raste u vreme početka, dostiže maksimum na piku i opada u fazi oporavka DA pacova od EAE-a.
- Ekspresija iRNK za iNOS kod DA pacova raste na početku, dostiže maksimum na piku i opada u fazi oporavka od EAE-a. Kod AO pacova ekspresija iRNK za iNOS ostaje na niskom nivou u svim fazama EAE-a kod DA pacova.
- Ekspresija iRNK za CXCL12 pozitivno korelira sa otpornošću na indukciju EAE kod AO pacova, dok ekspresija iRNK za iNOS pozitivno korelira sa pojavom kliničkih simptoma EAE-a kod DA pacova.
- Ekspresija iRNK za CXCL12- γ viša je u svim fazama EAE-a kod AO pacova u poređenju sa DA pacovima, pri čemu je ekspresija ove izoforme najviša u fazi početka i oporavka od EAE-a, dok je snižena na piku EAE-a.
- Ekspresija iRNK za CXCL12- γ u malim krvnim sudovima kičmene moždine izolovanim iz DA i AO pacova, viša je kod AO pacova u vreme pika EAE-a kod DA pacova
- Izoforma CXCL12- γ , koja migrira u jedarce, nije eksprimirana u CNS-u tokom neuroinflamacije.
- *In vivo* inhibicija aktivnosti iNOS kod imunizovanih DA pacova smanjuje kliničke simptome EAE-a i povećava ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine i malim krvnim sudovima, kao i produkciju proteina CXCL12 u kičmenoj moždini. Inhibicija aktivnosti iNOS nije uticala na brojnost imunskih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu tokom EAE-a.

- Tretman AO pacova SNP-om ne dovodi do pojave kliničkih simptoma EAE-a kod AO pacova, ali smanjuje ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 i CXCL12- γ u homogenatima kičmene moždine
- Azot-monoksid inhibira ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12 u malim krvnim sudovima, astrocitima i C6 ćelijama *in vitro*
- Azot-monoksid smanjuje aktivaciju p38 MAP kinaze i ne utiče na aktivaciju NF- κ B u astrocitima *in vitro*
- Inhibicija p38 MAP kinaze smanjuje ekspresiju iRNK za ukupni CXCL12, ali ne utiče na ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima *in vitro*
- IFN- γ i IL-17 stimulišu, dok azot-monoksid smanjuje ekspresiju iRNK za CXCL12- γ u astrocitima *in vitro*

Imajući u vidu dobijene rezultate nedvosmisleno se može zaključiti da azot-monoksid inhibira ekspresiju CXCL12 u neuroinflamaciji. Ovaj efekat bi mogao biti od koristi za koncipiranje potencijalnih terapijskih pristupa u lečenju multiple skleroze. Naime, ograničavanje produkcije NO i sledstveno povećanje ekspresije CXCL12 u CNS-u, mogli bi da dovedu do ograničavanja autoimunskog odgovora prema CNS-u, i na taj način do blagotvornog dejstva kod obolelih.

7.LITERATURA

1. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:41–53.
2. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006 ;203(4):1007-19.
3. Agarwal U, Ghalayini W, Dong F, Weber K, Zou YR, Rabbany SY, Rafii S, Penn MS. Role of cardiac myocyte CXCR4 expression in development and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;107(5):667-76.
4. Aharoni R. New findings and old controversies in the research of multiple sclerosis and its model experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9(5):423-40.
5. Albina JE, Abate JA, Henry WL Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol*. 1991; 147(1):144-8.
6. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593–615.
7. Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM. Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(8):706-15.
8. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:3203–3207

9. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007;61(6):504-13.
10. Axtell RC, Raman C, Steinman L. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(2):114-20.
11. Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R. and Rajewsky, K. Clonal expansion 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; 192, 393–404.
12. Bachstetter AD, Van Eldik LJ. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. *Aging Dis*. 2010;1(3):199-211.
13. Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Bachelier, F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 2005; 280, 35760–35766.
14. Banisadr G, Frederick TJ, Freitag C, Ren D, Jung H, Miller SD, Miller RJ. The role of CXCR4 signaling in the migration of transplanted oligodendrocyte progenitors into the cerebral white matter. *Neurobiol Dis*. 2011;44(1):19-27.
15. Banisadr G, Skrzydelski D, Kitabgi P, Rostène W, Parsadaniantz SM. Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur J Neurosci*. 2003;18(6):1593-606.
16. Barca O, Costoya JA, Señarís RM, Arce VM. Interferon-beta protects astrocytes against tumour necrosis factor-induced apoptosis via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res*. 2008;314(11-12):2231-7.
17. Barnett MH, Henderson AP, and Prineas JW. The macrophage in MS: just a scavenger after all? *Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. Mult Scler* 2006. 12: 121–132,

18. Barnett MH, Sutton I. Neuromyelitis optica; not a multiple sclerosis variant. *Curr Opin Neurol*.2012;25(3):215-20.
19. Baxter AG The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(11):904-12.
20. Becher B, Bechmann I, Greter M Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med (Berl)*. 2006 ;84(7):532-43.
21. Benveniste EN. Role of macrophages/ microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75(3):165-73.
22. Berghmans N, Heremans H, Li S, Martens E, Matthys P, Sorokin L, Van Damme J, Opdenakker G. Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *J Neuroinflammation*. 2012;9:243.
23. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. 2001;4(7):702-10.
24. Bjartmar, C., Kidd, G., Mork, S., Rudick, R. and Trapp, B.D. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol*. 2000; 48, 893–901.
25. Blaževski J, Petković F, Momčilović M, Jevtic B, Miljković D, Mostarica Stojković M. High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology*. 2013;218(9):1192-9.
26. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996b;184:1101–9.
27. Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., Raz, E., Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 2008; 132, 463–473.

28. 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;158(6):2940-6.
29. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia.* 2013;61(4):453-65.
30. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996a;382:829–33.
31. Cai Y, Cho GS, Ju C, Wang SL, Ryu JH, Shin CY, Kim HS, Nam KW, Jalin AM, Sun W, Choi IY, Kim WK. Activated microglia are less vulnerable to hemin toxicity due to nitric oxide-dependent inhibition of JNK and p38 MAPK activation. *J Immunol.* 2011 ;187(3):1314-21.
32. Calderon TM, Eugenin EA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, Berman JW. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *J Neuroimmunol.* 2006;177(1-2):27-39.
33. Calonge E, Alonso-Lobo JM, Escando'n C, Gonzalez N, Bermejo M, Santiago B et al. c/EBPbeta is a major regulatory element driving transcriptional activation of the CXCL12 promoter. *J Mol Biol* 2010; 396: 463–472.
34. Camara M, Beyersdorf N, Fischer HJ, Herold MJ, Ip CW, van den Brandt J, Toyka KV, Taurog JD, Hünig T, Herrmann T, Reichardt HM, Weishaupt A, Kerkau T. CD8(+) T cell help is required for efficient induction of EAE in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 2013;260(1-2):17-27.
35. Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol.* 2011;234(1-2):1-6.
36. Cañellas AR, Gols AR, Izquierdo JR, Subirana MT, and Gairin XM. Idiopathic inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroradiology* 2007; 49: 393–409

37. Chastain EM, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012;245(1):227-38.
38. Colamussi ML, Secchiero P, Gonelli A, Marchisio M, Zauli G, Capitani S. Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4+ T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway. *J Leukoc Biol.* 2001;69(2):263-70.
39. Colamussi ML, Secchiero P, Zella D, Curreli S, Mirandola P, Capitani S, Zauli G. Stromal derived factor-1-alpha induces apoptosis in activated primary CD4+ T cells. *AIDS.* 2000 ;14(6):748-50.
40. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(20):1430-8.
41. Cowden WB, Cullen FA, Staykova MA, Willenborg DO. Nitric oxide is a potential downregulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE. *J Neuroimmunol.* 1998; 88(1-2):1-8.
42. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, Russell JH, Klein RS. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med.* 2011;208(2):327-39.
43. Cross AH, Manning PT, Stern MK, Misko TP. Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. *J Neuroimmunol* 1997; 80:121–130.
44. Dalton DK, Wittmer S. Nitric-oxide-dependent and independent mechanisms of protection from CNS inflammation during Th1-mediated autoimmunity: evidence from EAE in iNOS KO mice. *J Neuroimmunol.* 2005;160(1-2):110-21.
45. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood.* 2004;103:2452–2459.

46. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, Mudgett JS. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol.* 1998;160(6):2940-6.
47. Fleming JO, Isaak A, Lee JE, Luzzio CC, Carrithers MD, Cook TD, Field AS, Boland J, Fabry Z. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Mult Scler.* 2011;17(6):743-54.
48. Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H. and Wekerle, H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001; 14, 547–560.
49. Ge S, Pachter JS. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord *J Neuroimmunol.* 2006;177(1-2):209-14.
50. Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis.* 2008;46(5):235-45.
51. Gold, R., Linington, C. and Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129,1953–1971.
52. Gorska MM, Liang Q, Stafford SJ, Goplen N, Dharajiya N, Guo L, Sur S, Gaestel M, Alam R. MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation. *J Exp Med.* 2007;204(7):1637-52.
53. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012 ;248(1):87-103.
54. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, Poschmann G, Kaur G, Lambert L, Leach OA, Prömel S, Punwani D, Felce JH, Davis SJ, Gold R, Nielsen FC, Siegel RM, Mann M, Bell JI, McVean G, Fugger L. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature.* 2012;488(7412):508-11.

55. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007;39:1083–91.
56. Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC. Autocrine inhibition of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 2083–88.
57. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357:851–62.
58. 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;134(Pt 7):1914-24.
59. Handunnetthi L, Ramagopalan SV, and Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology* 2010;74: 1905–1910.
60. Hawker K. Progressive multiple sclerosis: characteristics and management. *Neurol Clin* 2011; 29: 423–434.
61. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, and Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 2009; 66: 739–753.
62. Herbein, G., Mahlkecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W. A., Verdin, E. Apoptosis of CD8⁺ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 1998; 395, 189–194.

63. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:84–96.
64. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):220-30.
65. Jack, C., Ruffini, F., Bar Or, A. and Antel, J.P. Microglia and multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 2005;81, 363–373.
66. Jensen CJ, Stankovich J, Van der Walt A, Bahlo M, Taylor BV, van der Mei IA, Foote SJ, Kilpatrick TJ, Johnson LJ, Wilkins E, Field J, Danoy P, Brown MA, Rubio JP, Butzkueven H. Multiple sclerosis susceptibility-associated SNPs do not influence disease severity measures in a cohort of Australian MS patients. *PLoS One*. 2010;5:e10003.
67. Jianjun Yang, Zhang R, Lu G, Shen Y, Peng L, Zhu C, Cui M, Wang W, Arnaboldi P, Tang M, Gupta M, Qi CF, Jayaraman P, Zhu H, Jiang B, Chen SH, He JC, Ting AT, Zhou MM, Kuchroo VK, Morse HC 3rd, Ozato K, Sikora AG, Xiong H. T cell–derived inducible nitric oxide synthase switches off T(H)17 cell differentiation. *J Exp Med*. 2013 ;210(7):1447-62.
68. Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem*. 2009;16(19):2373-94.
69. Kawakami, N., Lassmann, S., Li, Z., Odoardi, F., Ritter, T., Ziemssen, T., Klinkert, W.E., Ellwart, J.W., Bradl, M., Krivacic, K., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., Volk, H.D., Wekerle, H., Linington, C., Flugel, A. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2004; 199, 185–197.
70. Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ et al. Up-regulation of stromal cell derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1076–1086.

71. Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*. 2002;40(2):175-83.
72. Krishnamoorthy G. and Wekerle H. Autoimmune disease: Multiple sclerosis EAE: An immunologist's magic eye *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 1991–2058
73. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(12):907-16
74. Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A.V., Segal, B.M. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.* 2008; 205,1535–1541.
75. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(11):613-23.
76. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain.* 2006;129(Pt 1):200-11.
77. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651–55.
78. Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey KA, Barnes S. Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* 1994; 13: 315–24.
79. Lai, T.S., Hausladen, A., Slaughter, T.F., Eu, J.P., Stamler, J.S., and Greenberg, C.S. Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase. *Biochemistry* 2001; 40, 4904–4910.
80. Lane, P., Hao, G., and Gross, S.S. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Science's STKE* 2001; 1–9.26.
81. Lassmann, H. Multiple sclerosis pathology: Evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol.* 2005; 15, 217–222.
82. Lassmann H. New concepts on progressive multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7(3):239-44.

83. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001;7(3):115-21.
84. Lassmann Hans and van Horssen Jack. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis *FEBS Letters* 585 2011; 3715–3723
85. Lee M, McGeer E, Kodela R, Kashfi K, McGeer PL. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide and hydrogen sulfide releasing hybrid, attenuates neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation: A new candidate for treatment of neurodegenerative disorders. *Glia.* 2013;61(10):1724-34.
86. Lehmann Paul V. The Fate of T Cells in the Brain *Am J Pathol.* 1998;153(3):677-80
87. Li C, Xiao L, Liu X, Yang W, Shen W, Hu C, Yang G, He C. A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *Glia.* 2013;61(5):732-49.
88. Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol.* 2008;84(2):116-31.
89. Lipfert J, Ödemis V, Wagner DC, Boltze J, Engele J. CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013;39(6):667-80.
90. Liu KK, Dorovini-Zis K. Regulation of CXCL12 and CXCR4 expression by human brain endothelial cells and their role in CD4⁺ and CD8⁺ T cell adhesion and transendothelial migration. *J Neuroimmunol* 2009; 215: 49–64.
91. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75
92. Lu M, Grove EA, Miller RJ. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (10) :7090-5.
93. Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem.* 1998;379(2):193-200

94. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980;85(3):890-902.
95. McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(4):1006-11.
96. Medana I, Martinic MA, Wekerle H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol.* 2001;159(3):809-15.
97. Mehta B, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B. Vitamin D and multiple sclerosis: can vitamin D prevent disease progression? *Expert Rev Neurother.* 2011;11(4):469-71.
98. Meiron, M., Zohar, Y., Anunu, R., Wildbaum, G., Karin, N. CXCL12 (SDF-1 α) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2008;205, 2643–2655.
99. Metelitsa LS, Wu HW, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, Groshen S, Wilson SB, Seeger RC. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004;199:1213–21.
100. McCandless EE, Budde M, Lees JR, Dorsey D, Lyng E, Klein RS. IL-1R signaling within the central nervous system regulates CXCL12 expression at the blood-brain barrier and disease severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009 ;183(1):613-20.
101. McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS. Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172(3):799-808.
102. McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein R. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;177(11):8053-64.
103. Mkhikian H, Grigorian A, Li CF, Chen HL, Newton B, Zhou RW, Beeton C, Torossian S, Tatarian GG, Lee SU, Lau K, Walker E, Siminovitch KA, Chandy KG, Yu Z, Dennis JW, and Demetriou M. Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis. *Nat Commun* 2011; 2: 334, 2011.

104. Miller NM, Shriver LP, Bodiga VL, Ray A, Basu S, Ahuja R, Jana A, Pahan K, Dittel BN. Lymphocytes with cytotoxic activity induce rapid microtubule axonal destabilization independently and before signs of neuronal death. *ASN Neuro*. 2013;5(1):e00105.
105. Miljković D, Momčilović M, Stanojević Z, Rašić D, Mostarica-Stojković M. It is still not for the old iron: adjuvant effects of carbonyl iron in experimental autoimmune encephalomyelitis induction. *J Neurochem*. 2011;118(2):205-14
106. Miljković D, Stanojević Z, Momčilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology*. 2011;216(9):979-87.
107. Miljković D, Spasojević I. Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(18):2286-334.
108. Miljković D, Timotijević G, Mostarica Stojković M. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3781-8.
109. Momčilović M, Mostarica-Stojković M, Miljković D. CXCL12 in control of neuroinflammation. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):53-63.
110. Mondal S, Brahmachari S, Pahan K. Regulation of encephalitogenicity of neuroantigen-primed T cells by nitric oxide: Implications for multiple sclerosis. *J Clin Cell Immunol*. 2012;3(3):124.
111. Moncada, S.; Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl. J. Med.*, 1993; 329(27), 2002-12.
112. Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A., Mills, K.H. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav. Immun*. 2010; 24, 641–651.
113. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1–13.

114. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–8.
115. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–5.
116. Odemis V, Lamp E, Pezeshki G, Moepps B, Schilling K, Gierschik P, Littman DR, Engele J. Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Mol Cell Neurosci* 2005;30:494–505.
117. Odemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, Mentlein R, Engele J. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*. 2012;60(3):372-81.
118. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1997; 73: 107–16.
119. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase. *J Neuroimmunol*. 1998;81(1-2):201-10.
120. Owens GP, Bennett JL. Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein- Barr virus and multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(9):1204-8.
121. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153(3):1251-6.

122. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524–526.
123. Patel JR, McCandless EE, Dorsey D, Klein RS. CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(24):11062-7.
124. Patel JR, Williams JL, Muccigrosso MM, Liu L, Sun T, Rubin JB, Klein RS. Astrocyte TNFR2 is required for CXCL12-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS. *Acta Neuropathol*. 2012; 124(6):847-60.
125. Peng H, Erdmann N, Whitney N, Dou H, Gorantla S, Gendelman HE et al. HIV-1-infected and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF-1 production through IL-1beta. *Glia* 2006; 54: 619–629.
126. Petermann F and Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett* 2011; 585: 3747–3757.
127. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009;10(5):514-23.
128. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:102–11.
129. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Nitric oxide blocks fast, slow and persistent sodium currents in C-type DRG neurons by a cGMP independent mechanism. *J Neurophysiol* 2002; 87: 761–75.
130. Robinson MA, Kindt TJ. Linkage between T cell receptor genes and susceptibility to multiple sclerosis: a complex issue. *Reg Immunol*. 1992;4:274–83.

131. Rostasy K, Egles C, Chauhan A, Kneissl M, Bahrani P, Yiannoutsos C, Hunter DD, Nath A, Hedreen JC, Navia BA. SDF-1 α is expressed in astrocytes and neurons in the AIDS dementia complex: an in vivo and in vitro study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:617–26.
132. Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Staropoli I, Chow K, Levoye A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, Izquierdo E, Pablos JL, Lendinez E, Caruz A, Franco D, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*. 2008;3(7):e2543.
133. Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med*. 2013;19(1):12-22.
134. Santiago B, Izquierdo E, Rueda P, Del Rey MJ, Criado G, Usategui A, Arenzana-Seisdedos F, Pablos JL. CXCL12 γ isoform is expressed on endothelial and dendritic cells in rheumatoid arthritis synovium and regulates T cell activation. *Arthritis Rheum*. 2012 ; 64(2):409-17.
135. Sapede D, Rossel M, Dambly-Chaudiere C, Ghysen A. Role of SDF1 chemokine in the development of lateral line efferent and facial motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1714–8.
136. Saha RN, Jana M, Pahan K. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF- κ B in primary human astrocytes via acetylation of p65. *J Immunol*. 2007; 179(10):7101-9.
137. Segret A, Rucker-Martin C, Pavoine C, Flavigny J, Deroubaix E, et al. Structural localization and expression of CXCL12 and CXCR4 in rat heart and isolated cardiac myocytes. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:141–150.
138. Semple BD, Frugier T, Morganti-Kossmann MC. CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2010;7:67.
139. Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2000;157(6):1991-2002.

140. Shin T, Ahn M, Matsumoto Y. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Cell Biol*. 2012;45(3):141-8.
141. Shin T, Kim S, Moon C, Wie M, Kim H. Aminoguanidine-induced amelioration of autoimmune encephalomyelitis is mediated by reduced expression of inducible nitric oxide synthase in the spinal cord. *Immunol Invest*. 2000;29(3):233-41.
142. Sicher SC, Vazquez MA, Lu CY. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J Immunol* 1994; 153: 1293–300.
143. Sloane E, Ledebor A, Seibert W, Coats B, van Strien M, Maier SF, Johnson KW, Chavez R, Watkins LR, Leinwand L, Milligan ED, Van Dam AM. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental multiple sclerosis : MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine therapy. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):92-100.
144. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002;1(4):232-41.
145. Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hünig T, Becher B, Goebels N. Collateral bystander damage by myelin directed CD8+ T cells causes axonal loss. *Am J Pathol*. 2009;175(3):1160-6.
146. Souza-Moreira L, Morell M, Delgado-Maroto V, Pedreño M, Martinez-Escudero L, Caro M, O'Valle F, Luque R, Gallo M, de Lecea L, Castaño JP, Gonzalez-Rey E. Paradoxical Effect of Cortistatin Treatment and Its Deficiency on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2013;191(5):2144-54
147. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258(5090):1898-902.
148. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001;106(6):675-83.
149. Staykova MA, Liñares D, Fordham SA, Paridaen JT, Willenborg DO. The innate immune response to adjuvants dictates the adaptive immune response to autoantigens. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(6):543-54.

150. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*. 2010;16(4):435-52.
151. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, and Geurts JJ. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci* 2012;13: 507–514.
152. Tabatabai G, Frank B, Mohle R, Weller M, Wick W. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* 2006;29:2426–35
153. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591–4.
154. Tanaka M, Tanaka K, Komori M. Interferon-beta(1b) treatment in neuromyelitis optica. *Eur Neurol*. 2009;62(3):167-70.
155. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993;261:600–3.
156. Tham TN, Lazarini F, Franceschini IA, Lachapelle F, Amara A, Dubois-Dalcq M. Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci*. 2001;13(5):845-56.
157. Tissir F, Wang CE, Goffinet AM. Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004;149(1):63-71.
158. Torres Raul and Ramirez Juan C. A Chemokine Targets the Nucleus: Cxcl12-Gamma Isoform Localizes to the Nucleolus in Adult Mouse Heart *PLoS One*. 2009; 4(10): e7570.
159. Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1 *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5-6):311-9.

160. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;375(6530):408-11.
161. Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol*. 1987;132:43-57.
162. Willenborg DO, Staykova MA, Cowden WB. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. *J Neuroimmunol*. 1999;100(1-2):21-35.
163. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:3195-9.
164. Yang S, Chen Y, Deng X, Jiang W, Li B, Fu Z, Du M, Ding R. Hemoglobin-Induced Nitric Oxide Synthase Overexpression and Nitric Oxide Production Contribute to Blood-Brain Barrier Disruption in the Rat. *J Mol Neurosci*. 2013;51(2):352-63
165. Yoo BK, Choi JW, Shin CY, Jeon SJ, Park SJ, Cheong JH, Han SY, Ryu JR, Song MR, Ko KH Activation of p38 MAPK induced peroxynitrite generation in LPS plus IFN-gamma-stimulated rat primary astrocytes via activation of iNOS and NADPH oxidase. *Neurochem Int*. 2008;52(6):1188-97.
166. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*. 2006; 7; 374:174-9.
167. Zettl UK, Mix E, Zielasek J, Stangel M, Hartung HP, Gold R. Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro. *Cell Immunol* 1997; 178: 1-8.
168. Zhang, Y. and Barres, B.A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2010;20, 588-594.

169. Zhao W, Tilton RG, Corbett JA, McDaniel ML, Misko TP, Williamson JR, Cross AH, Hickey WF. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol.* 1996; 64 (2): 123-33.
170. Zhu Y, Yu T, Zhang XC, Nagasawa T, Wu JY, Rao Y. Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* 2002;5:719–20.
171. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121–7.
172. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998;393(6685):595-9.

Biografija

Filip (Tomislav) Petković rođen je 25. maja 1984. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2003/2004. godine na studijskoj grupi Biologija i isti završio februara 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,97. Diplomski rad pod naslovom "Uticaj rapamicina i rapa-NO na ekspresiju gena i produkciju IL-17 i IFN- γ u ćelijama slezine i limfnog čvora pacova u *in vitro* uslovima", pod mentorstvom dr Đorđa Miljkovića, završilo je sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisao 2010/2011. godine, i položio sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9.54.

Filip se 2011. godine zaposlio kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom "Ćelijski i molekularni mehanizmi oporavka pacova od eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa ON173035) pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića. Zvanje istraživač saradnik stiže januara 2012. godine. Filip je do sada učestvovao kao autor/koautor na 6 radova u međunarodnim časopisima, ima četiri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i deset saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Kao dobitnik stipendije koju dodeljuju Evropska federacija imunoloških društava i časopis Immunology letters, 2013. godine proveo je tri meseca na usavršavanju na Institute for Neuroscience, Medical Histology Unit, Autonomous University of Barcelona, Španija.

Filip je aktivni član Društva imunologije Srbije, Društva za Neuronauku Srbije i Biohemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Filip Petković

број уписа B 3023 / 2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Uloga azot-monoksida u regulaciji ekspresije CXCL12 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu u pacova

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.02.2014.

Filip Petković

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Filip Petković

Број уписа: В 3023 / 2010

Студијски програм: Biologija-Imunobiologija

Наслов рада: Uloga azot-monoksida u regulaciji ekspresije CXCL12 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu u pacova

Ментор: dr Đorđe Miljković

Потписани: Filip Petković

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.02.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Uloga azot-monoksida u regulaciji ekspresije CXCL12 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu u rasova

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.02.2014.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.