

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivana M. Lalić

**UTICAJ SISTEMSKE ADMINISTRACIJE  
LIPOPOLISAHARIDA NA STRUKTURNE,  
CELULARNE I MOLEKULARNE  
KARAKTERISTIKE SLEZINE MIŠA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Ivana M. Lalić

**THE IMPACT OF SYSTEMIC  
ADMINISTRATION OF  
LIPOPOLYSACCHARIDE ON  
STRUCTURAL, CELLULAR AND  
MOLECULAR CHARACTERISTICS OF  
THE MOUSE SPLEEN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**Mentor:** prof. dr Novica Milićević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

1. Akademik Vladimir Bumbaširević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. Prof. dr Dušan Popadić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Akademik prof. dr Miodrag Čolić, SANU

**Datum odbrane:**

## **Zahvalnica**

*Na prvom mestu, želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Novici Milićeviću, kao i prof. dr Živani Milićević, na nesebičnoj podršci, savetima i stručnoj pomoći tokom svih faza eksperimentalnog rada i izrade ove doktorske disertacije.*

*Takođe se zahvaljujem akademiku Vladimiru Bumbašireviću, akademiku Miodragu Čoliću i prof. dr Dušanu Popadiću na dragocenim savetima i sugestijama.*

*Zahvaljujem se kolegama u Estoniji i Nemačkoj, koje su dale veliki doprinos u realizaciji ove doktorske disertacije. Dragocenu pomoć u izvođenju ovog istraživanja dali su prof. dr Pärt Peterson, dr Martti Laan i Rudolf Bichele sa Univerziteta u Tartu-u (Estonija), kao i prof. dr Jürgen Westermann sa Univerziteta u Libeku (Nemačka). Veliko hvala Lidiji Gutjahr sa Univerziteta u Libeku na izuzetnoj tehničkoj podršci.*

*Zahvalnost dugujem i doc. dr Saši Petričeviću, dr Slavici Ristić, dr Ivani Mirkov, dr Anji Repar, dr Sanji Despotović, Branki Veselinović i Božidaru Laloviću na velikoj pomoći tokom eksperimentalne faze istraživanja.*

*Zahvaljujem se Jovanki Ognjanović na dragocenoj pomoći u procesu pripreme preparata za histološku analizu. Veliku zahvalnost dugujem i Cici Rajek na izuzetnoj tehničkoj podršci.*

*Veliko hvala svim članovima Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na prijateljskoj podršci i pomoći.*

*Zahvaljujem se i svom prvom mentoru, Danici Tusić, na prenesenoj ljubavi prema biologiji i podsticaju i inspiraciji za daljim bavljenjem naukom.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na ljubavi, razumevanju i nesebičnoj podršci.*

*Ivana Lalić*

**UTICAJ SISTEMSKE ADMINISTRACIJE LIPOPOLISAHARIDA NA  
STRUKTURNE, CELULARNE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE  
SLEZINE MIŠA**

**REZIME**

**Uvod:** Lipopolisaharid (LPS) je glavna komponenta spoljašnje membrane Gram negativnih bakterija. Prepoznavanje LPS-a inicira intracelularne signalne puteve koji dovode do transkripcije gena i oslobađanja proinflamatornih medijatora. Dobro je poznato da ključnu ulogu u imunskom odgovoru na LPS ima receptor TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor-1*), kao i da *TNFR1<sup>-/-</sup>* (*tumor necrosis factor receptor-1 knockout*) miševi pokazuju rezistenciju na endotoksični šok čak i nakon tretmana letalnim dozama LPS-a. Dosadašnja istraživanja su pokazala da LPS izaziva migraciju nekoliko ćelijskih tipova unutar slezine. Međutim, nema podataka o uticaju LPS-a na populaciju B i T limfocita koji se nalaze u crvenoj pulpi slezine miša. Nedavna studija istakla je značaj hemokina CCL20 u brzom akumulaciji B limfocita u slezini miša nakon sistemske administracije Nod1 agoniste, koji izaziva sistemsku inflamaciju *in vivo*.

**Cilj:** Ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša, kao i na strukturnu organizaciju bele pulpe slezine, 24 h nakon tretmana. Osim toga, cilj ove studije bio je da ispita uticaj sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokine i proinflamatorne citokine u slezini miša 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana. Dodatni cilj bio je da se ispita potencijalne promene u ekspresiji hemokina CCL20 u slezini miša 2 h nakon sistemske administracije LPS-a, kao i da se odredi lokalizacija ćelija koje bi u ovim uslovima proizvodile CCL20.

**Materijal i metode:** Eksperimenti su izvođeni na *wild-type* miševima soja C57BL/6 i *TNFR1<sup>-/-</sup>* miševima istog soja. Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine, kao i na strukturnu organizaciju bele pulpe slezine, formirane su četiri grupe životinja: netretirani *wild-type* miševi (n=5), tretirani *wild-type* miševi (n=5), netretirani *TNFR1<sup>-/-</sup>* miševi (n=5) i tretirani *TNFR1<sup>-/-</sup>* miševi (n=5). Tretman životinja podrazumevao je ubrizgavanje u repnu venu LPS-a *E. coli* (soj 055:B5) rastvorenog u fosfatnom puferu, u dozi 2,5 µg/g telesne mase. Miševi su

žrtvovani 24 h nakon tretmana. Na kriostatskim isečcima slezine primenjene su imunohistohemijske metode (bojenje na B220, TCR $\beta$  i F4/80) i morfometrijska analiza. Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokine i proinflamatorne citokine u slezini, formirane su četiri grupe životinja: netretirani miševi (n=9), tretirani miševi žrtvovani 1 h nakon intravenske injekcije LPS-a (n=6), tretirani miševi žrtvovani 2 h nakon intravenske injekcije LPS-a (n=9) i tretirani miševi žrtvovani 24 h nakon intravenske injekcije LPS-a (n=6). Kvantitativnom *real-time* PCR (qRT-PCR) analizom, u tkivu slezine ispitivana je relativna ekspresija gena 18 citokina/hemokina, 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana LPS-om. Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine, kao i na lokalizaciju CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša, korišćene su slezine 3 netretirana miša i 3 tretirana miša žrtvovana 2 h nakon intravenske administracije LPS-a. Uzorci tkiva slezine isecani su laserskom mikrodisekcijom na tkivne odeljke u kojima je vršena qRT-PCR analiza. Lokalizacija CCL20-produkujućih ćelija u slezini ispitivana je primenom imunofluorescentnih metoda.

**Rezultati:** Dvadeset četiri časa nakon sistemske administracije LPS-a uočeno je značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa. Dodatno, 24 h nakon tretmana LPS-om, uočeno je značajno povećanje procentualne zastupljenosti B ćelijske zone i bele pulpe, kao i smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone u slezini *wild-type* i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa. Rano nakon sistemske administracije LPS-a, qRT-PCR-a analiza je pokazala značajno povećanje relativne ekspresije gena 11 hemokina i proinflamatornih citokina (*Xcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Ccl22*, *Tnf* i *Lta*) u slezini miša. Primenom laserske mikrodisekcije i sledstvenog qRT-PCR-a, detektovano je povećanje nivoa iRNK za CCL20 u beloju pulpi slezine miša 2 h nakon tretmana LPS-om. Imunofluorescentnom analizom slezine miša 2 h nakon tretmana LPS-om, utvrđeno je da su CCL20-produkujuće ćelije smeštene u PALS-u, dok je izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno raspoređen u B ćelijskoj zoni.

**Zaključak:** Intravenski ubrizgan LPS izaziva masivnu preraspodelu B i T limfocita iz crvene pulpe slezine miša, praćenu povećanom procentualnom zastupljenošću bele

pulpe, koja se povećava zahvaljujući uvećanju B ćelijske zone. Opisane promene nezavisne su od TNFR1 signalnog puta. Rano nakon sistemske administracije, LPS indukuje povećanje ekspresije iRNK brojnih hemokina i proinflamatornih citokina, za koje je poznato da regulišu aktivnost i kretanje B i T limfocita. Kao što je pokazano metodom laserske mikrodisekcije i sledstvenog qRT-PCR-a, LPS indukuje produkciju CCL20 u beloj pulpi slezine miša. U slezini miševa tretiranih LPS-om, CCL20-produkujuće ćelije su smeštene u PALS-u, dok je izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno raspoređen u B ćelijskoj zoni.

**Ključne reči:** limfocit, crvena pulpa, hemokin, lipopolisaharid, slezina, miš

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Histologija i embriologija

# THE IMPACT OF SYSTEMIC ADMINISTRATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE ON STRUCTURAL, CELLULAR AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF THE MOUSE SPLEEN

## ABSTRACT

**Introduction:** Lipopolysaccharide (LPS) is a major component of the outer membrane of Gram negative bacteria. Recognition of LPS initiates intracellular signaling pathways which lead to gene transcription and release of proinflammatory mediators. It is well known that the key role in the immune response to LPS has the receptor TNFR1 (tumor necrosis factor receptor-1) and that *TNFR1*<sup>-/-</sup> (tumor necrosis factor receptor-1 knockout) mice show resistance to endotoxic shock even after treatment with lethal doses of LPS. Previous research has shown that LPS causes migration of several cell types within the spleen. However, there is no data on the effect of LPS on the population of B and T lymphocytes found in the red pulp of the mouse spleen. A recent study highlighted the importance of chemokine CCL20 in the rapid accumulation of B lymphocytes in the mouse spleen after systemic administration of Nod1 agonist, which induces systemic inflammation *in vivo*.

**Aim:** Examination of the effects of systemic administration of LPS on the number of B and T lymphocytes in the red pulp of the mouse spleen, as well as on the structural organization of the white pulp of the spleen, 24 hours after treatment. In addition, the aim of this study was to examine the effect of systemic administration of LPS on the expression of genes for chemokines and proinflammatory cytokines in the mouse spleen 1 h, 2 h, and 24 h after treatment. An additional goal was to investigate the potential changes in the expression of chemokine CCL20 in the mouse spleen 2 h after systemic administration of LPS, and to determine the localization of cells that might produce CCL20 in these conditions.

**Material and methods:** The experiments were performed on C57BL/6 wild-type and *TNFR1*<sup>-/-</sup> mice. In order to examine the effects of systemic administration of LPS on the number of B and T lymphocytes in the red pulp of the spleen, as well as on the structural organization of the splenic white pulp, four groups of animals were formed:



untreated wild-type mice (n = 5), treated wild-type mice (n = 5), untreated TNFR1<sup>-/-</sup> mice (n = 5) and treated TNFR1<sup>-/-</sup> mice (n = 5). Treatment of animals implied injection into the tail vein of LPS *E. coli* (strain 055: B5) dissolved in phosphate buffer saline, at a dose of 2.5 µg/g of body weight. Mice were sacrificed 24 hours after the treatment. On the splenic cryostat sections immunohistochemical methods (staining for B220, TCRβ and F4/80) and morphometric analysis were applied. To investigate the effects of systemic LPS administration on gene expression of chemokines and proinflammatory cytokines in the spleen, four groups of animals were formed: untreated mice (n = 9), treated mice sacrificed 1 h after intravenous injection of LPS (n = 6), treated mice sacrificed 2 h after intravenous injection of LPS (n = 9) and treated mice sacrificed 24 h after intravenous injection of LPS (n = 6). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis was used to examine the relative gene expression of 18 cytokines/chemokines in the splenic tissue, 1 h, 2 h, and 24 h after LPS treatment. To investigate the effects of systemic administration of LPS on the gene expression for chemokine CCL20 in different compartments of splenic tissue, as well as the localization of CCL20-producing cells in the mouse spleen, spleens of 3 untreated mice and 3 treated mice sacrificed 2 h after intravenous injection of LPS were used. Samples of splenic tissue were cut by laser microdissection on tissue compartments in which qRT-PCR analysis was performed. The localization of CCL20-producing cells in the spleen was examined using immunofluorescence methods.

**Results:** Twenty-four hours after systemic administration of LPS, a significant reduction in the numbers of B and T lymphocytes in the red pulp of the spleen of wild-type and TNFR1<sup>-/-</sup> mice was observed. In addition, 24 hours after LPS treatment, a significant increase in the percentage of B cell zone and the white pulp was observed, as well as a decrease in the percentage of the marginal zone in the spleen of wild-type and TNFR1<sup>-/-</sup> mice. Early after systemic administration of LPS, qRT-PCR analysis showed a significant increase in the relative gene expression of 11 chemokines and proinflammatory cytokines (*Xcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Ccl22*, *Tnf* and *Lta*) in the mouse spleen. Using laser microdissection which was followed with qRT-PCR, an increase in the mRNA level for CCL20 in the white pulp of the mouse spleen was observed 2 h after treatment with LPS. Using immunofluorescent analysis of the mouse spleen 2 h after treatment with LPS, it was found that CCL20-

producing cells were positioned in the PALS, while a number of smaller CCL20-producing cells were uniformly distributed in the B cell zone.

**Conclusion:** The intravenously injected LPS causes a massive relocation of B and T lymphocytes from the red pulp of the mouse spleen, accompanied by an increase in the percentage of the white pulp, which is increased due to the increase of B cell zone. The described changes are independent of the TNFR1 signaling pathway. Early after systemic administration, LPS induces an increase in the expression of mRNA of numerous chemokines and proinflammatory cytokines, which are known to regulate the activity and migration of B and T lymphocytes. As indicated by the method of laser microdissection which was followed by qRT-PCR, LPS induces the production of CCL20 in the white pulp of the mouse spleen. In the spleen of mice treated with LPS, CCL20-producing cells are localized in the PALS, while a number of smaller CCL20-producing cells are evenly distributed in the B cell zone.

**Keywords:** lymphocyte, red pulp, chemokine, lipopolysaccharide, spleen, mouse

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Histology and Embryology

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Histološka građa slezine miša</b> .....	<b>1</b>
<i>1.1.1. Bela pulpa</i> .....	3
1.1.1.1. Periarterijski limfocitni omotač (engl. periarterial lymphatic sheath, PALS).....	3
1.1.1.2. Limfni folikuli .....	3
1.1.1.3. Marginalna zona .....	4
<i>1.1.2. Crvena pulpa</i> .....	5
1.1.2.1. Bilrotove putanje .....	5
1.1.2.2. Venski sinusi .....	5
<b>1.2. Razlike u histološkoj građi humane i mišje slezine</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. Recirkulacija limfocita kroz slezinu miša</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Hemokini</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5. Lipopolisaharid (LPS)</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6. Uticaj lipopolisaharida na migraciju ćelija unutar slezine miša</b> .....	<b>19</b>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Eksperimentalne životinje i tretman lipopolisaharidom</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Imunohistohemijske metode</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3. Morfometrijska analiza</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4. Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR)</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5. Laserska mikrodisekcija, qRT-PCR i imunofluorescentne metode</b> .....	<b>28</b>
<b>3.6. Statistička analiza</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7. Etički aspekti istraživanja</b> .....	<b>29</b>

<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Lipopolisaharid indukuje značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Lipopolisaharid izaziva promene u procentualnoj zastupljenosti B ćelijske zone, marginalne zone i bele pulpe slezine miša .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Lipopolisaharidom indukovano smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša nezavisno je od TNFR1 singlnog puta .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Sistemska administracija lipopolisaharida izaziva rane promene u ekspresiji citokina i hemokina u slezini miša .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5. Lipopolisaharid indukuje produkciju hemokina CCL20 u beloju pulpi slezine miša .....</b>	<b>46</b>
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>56</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>57</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Histološka građa slezine miša

Slezina (lat. *lien*, grč. *splen*) je najveći sekundarni limfatični organ i predstavlja značajan filter krvi za antigene i patogene koji su prodrli u cirkulaciju (Murphy i Weaver, 2016). Pored toga, ovaj organ ima ključnu ulogu u metabolizmu gvožđa, kao i u homeostazi eritrocita (Bronte i Pittet, 2013).

Slezina je obavijena kapsulom koja je sastavljena od gustog vezivnog tkiva, elastičnih vlakana i glatkih mišićnih ćelija (Cesta, 2006). Na površini kapsule nalazi se jedan red ljuspastih mezotelnih ćelija (Cesta, 2006). U nivou hilusa, od kapsule se odvajaju vezivno-tkivne pregrade (trabekule), takođe izgrađene od gustog vezivnog tkiva, koje sadrže miofibroblaste i pregrađuju parenhim slezine (Steiniger, 2015). Kroz trabekule prolaze nervi, kao i krvni i limfni sudovi (Cesta, 2006). Vezivno-tkivna potka slezine izgrađena je od retikularnog vezivnog tkiva i stoga slezina pripada grupi limfo-retikularnih limfatičnih organa.

Slezina se sastoji od dva glavna tkivna odeljka – crvene i bele pulpe (Cesta, 2006; Steiniger, 2015). Tkivni odeljci slezine su dobili naziv na osnovu boje koju tkivo ima na svežim preparatima. Crvena pulpa se sastoji od Bilrotovih putanja i venskih sinusa i predstavlja filter krvi za ostarele ili oštećene eritrocite, kao i za antigene koji su dospeli u cirkulaciju. Bela pulpa se sastoji od periarterijskog limfocitnog omotača (engl. *periarterial lymphatic sheath, PALS*) i limfnih folikula i ima značajnu ulogu u antigen specifičnom imunskom odgovoru (Bronte i Pittet, 2013). Oko ova dva pododeljka bele pulpe (PALS-a i limfnih folikula), prema crvenoj pulpi, postavljena je marginalna zona. Veruje se da limfociti i antigeni ulaze u belu pulpu upravo iz marginalne zone (Bajénoff i sar., 2008; Lo i sar., 2003; Steiniger, 2015).

Slezina sadrži jednu četvrtinu svih limfocita koji se nalaze u organizmu (Cesta, 2006). Dobro je poznato da su limfociti koncentrisani u beloj pulpi slezine (Schulz i sar., 2016). Međutim, često se zanemaruje činjenica da je veliki broj ovih ćelija prisutan i u crvenoj pulpi. Ovaj podatak bio je poznat i autorima u prošlosti koji su tvrdili da se,

zbog prisustva velikog broja limfocita, crvena pulpa može smatrati difuznim limfoidnim tkivom (Rhodin,1974). U današnje vreme, limfociti koji se nalaze u crvenoj pulpi su gotovo zanemareni i ne zna se mnogo o njihovim karakteristikama i putevima migracije.

Histološka građa slezine, koja predstavlja glavni filter krvi, usklađena je sa cirkulacijom ovog organa. Krv dospeva u slezinu putem nekoliko grana splenične arterije (lat. *a. splenica*) koje ulaze u slezinu u predelu hilusa. Ove grane se dalje dele na trabekularne arterije (lat. *aa. trabeculares*) koje se nalaze u vezivno-tkivnim pregradama (Steiniger, 2015). Sitni arterijski ogranci napuštaju trabekule i postaju centralne arterije (lat. *aa. centrales*), koje nisu praćene venama i koje su obavijene kontinuiranim limfocitnim omotačem – PALS-om (Pellas i Weiss, 1990b; Steiniger, 2015). Periarterijski limfocitni omotač koji okružuje arteriju centralis nosi naziv proksimalni PALS (pPALS) (Pellas i Weiss, 1990b). Arterija centralis sadrži endotel koji je sastavljen od visokih kockastih ćelija i pripada arterijama mišićnog tipa. Bazalni produžeci endotelnih ćelija spiralno se uvijaju u subendotelnom sloju oko lumena krvnog suda, čime se sprečava direktan prodor antigena iz krvotoka u PALS. Mestimično, uz proksimalni PALS pridruženi su limfni folikuli. U nivou limfnih folikula od arterije centralis se odvajaju folikularne arteriole. Folikularna arteriola se dalje u folikulu grana na sitnije ogranke, koji se delimično ulivaju u marginalni sinus i konačno završavaju u marginalnoj zoni. Krv koja dospeva u marginalni sinus i marginalnu zonu filtrira se kroz marginalnu zonu i usmerena je ka crvenoj pulpi (Cesta, 2006). Pored toga, arterija centralis se takođe grana na sitnije arteriole okružene distalnim PALS-om (dPALS), koji je znatno tanji u odnosu na proksimalni PALS (Pellas i Weiss, 1990b). Arteriole se zatim granaju na nekoliko manjih penicilarnih arterija (lat. *aa. penicilii*) koje ulaze u crvenu pulpu i dalje se granaju na nekoliko kapilara. Prema teoriji "otvorene cirkulacije", krv napušta otvorene krajeve kapilara, prolazi kroz prostore unutar retikularnog vezivnog tkiva Bilrotovih putanja, a zatim prelazi u venske sinuse kroz široke pukotine koje se nalaze između endotelnih ćelija (Steiniger, 2015). Venski sinusi (lat. *sinus splenici*) predstavljaju početak venske cirkulacije. Krv dalje otiče u manje i veće venule crvene pulpe (lat. *vv. pulpae rubrae*), zatim u trabekularne vene (lat. *vv. trabeculares*) i konačno završava u spleničnoj veni (lat. *v. splenica*) koja izlazi iz slezine u nivou hilusa. Splenična vena se uliva u hepatični portni sistem (Cesta, 2006).

### **1.1.1. Bela pulpa**

U slezini miša preovlađuje bela pulpa (Steiniger, 2015). Belu pulpu čine periarterijski limfocitni omotač (engl. *periarterial lymphatic sheath*, PALS), limfni folikuli i marginalna zona. Na poprečnom preseku slezine miša, PALS je okružen limfnim folikulima koji imaju tendenciju da se fuzionišu oko PALS-a (Steiniger, 2015). Oko asocijacija PALS-a i limfnih folikula nalazi se marginalna zona koju predominantno čine B limfociti. Obično se može uočiti pet do deset ovakvih asocijacija po jednom poprečnom preseku mišje slezine (Steiniger, 2015).

#### 1.1.1.1. Periarterijski limfocitni omotač (engl. *periarterial lymphatic sheath*, PALS)

Oko centralnih arterija i njihovih ogranaka nalazi se periarterijski limfocitni omotač – PALS, koji predstavlja T-ćelijsku zonu. Nije poznato oko kojih krvnih sudova PALS konačno iščezava (Steiniger, 2015). PALS se sastoji od T limfocita, makrofaga, dendritskih ćelija, fibroblastnih retikularnih ćelija i B limfocita.

Razlikuju se unutrašnji i spoljašnji PALS (Cesta, 2006). U unutrašnjem PALS-u dominiraju CD4<sup>+</sup> T limfociti, mada se mogu uočiti i pojedini CD8<sup>+</sup> T limfociti. Pored T limfocita, unutrašnji PALS sadrži i interdigitantne ćelije, migrirajuće B limfocite, kao i malobrojne retikularne ćelije (Van Rees i sar., 1996). Spoljašnji PALS se sastoji od koncentrično postavljenih retikularnih ćelija između kojih se nalaze mali i srednji T i B limfociti, makrofagi, a nakon antigenske stimulacije, i plazma ćelije (Cesta, 2006; Van Rees i sar., 1996).

#### 1.1.1.2. Limfni folikuli

Na pojedinim mestima, uz PALS su postavljeni limfni folikuli koji predstavljaju B-ćelijsku zonu. U zavisnosti od funkcionalnog stanja slezine, limfni folikuli mogu biti primarni i sekundarni.

Primarni limfni folikuli postoje tokom intrauterinog života, kao i kod eksperimentalnih životinja koje su odgajane u sterilnim uslovima. U sastav primarnih limfnih folikula ulaze mnogobrojni B limfociti, malobrojni T limfociti, kao i makrofagi i folikulske dendritske ćelije (engl. *follicular dendritic cell*, FDC).

Sekundarni limfni folikuli nastaju od primarnih folikula nakon kontakta jedinice sa antigenima spoljašnje sredine. Sekundarni limfni folikuli sadrže germinativne centre (Allen i sar., 2007; MacLennan, 1994; Mesin i sar., 2016; Ramiscal i Vinuesa, 2013; Victora i Nussenzweig, 2012) za čiji je razvoj potrebna antigenska stimulacija, kao i prisustvo T limfocita. Oko germinativnog centra, u okviru sekundarnog limfnog folikula, nalazi se limfocitna korona. Germinativni centar saži tamnu zonu, svetlu zonu i spoljašnju zonu. Tamna zona sadrži centroblaste, malobrojne T limfocite, makrofage i produžetke folikulskih dendritskih ćelija. Svetla zona sadrži centrocite, T limfocite, memorijske B limfocite, ćelije slične plazmocitima, makrofage i gustu mrežu folikularnih dendritskih ćelija. U sastav spoljašnje zone ulaze limfociti slični centrocitima, T limfociti, ćelije slične plazmocitima i produžeci folikulskih dendritskih ćelija. U okviru korone, koja okružuje spoljašnju i svetlu zonu, sreću se recirkulišući mali B limfociti, T limfociti i makrofagi.

#### 1.1.1.3. Marginalna zona

Marginalna zona okružuje asocijacije PALS-a i limfnih folikula i sastoji se od B limfocita marginalne zone, makrofaga, dendritskih ćelija i retikularnih fibroblasta (Cesta, 2006; Kraal, 1992; Nolte i sar., 2000).

B limfociti marginalne zone pripadaju grupi necirkulišućih B limfocita, koji kontinuirano prelaze iz marginalne zone u limfne folikule, kao i u obrnutom smeru, što im omogućava da antigene iz krvotoka donesu u limfne folikule (Cesta, 2006; Schulz i sar., 2016). Za razliku od folikularnih B limfocita koji imaju  $IgM^+IgD^-$  fenotip, B limfociti marginalne zone pokazuju  $IgM^+IgD^+$  fenotip (Van Rees i sar., 1996).

U okviru marginalne zone, prisutna su dva tipa makrofaga: makrofagi marginalne zone i marginalni metalofilni makrofagi (den Haan i Kraal, 2012; Kraal i Mebius, 2006). Makrofagi marginalne zone nasumično su raspoređeni širom marginalne zone i eksprimiraju receptore za prepoznavanje molekulskih obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*, *PRRs*), kao što su receptori slični *Toll*-u (engl. *Toll-like receptors*, *TLRs*) i makrofagni receptor kolagenozne strukture (engl. *macrophage receptor with collagenous structure*, *MARCO*), koji učestvuju u preuzimanju bakterija (Cesta, 2006). Marginalni metalofilni makrofagi zauzimaju karakterističnu poziciju u



obliku venca na unutrašnjoj margini marginalnog sinusa koja je postavljena uz PALS i limfne folikule (Cesta, 2006; Kraal i Mebius, 2006). Ovaj venac je na pojedinim mestima isprekidan *bridging* kanalima marginalne zone, koji povezuju belu pulpu sa crvenom pulpom (Mitchell, 1973). *Bridging* kanali marginalne zone obloženi su fibroblastnim retikularnim ćelijama i prisutni su na mestima gde PALS (ali ne i limfni folikuli) dodiruje marginalnu zonu (Bajénoff i sar., 2008) .

Većina arterijske krvi koja ulazi u slezinu najpre dospeva do marginalne zone u kojoj se nalaze makrofagi marginalne zone, kao i B limfociti marginalne zone, koji mogu biti aktivirani veoma brzo. Na ovaj način makrofagi i B limfociti marginalne zone presreću antigene i patogene iz krvi i reaguju na njih (Kraal i Mebius, 2006). Osim toga, marginalna zona predstavlja tranzitnu zonu za ćelije koje napuštaju krvotok i koje migriraju u belu pulpu (Schulz i sar., 2016).

### **1.1.2. Crvena pulpa**

Crvena pulpa obuhvata Bilrotove putanje i venske sinuse.

#### 1.1.2.1. Bilrotove putanje

Bilrotove putanje predstavljaju ćelijske gredice, nejednakog dijametra. Ćelijska mreža Bilrotovih putanja sastavljena je od retikularnih ćelija i retikularnih vlakana. Retikularna vlakna su obavijena retikularnim ćelijama i njihovim produžecima. U prostorima koji se nalaze unutar Bilrotovih putanja mogu se uočiti različiti tipovi ćelija: brojni limfociti, eritrociti, trombociti, granulociti, makrofagi, kao i plazmablasti i plazma ćelije (Cesta, 2006; Steiniger, 2015). Plazmablasti i plazma ćelije migriraju iz spoljašnjeg PALS-a i limfnih folikula u crvenu pulpu nakon antigen-specifične diferencijacije (Cesta, 2006). U slezini glodara, veoma je česta ekstramedularna hematopoeza, naročito kod fetalnih i neonatalnih životinja. Stoga se u crvenoj pulpi mogu naći i raznovrsne mijeloidne, eritroidne i megakariocitne ćelije (Cesta, 2006).

#### 1.1.2.2. Venski sinusi

Venski sinusi crvene pulpe građeni su po tipu diskontinuiranih kapilara. Zid venskih sinusa izgrađen je od endotelnih ćelija vretenastog ili štapićastog oblika (Steiniger, 2015). Između endotelnih ćelija ne postoje međućelijski spojevi, koji su

karakteristični za endotelne ćelije kapilara, a prisutne su široke pukotine koje omogućavaju nesmetano kretanje ćelijskih elementi krvi, u oba smera. Sa spoljašnje strane endotelnih ćelija nalaze se vlakna u obliku prstena (engl. *ring fibres*), koja su sastavljena od materijala nalik bazalnoj membrani u kome se nalazi kolagen tipa IV i laminin (Steiniger, 2015). Ovaj materijal je sa spoljašnje strane prekriven retikularnim vlaknima koja povezuju venske sinusoide sa Bilotovim putanjama (Steiniger, 2015).

## **1.2. Razlike u histološkoj građi humane i mišje slezine**

U humanoj slezini, bela pulpa zauzima manji volumen u odnosu na crvenu pulpu. Deo crvene pulpe koja okružuje limfne folikule sadrži rastresitiju retikularnu osnovu i predstavlja perifolikularnu zonu. U perifolikularnoj zoni nalaze se mali prostori ispunjeni krvlju, u kojima su predominantno smešteni eritrociti. Humana slezina ne poseduje marginalni sinus i smatra se da ulogu marginalnog sinusa obavlja perifolikularna zona (Steiniger i sar., 1997; Steiniger i sar., 2001). Nedavna istraživanja ukazuju na to da humana slezina ne poseduje izdvojen histološki odeljak koji bi odgovarao marginalnoj zoni glodara (Steiniger, 2015). B limfociti koji imaju fenotip marginalne zone mogu se detektovati metodom protočne citometrije, ali se njihova distribucija potpuno razlikuje u odnosu na marginalnu zonu laboratorijskih glodara i stoga je predložen novi termin "površinska zona" (Steiniger, 2015).

## **1.3. Recirkulacija limfocita kroz slezinu miša**

Limfociti se kontinuirano kreću između limfatičnih i nelimfatičnih organa. (Pabst i Westermann, 1991; Watson i Bradley, 1998). Tokom migracije, limfociti prolaze kroz krvne i limfne sudove (Abernethy i Hay, 1992; Eichner i Sixt, 2011; Pabst i Westermann, 1991). Za razliku od monocita i granulocita, koji nakon izlaska iz krvotoka trajno ostaju u organima, limfociti imaju sposobnost recirkulacije (nakon napuštanja krvotoka imaju sposobnost ponovnog vraćanja u krv) (Pabst i Westermann, 1991). Putevi recirkulacije limfocita kroz slezinu još uvek nisu dovoljno razjašnjeni (Steiniger, 2015).

Smatra se da postoje dva različita puta imigracije limfocita u slezinu (Steiniger, 2015; Pellas i Weiss, 1990b). Intravenski ubrizgani, obeleženi B i T limfociti najpre dospevaju u marginalnu zonu (Pabst, 1988). Prema prvom putu migracije, limfociti migriraju iz marginalne zone u PALS i limfne folikule (Pabst, 1988; Pellas i Weiss, 1990b). Tranzit T limfocita iz marginalne zone u PALS omogućen je zahvaljujući prisustvu *bridging* kanala marginalne zone, koji su bogati fibroblastnim retikularnim ćelijama (Bajénoff i sar., 2008). B limfociti dospevaju u koronu limfnog folikula tako što najpre prolaze kroz PALS (Nieuwenhuis i Ford, 1976; van Ewijk i Nieuwenhuis P, 1985). Prema drugom putu migracije, iz marginalne zone u koju su prvobitno dospeli, limfociti migriraju u tri pododeljka crvene pulpe – subkapsularnu crvenu pulpu, centralnu crvenu pulpu, i periarterijski hematopoetski omotač (PAHS), kao i u delove bele pulpe – distalni PALS, proksimalni PALS i limfne folikule (Pellas i Weiss, 1990b). U pododeljcima crvene pulpe B limfociti se nakupljaju u većoj koncentraciji u poređenju sa bilo kojim podtipom T limfocita. Većina limfocita koja ulazi u belu pulpu najpre dospeva u distalni PALS. Nakon toga, kako limfociti napreduju ka proksimalnim delovima bele pulpe, obeležene ćelije se nakupljaju oko centralnih arterija u proksimalnom PALS-u (T limfociti) ili na granici sa limfnim folikulima (B limfociti). Dok T limfociti perzistiraju u proksimalnom PALS-u, B limfociti migriraju iz proksimalnog PALS-a ka limfnom folikulu (Pellas i Weiss, 1990b).

Još uvek nije poznato na koji način limfociti napuštaju slezinu u bazalnom stanju (Schulz i sar., 2016; Steiniger, 2015). Smatra se da limfociti u najvećoj meri napuštaju slezinu kroz splenične vene crvene pulpe (Moser i Loetscher, 2001, Steiniger, 2015; Pellas i Weiss, 1990b). Pored toga, pojedine ćelije bele pulpe mogu da napuste slezinu putem mreže eferentnih limfnih sudova (Steiniger, 2015; Pellas i Weiss, 1990a i 1990b). Koliko je poznato, slezina ne poseduje aferentne limfne sudove (Cesta, 2006; Steiniger, 2015). S druge strane, eferentni limfni sudovi su prisutni i postavljeni su uz arterije koje se nalaze u trabekulama, kao i u beloj pulpi (Pellas i Weiss, 1990a, Shimizu i sar., 2009). Duboki splenični limfatici polaze iz proksimalnog PALS-a, prate grananje arterija i na kraju prazne svoj sadržaj u trabekularne limfatike (Pellas i Weiss, 1990a). U nivou spleničnog hilusa, trabekularni limfatici se granaju na sitnije sudove koji obrazuju pleksus i koji zatim probijaju kapsulu i pridružuju se mezeteričnom pleksusu (Pellas i Weiss, 1990a).

#### 1.4. Hemokini

Hemokini su hemotaktički citokini, sa molekularnom masom 7-12 kDa, koji kontrolišu kretanje i pozicioniranje ćelija imunskog sistema (Griffith i sar., 2014; Schulz, 2016). Kretanje ćelija duž hemokinskog gradijenta podrazumeva detekciju suptilnih razlika u koncentraciji hemokina (Moser i Loetscher, 2001). Pre migracije, ćelije prolaze kroz proces polarizacije, pri čemu nastaju lamelipodije (na vodećem kraju ćelije) i uropode (na pratećem kraju ćelije) (Sánchez-Madrid i del Pozo, 1999). Nakon toga sledi usmereno ćelijsko kretanje koje je omogućeno zahvaljujući reorganizovanju citoskeleta, kao i adhezivnim interakcijama sa ekstracelularnim matriksom (Moser i Loetscher, 2001; Sánchez-Madrid i del Pozo, 1999).

Kod miševa i ljudi, hemokini obrazuju najveću familiju citokina koja se sastoji od oko 50 endogenih hemokina (Tabela 1) (Griffith i sar., 2014; Schulz i sar., 2016). U zavisnosti od pozicije prve dve od četiri konzervirane cisteinske rezidue, podeljeni su u četiri grupe: CXC (dva cisteina su razdvojena jednom varijabilnom aminokiselinom), CC (dva cisteina se nalaze jedan pored drugog), XC (nedostaje prvi od dva cisteina) i CX3C (tri aminokiseline se nalaze između dva cisteina) (Griffith i sar., 2014; Schulz i sar., 2016). Hemokini mogu biti produkovani od strane raznovrsnih limfoidnih i nelimfoidnih ćelija (Schulz, 2016).

**Tabela 1. Hemokini**

Hemokin	Sinonimi	Kategorija hemokina	Receptor	Uloge u imunskom sistemu
<b>CXC subfamilija</b>				
CXCL1	GRO $\alpha$ , MGSA, mišji KC	Inflamatorni	CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL2	GRO $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ , mišji MIP-2	Inflamatorni	CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL3	GRO $\gamma$ , MIP-2 $\beta$	Inflamatorni	CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL4	PF4	Hemokin trombocita	CXCR3-B	Prokoagulans
CXCL5	ENA-78, mišji LIX	Inflamatorni	CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL6	GCP-2 (ne postoji mišji)	Inflamatorni	CXCR1, CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL7	NAP-2	Hemokin trombocita, inflamatorni	CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL8	IL-8 (ne postoji mišji)	Inflamatorni	CXCR1, CXCR2	Migracija neutrofila
CXCL9	MIG	Inflamatorni	CXCR3	Th1 odgovor; migracija Th1, CD8, NK ćelija
CXCL10	IP-10	Inflamatorni	CXCR3	Th1 odgovor; migracija Th1, CD8, NK ćelija
CXCL11	I-TAC	Inflamatorni	CXCR3	Th1 odgovor; migracija Th1, CD8, NK ćelija
CXCL12	SDF-1	Homeostatski	CXCR4	Naseljavanje u koštanu srž
CXCL13	BLC, BCA-1	Homeostatski	CXCR5	Pozicioniranje B limfocita i folikularnih T helper limfocita u limfnim čvorovima
CXCL14	BRAK	Homeostatski	Nije poznat	Naseljavanje makrofaga u kožu (kod ljudi)
Cxcl15	Lungkine (samo kod miša)	Nije poznato	Nije poznat	?
CXCL16	SR-PSOX	Inflamatorni	CXCR6	Migracija i preživljavanje NKT ćelija i urođenih limfoidnih ćelija
CXCL17	DMC	Dvojni	CXCR8	Migracija makrofaga i dendritskih ćelija

CC subfamilija				
CCL1	I-309, mišji TCA-3	Inflamatorni	CCR8	Migracija Th2 ćelija i Treg ćelija
CCL2	MCP-1, mišji JE	Inflamatorni	CCR2	Migracija monocita u inflamaciji
CCL3	MIP-1 $\alpha$	Inflamatorni	CCR1, CCR5	Migracija makrofaga i NK ćelija; interakcije između T limfocita i dendritskih ćelija
CCL4	MIP-1 $\beta$	Inflamatorni	CCR5	Migracija makrofaga i NK ćelija; interakcije između T limfocita i dendritskih ćelija
CCL5	RANTES	Inflamatorni, hemokin trombocita	CCR1, CCR3, CCR5	Migracija makrofaga i NK ćelija; interakcije između T limfocita i dendritskih ćelija
Ccl6	C-10, MRP-1 (samo kod miša)	Nije poznato	Nepoznat	?
CCL7	MCP-3, mišji Fic ili MARC	Inflamatorni	CCR2, CCR3	Mobilizacija monocita
CCL8	MCP-2	Inflamatorni	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (humani); CCR8 (mišji)	Th2 odgovor; naseljavanje kože (kod miša)
Ccl9/10	MIP-1 $\gamma$ , MRP-2 (samo kod miša)	Nije poznato	Nepoznat	?
CCL11	Eotaxin-1	Dvojni	CCR3, CCR5	Migracija eozinofila i bazofila
Ccl12	MCP-5 (samo kod miša)	Inflamatorni	CCR2	Migracija monocita u inflamaciji
CCL13	MCP-4 (ne postoji mišji)	Inflamatorni	CCR2, CCR3, CCR5	Th2 odgovor

CCL14	HCC-1 (ne postoji mišji)	Plazma ili trombocitni hemokin koji se aktivira cepanjem	CCR1, CCR3, CCR5	?
CCL15	Leukotactin-1, HCC-2, MIP-5 (ne postoji mišji)	Plazma ili trombocitni hemokin koji se aktivira cepanjem	CCR1, CCR3	?
CCL16	HCC-4, NCC-4, LEC (ne postoji mišji)	Nije poznato	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, H4 (engl. <i>histamine receptor type 4</i> )	?
CCL17	TARC	Dvojni	CCR4	Th2 odgovor, migracija Th2 ćelija, Treg, naseljavanje u kožu i pluća
CCL18	PARC, DC-CK1 (ne postoji mišji)	Homeostatski	CCR8	Th2 odgovor; marker alternativno aktiviranih makrofaga (AAM), naseljavanje u kožu
CCL19	ELC, MIP-3 $\beta$	Homeostatski	CCR7	Naseljavanje T limfocita i dendritskih ćelija u limfne čvorove
CCL20	MIP-3 $\alpha$ , LARC	Dvojni	CCR6	Th17 odgovori; naseljavanje B limfocita i dendritskih ćelija u limfatično tkivo digestivnog trakta ( <i>gut-associated lymphoid tissue</i> )
CCL21	SLC, 6CKine	Homeostatski	CCR7	Naseljavanje T limfocita i dendritskih ćelija u limfne čvorove
CCL22	MDC, mišji ABCD-1	Dvojni	CCR4	Th2 odgovor, migracija Th2 ćelija, migracija Treg

CCL23	MPIF-1, MIP-3, mišji C10	Plazma ili trombocitni hemokin koji se aktivira cepanjem	CCR1, FPRL1 (engl. <i>formyl peptide receptor like-1</i> )	?
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	Homeostatski	CCR3	Migracija eozinofila i bazofila
CCL25	TECK	Homeostatski	CCR9	Naseljavanje T limfocita u digestivni sistem; migracija timocita
CCL26	Eotaxin-3	Inflamatorni	CCR3, CX3CR1	Migracija eozinofila i bazofila
CCL27	CTAK, ILC	Homeostatski	CCR10	Naseljavanje T limfocita u kožu
CCL28	MEC	Homeostatski	CCR3, CCR10	Naseljavanje T limfocita i IgA plazma ćelija u mukožu
<b>XC subfamilija</b>				
XCL1	Lymphotactin $\alpha$ , SCM-1 $\alpha$ , ATAC	Dvojni	XCR1	Unakrsna-prezentacija od strane CD8 <sup>+</sup> dendritskih ćelija
XCL2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$ (ne postoji mišji)	Dvojni	XCR1	Unakrsna-prezentacija od strane CD8 <sup>+</sup> dendritskih ćelija
<b>CX3C subfamilija</b>				
CX3CL1	Fractalkine, mišji neurotactin	Dvojni	CX3CR1	Migracija NK ćelija, monocita i T limfocita

Modifikovano prema: Griffith i sar., 2014; Hernández-Ruiz i Zlotnik, 2017; Schulz i sar., 2016.

AAM, alternativno aktivirani makrofagi; ATAC, engl. *activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related*; BCA-1, engl. *B cell-attracting chemokine-1*; BLC, engl. *B lymphocyte chemoattractant*; BRAK, engl. *breast and kidney-expressed chemokine*; 6CKine, engl. *chemokine with 6 cysteines*; CTACK, engl. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*; DC-CK1, engl. *dendritic cell (DC)-chemokine 1*; DMC, engl. *dendritic cell and monocyte chemokine-like protein*; ELC, engl. *Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine*; ENA-78, engl. *epithelial neutrophil activating protein-78*; GCP-2, engl. *granulocyte*



*chemotactic protein 2*; GRO, engl. *growth-regulated oncogene*; HCC, engl. *hemofiltrate CC chemokine*; IL, interleukin; ILC, engl. *interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine*; IP-10, engl. *interferon-induced protein of 10 kDa*; I-TAC, engl. *IFN-inducible T cell alpha chemoattractant*; KC, engl. *keratinocyte-derived chemokine*; LARC, engl. *liver and activation-regulated chemokine*; LEC, engl. *liver-expressed chemokine*; LIX, engl. *lipopolysaccharide-induced CXC chemokine*; MARC, engl. *mast cell activation-related chemokine*; MCP, engl. *monocyte chemotactic protein*; MDC, engl. *macrophage-derived chemokine*; MEC, engl. *mucosae-associated epithelial chemokine*, MGSA, engl. *melanoma growth stimulating activity*; MIG, engl. *monokine induced by gamma-interferon*; MIP, *makrofagni inflamatorni protein* (engl. *macrophage inflammatory protein*); MPIF, engl. *myeloid progenitor inhibitory factor*; MRP, engl. *macrophage inflammatory protein-related protein*; NAP-2, engl. *nucleosome assembly protein 2*; NCC, engl. *novel CC chemokine*; NK ćelije, urođenoubilačke (engl. *natural killer*) ćelije; NKT ćelije, urođenoubilačke T (engl. *natural killer T*) ćelije; PARC, engl. *pulmonary and activation-regulated chemokine*; PF4, engl. *platelet factor 4*; RANTES, engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*; SCM, engl. *single C motif*; SLC, engl. *secondary lymphoid-tissue chemokine*; SDF-1, engl. *stromal cell-derived factor 1*; SR-PSOX, engl. *scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*; TARC, engl. *thymus- and activation-regulated chemokine*; TCA-3, engl. *T cell activation protein 3*; Th, T helper; TECK, engl. *thymus-expressed chemokine*; Treg, regulatorni T limfociti.

Receptori za hemokine pripadaju najvećoj grupi  $\gamma$  subfamilije rodopsinu sličnih receptora, koji sadrže sedam transmembranskih domena (Murphy i sar., 2000). Postoje dva tipa hemokinskih receptora: receptori vezani sa G proteine (engl. G protein-coupled receptors, GPCRs), koji ostvaruju signal aktivacijom pertusis toksin-senzitivnog  $G_i$ -tipa G proteina i atipični hemokinski receptori, koji ublažavaju inflamaciju uklanjanjem hemokina i imaju ulogu oblikovanju hemokinskog gradijenta (Bachelerie i sar., 2013, Griffith i sar., 2014, Murphy i sar., 2000). Otkriveno je oko 20 signalnih i 4 nesignalna hemokinska receptora (Tabela 2) (Bonnechi i Graham, 2016; Chen i sar, 2017; Griffith i sar., 2014). Dva dodatna atipična hemokinska receptora, ACKR5 i ACKR6, još uvek čekaju funkcionalnu potvrdu (Bonnechi i Graham, 2016; Schulz i sar., 2016).

**Tabela 2. Hemokinski receptori**

Receptor	Ekspresija na ćelijama imunskog sistema	Ligandi
<b>Receptori vezani za G proteine</b>		
CXCR1	Neutrofili > monociti, NK ćelije, mastociti, bazofili, CD8 <sup>+</sup> efektorski T limfociti	CXCL6, CXCL8
CXCR2	Neutrofili > monociti, NK ćelije, mastociti, bazofili, CD8 <sup>+</sup> T limfociti	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3	Th1 limfociti, CD8 <sup>+</sup> T <sub>CM</sub> i T <sub>EM</sub> , NK ćelije, NKT ćelije, plazmacitoidne dendritske ćelije, B limfociti, Treg, Tfh	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	Većina leukocita	CXCL12
CXCR5	B limfociti, Tfh, Tfr, CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub>	CXCL13
CXCR6	Th1 limfociti, Th17 limfociti, γδ T limfociti, urođene limfoidne ćelije, NKT ćelije, NK ćelije, plazma ćelije	CXCL16
CXCR8	Monociti, dendritske ćelije	CXCL17
CCR1	Monociti, makrofagi, neutrofili, Th1 limfociti, bazofili, dendritske ćelije	CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	Monociti, makrofagi, Th1 limfociti, nezrele dendritske ćelije, bazofili, NK ćelije	CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13, CCL16
CCR3	Eozinofili > bazofili, mastociti	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL24, CCL26, CCL28
CCR4	Th2 limfociti, T limfociti koji naseljavaju kožu i pluća, Treg > Th17 limfociti, CD8 <sup>+</sup> T limfociti, monociti, B limfociti, nezrele dendritske ćelije	CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL22

CCR5	Monociti, makrofagi, Th1 limfociti, NK ćelije, Treg, CD8 <sup>+</sup> T limfociti, dendritske ćelije, neutrofilii	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16
CCR6	Th17 > nezrele dendritske ćelije, γδ T limfociti, NKT ćelije, NK ćelije, Treg, Tfh, B limfociti	CCL20
CCR7	Naivni T limfociti, T <sub>CM</sub> , T <sub>RCM</sub> , mijeloidne dendritske ćelije, B limfociti	CL19, CCL21
CCR8	Th2 limfociti, Treg, TRM u koži, γδ T limfociti, monociti, makrofagi	CCL1, CCL4, CCL17
CCR9	T limfociti koji naseljavaju creva, timociti, B limfociti, dendritske ćelije, plazmacitoidne dendritske ćelije	CCL25
CCR10	T limfociti koji naseljavaju kožu, IgA-plazmablasti	CCL27, CCL28
XCR1	Unakrsno-prezentujuće CD8 <sup>+</sup> dendritske ćelije, timusne dendritske ćelije	XCL1, XCL2
CX3CR1	Rezidentni monociti, makrofagi, mikroglia, Th1 limfociti, CD8 <sup>+</sup> TEM, NK ćelije, γδ T limfociti, dendritske ćelije	CX3CL1
<b>Atipični receptori</b>		
ACKR1 (DARC; Duffy)	Eritrociti, limfatični endotel	CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL14, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL7, CXCL8
ACKR2 (D6)	Limfatični endotel, dendritske ćelije, B limfociti	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22
ACKR3 (CXCR7)	Stromalne ćelija, B limfociti	CXCL11, CXCL12

ACKR4 (CCRL1; CCX-CKR)	Epitel timusa	CCL19, CCL21, CCL25, CXCL13
ACKR5 (CKRX, CRAM-A)		CCL5, CCL19, hemerin
ACKR6 (Nir1)		CCL18

Modifikovano prema: Chen i sar., 2017; Griffith i sar., 2014, Schulz i sar., 2016; Schutyser i sar., 2003.

ACKR, atipični hemokinski receptor (engl. *atypical chemokine receptor*); DARK, engl. *Duffy antigen/receptor for chemokines*; NK ćelije, urođenoubilačke (engl. *natural killer*) ćelije; NKT ćelije, urođenoubilačke T (engl. *natural killer T*) ćelije; T<sub>CM</sub>, centralni memorijski T limfociti; T<sub>EFF</sub>, efektorski T limfociti; T<sub>EM</sub>, efektorski-memorijski T limfociti; T<sub>fh</sub>, T folikularni helper limfociti; T<sub>fr</sub>, folikularni regulatorni T limfociti; Th, T helper; T<sub>RCM</sub>, recirkulišući memorijski T limfociti; T<sub>reg</sub>, regulatorni T limfociti; T<sub>RM</sub>, rezidentni-memorijski T limfociti; > ukazuje na veći relativni nivo ekspresije receptora.

Na osnovu glavnih fizioloških karakteristika, hemokini se mogu podeliti na homeostatske (konstitutivno eksprimirani u limfoidnim tkivima) i inflamatorne hemokine (indukovani inflamatornim procesom) (Tabela 1) (Schulz, 2016, Moser i Loetscher, 2001). Ova podela nije apsolutna i pojedini hemokini se mogu svrstati u obe kategorije (Tabela 1) (Schulz, 2016; Moser i Loetscher, 2001).

Homeostatski hemokini (alternativno nazvani konstitutivni, limfoidni ili *housekeeping* hemokini), proizvode se u odgovarajućim mikrodeljcima limfatičnih i nelimfatičnih tkiva i imaju ulogu u održavanju fiziološkog saobraćaja ćelija. Homeostatski hemokini regulišu kretanje i pozicioniranje ćelija koje uglavnom učestvuju u adaptivnom imunskom sistemu tokom hematopoeze, uzorkovanju antigena u sekundarnim limfatičnim organima, kao i u imunološkom nadzoru (Moser i Loetscher, 2001). Sa druge strane, inflamatorni hemokini (alternativno nazvani inducibilni hemokini) eksprimirani su u tkivima zahvaćenim inflamacijom od strane rezidentnih ili infiltrisanih ćelija. Ekspresija inflamatornih hemokina nastaje nakon stimulacije

proinflamatornim citokinima ili u kontaktu sa patogenim agensima. Inflamatorni hemokini imaju ulogu u regrutovanju efektorskih ćelija (Moser i Loetscher, 2001).

Glavni homeostatski hemokini odgovorni za migraciju i naseljavanje limfocita u različite odeljke bele pulpe slezine su CCL19, CCL21 i CXCL13 (Schulz, 2016). Dok CCL19 i CCL21 (ligandi za receptor CCR7) regulišu migraciju T limfocita u T-ćelijsku zonu, CXCL13 (ligand za receptor CXCR5) indukuje migraciju B limfocita u B-ćelijsku zonu bele pulpe slezine (Mebius i Kraal, 2005; Schulz, 2016). Hemokini CCL19 i CCL21 predstavljaju produkt fibroblastnih retikularnih ćelija, koje su smeštene u T-ćelijskoj zoni (Griffith i sar., 2014). Sa druge strane, hemokin CXCL13 proizvode folikulske dendritske ćelije, prisutne u limfnim folikulima (Griffith i sar., 2014). Ekspresija ovih hemokina (CCL19, CCL21 i CXCL13) nalazi se pod kontrolom faktora nekroze tumora (TNF) i limfotoksina- $\alpha_1\beta_2$  (LT- $\alpha_1\beta_2$ ) (Ngo i sar., 1999). Istraživanja su pokazala da nedostatak signalizacije putem TNF receptora 1 (TNFR1) ili LT- $\beta$  receptora (LT- $\beta$ R), dovodi do znatnog smanjenja nivoa CCL19, CCL21 i CXCL13 u slezini, a kao finalni rezultat, zapažaju se dezorganizovani regioni bele pulpe (Ngo i sar., 1999). Oba receptora, TNFR1 i LT- $\beta$ R, eksprimirana su od strane radio-rezistentnih stromalnih ćelija. S druge strane, ligande za ove receptore eksprimiraju hematopoetske ćelije (najverovatnije B limfociti). Nakon vezivanja liganda za ove receptore, aktivira se nuklearni faktor- $\kappa$ B (nf- $\kappa$ B), što indukuje ekspresiju hemokina (Mebius i Kraal, 2005).

B limfociti marginalne zone eksprimiraju i receptor CXCR7, koji, pored drugih faktora, ima ulogu u održavanju njihove fiziološke pozicije (Chen, 2017). Kod miševa koji su tretirani antagonistom CXCR7 uočen je smanjen broj B limfocita u marginalnoj zoni (Wang i sar, 2012). Istraživanja su pokazala da se CXCR7 vezuje visokim afinitetom za hemokin CXCL12 (Burns i sar., 2006). CXCL12 (engl. *stromal cell-derived factor 1, SDF-1*) (Bleul i sar.,1996) je homeostatski hemokin koji je eksprimiran u crvenoj pulpi slezine, kao i u *bridging* kanalima marginalne zone (Hargreaves, 2001).

## 1.5. Lipopolisaharid (LPS)

Lipopolisaharid (LPS) predstavlja glavnu strukturnu komponentu spoljašnjeg sloja spoljašnje membrane gotovo svih Gram negativnih bakterija (Alexander i Rietschel, 2001; Park i Lee, 2013; Rhee, 2014; Van Amersfoort i sar., 2003). Osnovne komponente LPS-a su polisaharid i lipid A (Ulevitch i Tobias, 1995). Polisaharid je varijabilan u zavisnosti od vrste bakterije, a čine ga O-specifični lanac (O-antigen), spoljašnje jezgro i unutrašnje jezgro. Lipid A sadrži varijabilan broj masnih kiselina, kao i dva fosforilisana glukozaminska disaharida, i predstavlja primarni imunostimulatorni centar LPS-a (Alexander and Rietschel, 2001; Park i Lee, 2013; Rhee, 2014).

Prepoznavanje LPS-a inicira intracelularne signalne puteve i produkciju proinflamatornih medijatora od strane mijeloidnih i nemijeloidnih ćelija (Heumann i Roger, 2002; Rhee, 2014, Ulevitch i Tobias, 1995). Lipopolisaharid biva prepoznat od strane receptorskog kompleksa koji se sastoji of LPS-vezujućeg proteina (engl. LPS-binding protein, LBP), CD14, receptora sličnog *Toll*-u 4 (engl. *Toll-like receptor 4*, TLR4) i MD-2 proteina (Rhee, 2014; Takeda i sar., 2003). LPS-vezujući protein (LBP) poseduje visok afinitet ka LPS-u i stoga ima ulogu u ekstrakciji LPS-a iz ćelijskog zida Gram negativnih bakterija (Tan i Kagan, 2014). LBP se vezuje za lipid A LPS-a, pri čemu nastaje LBP-LPS kompleks. Protein CD14 služi kao receptor za ovaj kompleks i prisutan je kod mijeloidnih ćelija, kao što su monociti/makrofagi. Postoje dva tipa proteina CD14: CD14 vezan za membranu (mCD14) i solubilni CD14 (sCD14). Protein CD14 koji je vezan za membranu (mCD14) nema mogućnost prenosa LPS signala iz ekstracelularnog prostora u citosol, jer ne poseduje transmembranski domen. Protein MD-2 je ekstracelularni protein za koji se vezuje LPS, a povezan je sa ekstracelularnim domenom TLR4. Prenosnje LPS-a od mCD14 do kompleksa TLR4-MD2 dovodi do multimerizacije receptorskog kompleksa (engl. LBP/CD14/TLR4/MD-2 *complex*) u ćelijskoj membrani (Rhee, 2014). Konačno, receptorski kompleks za koga je vezan LPS inicira intracelularne signalne puteve, uključujući NF- $\kappa$ B i IRF3 (interferon regulatorni faktor 3, engl. *interferon regulatory factor 3*), što dovodi do produkcije proinflamatornih citokina (Rhee, 2014). Međutim, i pored ustanovljene dogme da je za

odgovor domaćina na LPS odgovoran isključivo TLR4, nedavne studije su pokazale da postoje i TLR4-nezavisni odgovori domaćina na LPS (Tan and Kagan, 2014).

Lipopolisaharid je povezan sa reakcijama urođenog imunskog odgovora, kao i sa određenim timus-nezavisnim odgovorima B limfocita (Alexander and Rietschel, 2001; Rawlings et al., 2012; Tan and Kagan, 2014). Osim toga, LPS ima ključnu ulogu u patogenezi endotoksičnog šoka, tako što indukuje stvaranje brojnih endogenih medijatora, kao što su citokini, azotni oksidi, lipidni medijatori i superoksidni anjoni (Mukaida et al., 1996). Dobro je poznato da ključnu ulogu u imunskom odgovoru na LPS ima receptor TNFR1 (engl. *tumor necrosis factor receptor-1*, *TNFR1*) (Pfeffer i sar., 1993). TNFR1<sup>-/-</sup> (engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*) miševi pokazuju rezistenciju na endotoksični šok, čak i nakon tretmana visokim dozama LPS-a (Pfeffer i sar., 1993). Zbog toga je od izuzetnog značaja da TNFR1<sup>-/-</sup> životinje budu uključene u istraživanja koja se bave ispitivanjem uticaja LPS-a na mikrosredinu slezine. Međutim, u poslednje vreme istraživanja ukazuju na to da LPS ima uticaja na ćelije koje su uključene u adaptivni imunski odgovor, kao što su folikulske dendritske ćelije (Milićević i sar., 2012). Pokazano je da intravenski aplikovan LPS dovodi do aktivacije folikulskih dendritskih ćelija *in vivo*, kao i da je ova aktivacija nezavisna od TNFR1 signalnog puta (Milićević i sar., 2012).

### **1.6. Uticaj lipopolisaharida na migraciju ćelija unutar slezine miša**

Dosadašnja istraživanja su pokazala da LPS indukuje migraciju različitih ćelijskih populacija unutar slezine miša (De Smedt i sar., 1996; Groeneveld i sar., 1983; Groeneveld i sar., 1985; Kestemann i sar. 2008; Reis e Sousa i sar., 1997). Sistemska administracija LPS-a dovodi do seobe neutrofilnih granulocita iz crvene pulpe i marginalne zone u T-ćelijsku zonu bele pulpe (Kestemann i sar. 2008). Takođe, pokazano je da LPS može i direktno da stimuliše stečeni imunski odgovor dovodeći do sazrevanja i redistribucije dendritskih ćelija iz marginalne zone u T-ćelijsku zonu bele pulpe (De Smedt i sar., 1996; Reis e Sousa i sar., 1997). Dodatno, dobro je poznato da LPS indukuje migraciju marginalnih metalofilnih makrofaga (Groeneveld i sar., 1983) i B limfocita marginalne zone u limfne folikule bele pulpe (Groeneveld i sar., 1985).

Međutim, nema podataka o uticaju LPS-a na populaciju B i T limfocita crvene pulpe slezine, kao i na sledstvene strukturne promene tkivnih odeljaka slezine i molekularne mehanizme uključene u kontrolu ovih promena.

Nedavna studija istakla je značaj hemokinske osovine CCL20 – CCR6 u migraciji B limfocita iz krvi u slezinu nakon tretmana sintetskim Nod1 (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain–containing protein 1*) agonistom FK156, koji indukuje urođeni imunski odgovor *in vivo* (Paradis i sar., 2014). Zbog ovoga bi bilo neophodno ispitati potencijalne promene ove hemokinske osovine nakon sistemske primene LPS-a, kao i odrediti lokalizaciju ćelija koje u ovim uslovima proizvode CCL20.



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- 1) Ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa, 24 h nakon tretmana.
- 2) Ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na strukturnu organizaciju slezine *wild-type* i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa, 24 h nakon tretmana.
- 3) Ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokine i proinflamatorne citokine (*Xcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl12*, *Cxcl13*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl19*, *Ccl20*, *Ccl21*, *Ccl22*, *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Lta* i *Ltb*) u slezini *wild-type* miševa, 1 h , 2 h i 24 h nakon tretmana.
- 4) Ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine (beloj pulpi, crvenoj pulpi i marginalnoj zoni), kao i lokalizacije CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša, 2 h nakon tretmana.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje i tretman lipopolisaharidom

U eksperimentima su korišćeni miševi oba pola, starosti 8-12 nedelja. Nemodifikovani (*wild-type*) miševi soja C57BL/6 obezbeđeni su iz *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Nemačka). TNFR1<sup>-/-</sup> (*tumor necrosis factor receptor-1 knockout*) miševi C57BL/6 genetske osnove (Pfeffer i sar., 1993) obezbeđeni su ljubaznošću Klaus-a Pfeffer-a (Düsseldorf, Nemačka). TNFR1<sup>-/-</sup> miševi pokazuju rezistenciju na toksične efekte LPS-a (Pfeffer i sar., 1993). Poseduju timus, slezinu i limfne čvorove, a imaju selektivni defekt u razvoju Pajerovih ploča (Pfeffer i sar., 1993; Pfeffer, 2003). Razvoj timocita i apsolutni broj limfocita u slezini i limfnim čvorovima su normalni (Pfeffer i sar., 1993). Miševi su uzgajani u specifičnim *pathogen-free* uslovima u centralnom uzgajalištu za životinje Univerziteta u Lübeck-u (Lübeck, Nemačka). Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine, kao i na strukturnu organizaciju tkiva slezine, formirane su četiri grupe životinja: netretirani *wild-type* miševi (n=5), tretirani *wild-type* miševi (n=5), netretirani TNFR1<sup>-/-</sup> miševi (n=5) i tretirani TNFR1<sup>-/-</sup> miševi (n=5). Tretman životinja je podrazumevao ubrizgavanje u repnu venu LPS-a *E. coli* (soj 055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) rastvorenog u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffered saline, PBS*), u dozi 2,5 µg/g telesne mase. Miševi su žrtvovani 24 h nakon tretmana LPS-om, udisanjem CO<sub>2</sub>. Uzorci tkiva slezine zamrzavani su u tečnom azotu. Na tkivnim isečcima slezine primenjene su imunohistohemijske metode i morfometrijska analiza. Imunohistohemijske metode i morfometrijska analiza tkivnih isečaka slezine obavljani su na Institutu za anatomiju Univerziteta u Lübeck-u (Lübeck, Nemačka), kao i na Institutu za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dozvola za obavljanje ovih eksperimenata izdata je od strane *Ministry of Energy, Agriculture, Environment and Rural Areas* (Kiel, Nemačka) (V 242-7224.122-1 (120-8/13)).

*Wild-type* miševi soja C57BL/6, oba pola, starosti 8 nedelja obezbeđeni su iz vivarijuma Galenike a.d. u Beogradu. Tokom oglada, životinje su bile smeštene u vivarijumu Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Životinje su čuvane u standardnim

uslovima, sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokine i proinflamatorne citokine u slezini, formirane su četiri grupe životinja: netretirani miševi (n=9), tretirani miševi žrtvovani 1 h nakon intravenske administracije LPS-a (n=6), tretirani miševi žrtvovani 2 h nakon intravenske administracije LPS-a (n=9) i tretirani miševi žrtvovani 24 h nakon intravenske administracije LPS-a (n=6). Tretman životinja je podrazumevao ubrizgavanje u repnu venu LPS-a *E. coli* (soj 055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) rastvorenog u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffered saline, PBS*), u dozi 2,5 µg/g telesne mase. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Cele slezine 6 miševa iz svake grupe životinja potopljene su i čuvane u stabilizacionom reagensu za RNK – RNAlater™ RNA *stabilization reagent* (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka). Kvantitativnom *real-time* PCR (qRT-PCR) analizom, u tkivu slezine utvrđena je relativna ekspresija gena 18 citokina/hemokina (*Xcl1, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl12, Cxcl13, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl17, Ccl19, Ccl20, Ccl21, Ccl22, Tnf, Il1b, Il6, Lta i Ltb*). Kvantitativni *real-time* PCR sproveden je u *Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu* (Tartu, Estonija). Za ispitivanje uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine, kao i lokalizacije CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša, korišćene su slezine 3 netretirana miša i 3 tretirana miša žrtvovana 2 h nakon intravenske administracije LPS-a. Uzorci tkiva slezine pripremljeni su za lasersku mikrodisekciju iza koje sledi qRT-PCR analiza, kao i za imunofluorescentne metode. Laserska mikrodisekcija, qRT-PCR i imunofluorescentne metode sprovedene su u *Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu* (Tartu, Estonija).

### **3.2. Imunohistohemijske metode**

Uzorci tkiva slezine zamrzavani su u tečnom azotu. Kriostatski isečci sušeni su 2 h na sobnoj temperaturi i fiksirani 10 minuta u rastvoru metanola i acetona (1:1 v/v) na -20 °C, a zatim 45 minuta na 4 °C u 4% paraformaldehidu. Imunohistohemijske metode korišćene su za detekciju B limfocita (B220; klon RA3-6B2; BD Pharmingen, Heidelberg, Nemačka), T limfocita (TCRβ; klon H57-597; BD Pharmingen, Heidelberg, Nemačka) i makrofaga crvene pulpe slezine (F4/80; klon BM8; HyCult Biotechnology,

Uden, Holandija) (Milićević i sar., 2011). Isečci tkiva slezine inkubirani su 1 h sa primarnim antitelom, a potom su inkubirani 30 minuta sa odgovarajućim sekundarnim reagensima. Za identifikaciju B i T limfocita, korišćena su sledeća sekundarna antitela: *alkaline phosphatase goat anti-rat IgG* (Roth, Karlsruhe, Nemačka) i *goat anti-hamster* (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), respektivno. Za vizualizaciju aktivnosti alkalne fosfataze korišćen je *Fast Blue* (BB Salt, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Za identifikaciju makrofaga crvene pulpe korišćeno je sekundarno antitelo *Goat Anti-Rat IgG H&L (Horse Radish Peroxidase, HRP)* (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Za vizualizaciju makrofaga crvene pulpe korišćen je DAB (3,3'-diaminobenzidin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Izostavljanje primarnog antitela ili korišćenje irelevantnog mišjeg antitela odgovarajućeg izotipa predstavljalo je negativne kontrole.

### 3.3. Morfometrijska analiza

Zamrznuti uzorci tkiva slezine sečeni su kriotomom na serijske isečke (poprečni presek) debljine 10  $\mu\text{m}$ . Odabir isečaka izvršen je na sledeći način. Iz svake slezine, odabrana su tri isečka. Prvi isečak je odabiran nasumično, dok su drugi i treći isečak predstavljali uzastopne isečke nakon prvog nasumično izabranog isečka. Prvi isečak je obojen na B limfocite (B220), drugi isečak je obojen na T limfocite (TCR $\beta$ ), dok je treći isečak obojen na makrofage crvene pulpe (F4/80).

Tkivni isečci slezine obojeni na B limfocite (B220) i T limfocite (TCR $\beta$ ) fotografisani su na dva uveličanja – 15 $\times$  i 250 $\times$ . Isečci slezine na kojima su imunohistohemijskim metodama prikazani B limfociti, fotografisani na uveličanju 15 $\times$ , korišćeni su za određivanje procentualne zastupljenosti B-ćelijske zone i marginalne zone u odnosu na ukupnu površinu preseka slezine (Milićević i sar., 2011). Mikrofotografije istih isečaka tkiva, snimljene na uveličanju 250 $\times$ , korišćene su za određivanje broja B limfocita na 0,1  $\text{mm}^2$  crvene pulpe slezine. Procentualna zastupljenost T-ćelijske zone određivana je na mikrofotografijama isečaka tkiva slezine na kojima su imunohistohemijskim metodama prikazani T limfociti, snimljenim na uveličanju 15 $\times$  (Milićević i sar., 2011). Broj T limfocita na 0,1  $\text{mm}^2$  crvene pulpe

slezine određivan je na mikrofotografijama istih isečaka tkiva snimljenim na uveličanju 250×. Ručno obeleženi elementi tkiva na mikrofotografijama preparata projektovanih na ekran monitora, mereni su upotrebom posebnog softvera za analizu slike Analysis 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Nemačka). Broj B i T limfocita na 0,1 mm<sup>2</sup> crvene pulpe određivan je na tri mikrofotografije crvene pulpe (snimljene na uveličanju 250×), za svaki uzorak tkiva slezine. U softveru za digitalnu analizu slike, region crvene pulpe je pažljivo iscrtan kursorom. Čelije su brojane ručno, postavljanjem znaka na svaku imunopozitivnu ćeliju u prethodno iscrtanom regionu crvene pulpe.

Procentualna zastupljenost bele pulpe u odnosu na ukupnu površinu preseka slezine određivana je na mikrofotografijama isečaka tkiva slezine imunohistohemijski obojenih na F4/80 (F4/80; klon BM8; HyCult Biotechnology, Uden, Holandija) (Milićević i sar., 2011). Regione bele pulpe karakteriše odsustvo bojenja na F4/80 (Milićević i sar., 2011). Mikrofotografije su snimljene korišćenjem digitalne kamere Leica DFC295 (Leica, Heerbrugg, Švajcarska), povezane sa svetlosnim mikroskopom Leica DM4000 B LED (Leica, Wetzlar, Nemačka), na uveličanju 50× (opcija Multistep tool).

#### **3.4. Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR)**

Relativna ekspresija gena za XCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, LT $\alpha$  i LT $\beta$  određivana je metodom kvantitativnog *real-time* PCR-a. Mišje slezine su disocirane u 1 ml TRI reagensa (Zymo research, Irvine, CA, SAD) upotrebom gentleMACS Dissociator i M-tubes (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemačka), nakon čega je RNK ekstrahovana korišćenjem fazne separacije i precipitacije izopropanolom. Kvalitet RNK procenjen je upotrebom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Ukupna RNK je konvertovana u komplementarnu DNK (cDNK) korišćenjem SuperScript III kit-a (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) prema uputstvima proizvođača, qRT-PCR je sproveden upotrebom ViiA7 Real-Time PCR System-a (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD). Program amplifikacije uključivao je inicijalni korak denaturacije na 95°C 10 min, praćen denaturacijom na

95°C 15 s, i *annealing*-om i ekstenzijom na 60°C 1 min za 45 ciklusa. SYBR® Green (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) fluorescenca merena je nakon svakog koraka ekstenzije, a specifičnost amplifikacije procenjena je analizom krive disocijacije. Svaki uzorak sproveden je u tri paralelne reakcije. Relativna ekspresija gena izračunata je korišćenjem komparativne Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) metode, gde se relativna ekspresija računa kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , a Ct predstavlja *threshold* ciklus.  $\beta_2$  microglobulin (B2M) korišćen je kao *house-keeping* gen za normalizaciju. Za svaki uzorak, izračunata je aritmetička sredina Ct vrednosti triplikata, za gen od interesa i *house-keeping* gen. Aritmetička sredina Ct vrednosti triplikata *house-keeping* gena oduzeta je od aritmetičke sredine Ct vrednosti triplikata gena od interesa i na taj način je dobijena vrednost  $\Delta Ct$ . Potom je izračunata vrednost  $\Delta\Delta Ct$ , koja je predstavljala razliku između  $\Delta Ct$  vrednosti datog uzorka i  $\Delta Ct$  vrednosti kontrolnog uzorka iz grupe netretiranih miševa, koji je korišćen kao kalibrator. Za svaki uzorak, izračunata je relativna ekspresija gena od interesa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) u odnosu na ekspresiju *house-keeping* gena. Potom je izračunata aritmetička sredina  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrednosti za svaku grupu, kao i standardna devijacija. Prajmeri korišćeni za qRT-PCR analizu navedeni su u Tabeli 3. Prajmeri su dizajnirani korišćenjem programa *PerlPrimer* i *Primer3*. Pored toga, korišćen je i "*pick primers*" alat u okviru *NCBI Gene Database*.

**Tabela 3. Spisak prajmera korišćenih za qRT-PCR analizu**

<b>Gen</b>	<b>Forward prajmer</b>	<b>Reverzni prajmer</b>
<i>B2m</i>	TGAGACTGATACATACGCCTGCA	GATGCTTGATCACATGTCTCGATC
<i>Xcl1</i>	TCTTGATCGCTGCTTTCACC	GAAGTCCTAGAAGAGAGTAGC
<i>Cxcl9</i>	GAGTTCGAGGAACCCTAGTG	AAACTGTTTGAGGTCTTTGAGG
<i>Cxcl10</i>	AGTGCTGCCGTCATTTTCTG	ATTCTCACTGGCCCGTCAT
<i>Cxcl12</i>	CATCAGTGACGGTAAACCAG	CACAGTTTGGAGTGTTGAGG
<i>Cxcl13</i>	TCGTGCCAAATGGTTACAAA	GGTGCAGGTGTGTCTTTTGA
<i>Ccl3</i>	GACTGCCTGCTGCTTCT	GATCTGCCGGTTTCTCTTAG
<i>Ccl4</i>	CATGAAGCTCTGCGTGTCT	CTGCCGGGAGGTGTAA
<i>Ccl5</i>	GTGCCACGTCAAGGAGTAT	CCCATTCTTCTCTGGGTTG
<i>Ccl17</i>	AGTGGAGTGTTCCAGGGATG	CCAATCTGATGGCCTTCTTC
<i>Ccl19</i>	CTGCCTCAGATTATCTGCCAT	CTTCCGCATCATTAGCACCC
<i>Ccl20</i>	CAGAAGCAAGCAACTACGAC	TCTTCGTGTGAAAGATGATAGC
<i>Ccl21</i>	CCCTGGACCCAAGGCAGT	AGGCTTAGAGTGCTTCCGGG
<i>Ccl22</i>	CATTCTTGCTTCCCTGGAGA	TCAGAGAGGAAAAGCGATCC
<i>Tnf</i>	CTGTAGCCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
<i>Il1b</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCAT	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
<i>Il6</i>	GGATACTACTCCCAACAGACCTG	CTCTTTTCTCATTTCACGATTTC
<i>Lta</i>	CATCCAATAAATCAGAAGCA	GTACCCAACAAGGTGAGCAG
<i>Ltb</i>	AGCTGCGGATTCTACACCA	ATCCAAGCGCCTATGAGGT

### 3.5. Laserska mikrodisekcija, qRT-PCR i imunofluorescentne metode

Isečci tkiva slezine, debljine 10  $\mu\text{m}$ , postavljani su na pločice obložene polietilen naftalatom (PEN) (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Nemačka), a zatim obojeni toluidin plavim (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Regioni bele pulpe, crvene pulpe i marginalne zone razlikovani su na osnovu morfologije i mikrodisekovani upotrebom PALM Microbeam Laser mikrodisektora (Carl Zeiss Microimaging GmbH). Za svaki odeljak tkiva slezine, uzimani su pojedinačni uzorci, a zatim je na njima vršeno izolovanje RNK, sinteza cDNK i qRT-PCR analiza, prema prethodno opisanoj proceduri (3.4. Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR)).

Metoda imunofluorescence primenjena je na smrznutim isečcima tkiva slezine, debljine 5  $\mu\text{m}$ , koji su fiksirani 4% formaldehidom. Nakon fiksacije, isečci su tretirani 1% SDS-om u PBS-u 5 min na sobnoj temperaturi i blokirani u 5% normalnom kozjem serumu 15 min na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa primarnim antitelom obavljena je tokom noći na 4°C. Korišćena su sledeća primarna antitela: anti-macrophage inflammatory protein 3 alpha zečje poliklonsko antitelo (ab9829, Abcam, Cambridge, UK) i Alexa Fluor 488 anti-mišji TCR- $\beta$  lanac (clone H57-597, BioLegend, San Diego, CA, SAD). Nakon ispiranja u PBS-u, isečci su inkubirani sa Alexa Fluor 594 obeleženim sekundarnim antitelom (razblaženje 1:2000) 60 min na sobnoj temperaturi. Korišćeno je sledeće sekundarno antitelo: anti-zečje kozje poliklonsko antitelo konjugovano sa Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Nakon ispiranja, pločice su sušene na vazduhu, a zatim pokrivane Dako Fluorescence Mounting Medium-om. Mikrofotografije su snimljene uz pomoć Zeiss LSM 710 invertnog konfokalnog mikroskopa, na uveličanju 200 $\times$ .



### **3.6. Statistička analiza**

Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije. Za statističku analizu podataka, primenjeni su Studentov t-test i ANOVA sa Bonferroni *post hoc* testom za višestruka poređenja, u okviru programa Statistical package SPSS for Windows 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Kao kriterijum značajnosti uzeti su  $p < 0,05$  (postoji statistički značajna razlika) i  $p < 0,01$  (razlika je statistički visoko značajna).

### **3.7. Etički aspekti istraživanja**

Dozvole za obavljanje ovih eksperimenata izdate su od strane *Ministry of Energy, Agriculture, Environment and Rural Areas* (Kiel, Nemačka) (V 242-7224.122-1 (120-8/13)), Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (3376/2; 10/7/2017) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprava za veterinu (323-07-01339/2017-05/1).

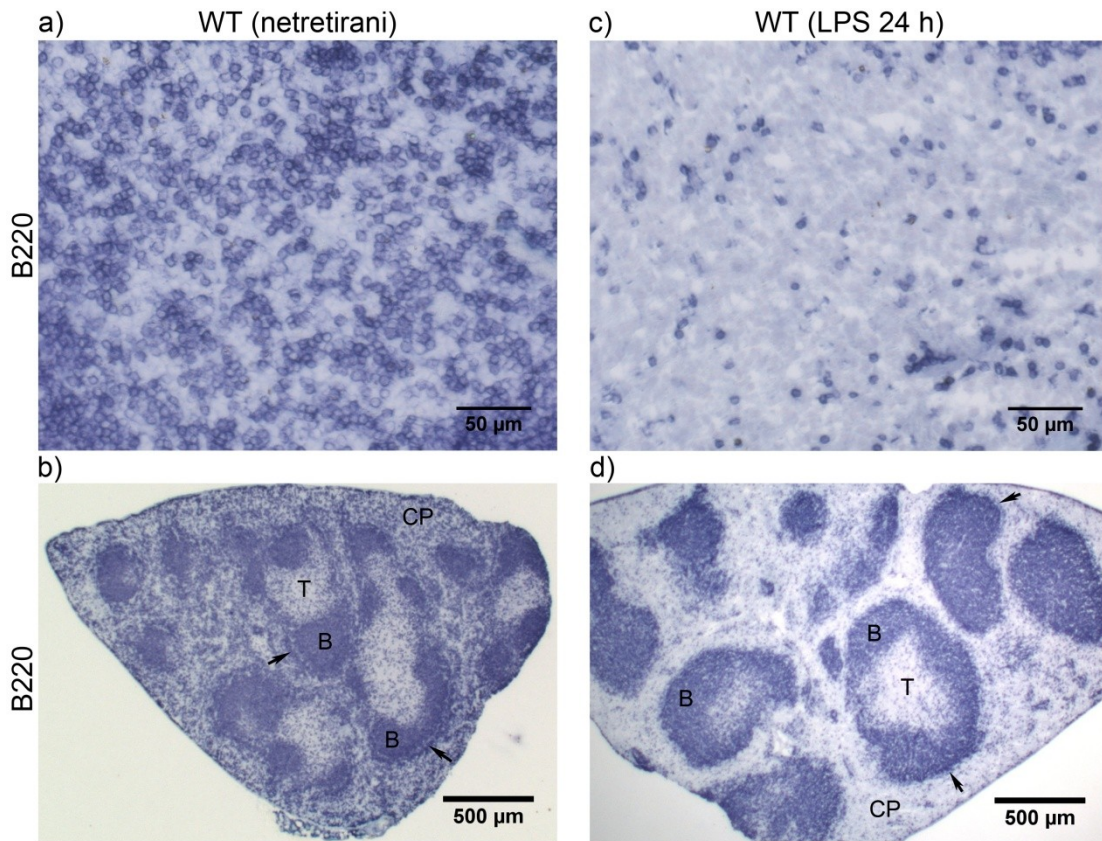
## 4. REZULTATI

### 4.1. Lipopolisaharid indukuje značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša

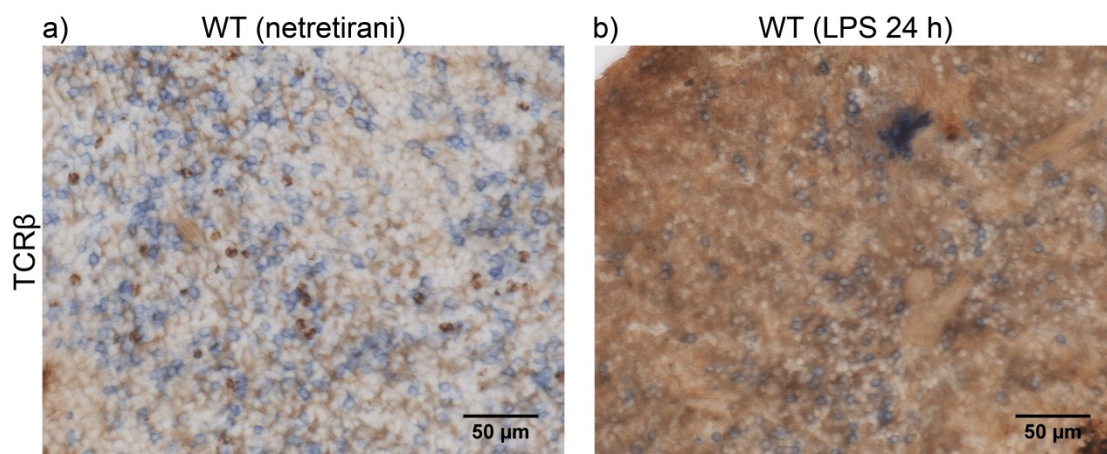
Najpre smo sproveli morfolometrijsku analizu kako bismo odredili broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša.

U crvenoj pulpi slezine netretiranih *wild-type* miševa uočili smo veliki broj gusto raspoređenih B limfocita (Slika 1a i b). U poređenju sa brojem B limfocita (Slika 1a), broj T limfocita u crvenoj pulpi bio je statistički visoko značajno manji (Slika 2a, Grafikon 1).

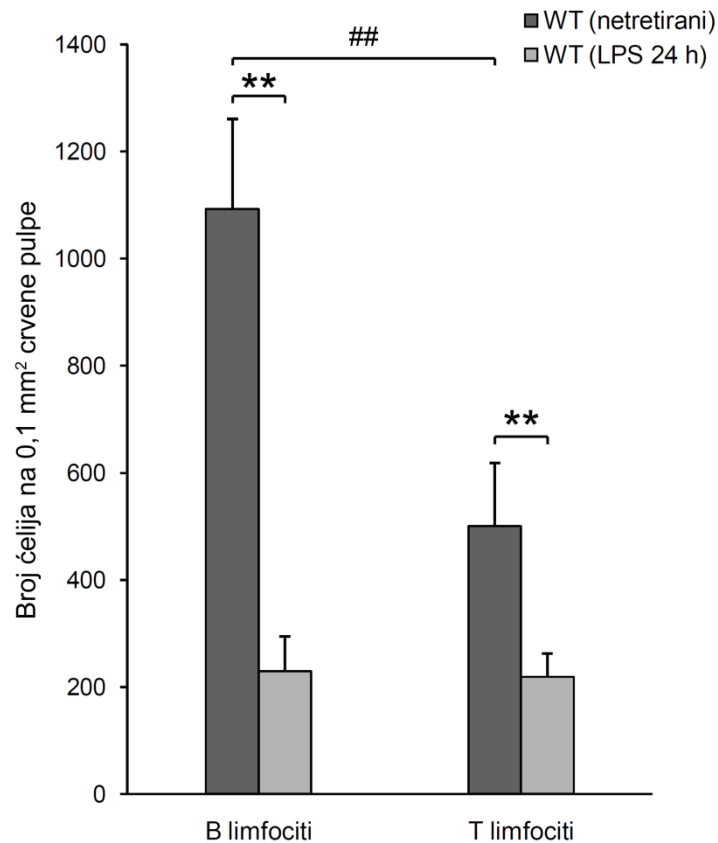
Dvadeset četiri časa nakon sistemske administracije LPS-a, uočili smo statistički visoko značajno smanjenje broja B (Slika 1c i d, Grafikon 1) i T limfocita (Slika 2b, Grafikon 1) u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa.



Slika 1. Lipopolisaharid indukuje smanjenje broja B limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa. Slezina netretiranog *wild-type* miša (a i b) i *wild-type* miša 24 h nakon tretmana LPS-om (c i d). (a) i (c) su fokusirani na region crvene pulpe. Kriostatski isečci su imunohistohemijski obojeni na B limfocite (plavo; B220<sup>+</sup>). CP = crvena pulpa; B = B ćelijska zona; T = T ćelijska zona; WT = *wild-type*; LPS = lipopolisaharid.



Slika 2. Lipopolisaharid indukuje smanjenje broja T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa. Slezina netretiranog *wild-type* miša (a) i *wild-type* miša 24 h nakon tretmana LPS-om (b). (a) i (b) su fokusirani na region crvene pulpe. Kriostatski isečci su imunohistohemijski obojeni na T limfocite (plavo; TCRβ<sup>+</sup>). WT = *wild-type*; LPS = lipopolisaharid.



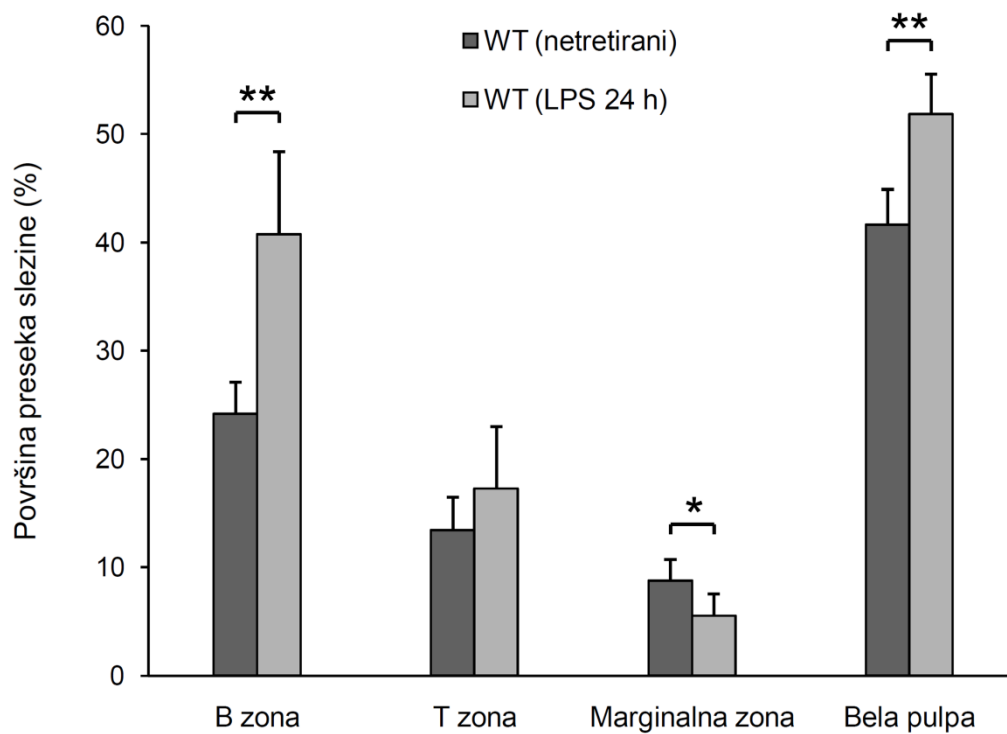
Grafikon 1. Broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine netretiranih *wild-type* miševa i *wild-type* miševa 24 h nakon tretmana LPS-om. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). \*\* $p < 0,01$  *wild-type* miševi tretirani LPS-om u poređenju sa netretiranim *wild-type* miševima; ## $p < 0,01$  broj B limfocita kod netretiranih *wild-type* miševa u poređenju sa brojem T limfocita kod netretiranih *wild-type* miševa. WT = *wild-type*; LPS = lipopolisaharid.

#### **4.2. Lipopolisaharid izaziva promene u procentualnoj zastupljenosti B ćelijske zone, marginalne zone i bele pulpe slezine miša**

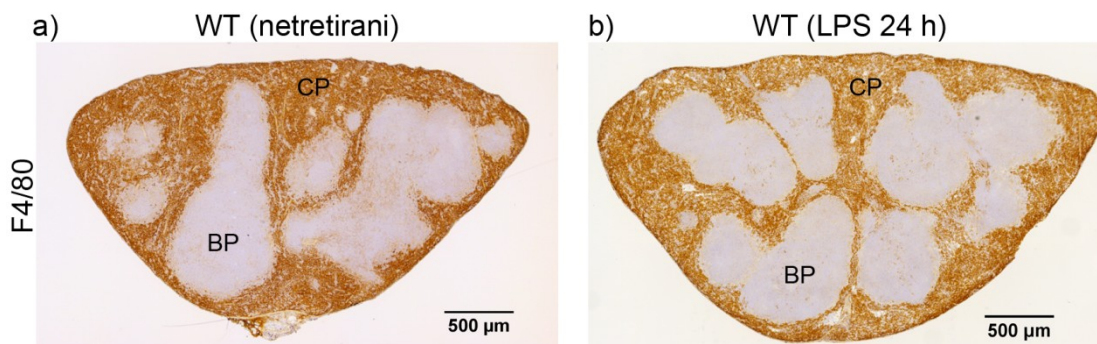
Potom smo želeli da ispitamo uticaj sistemske administracije LPS-a na veličinu različitih odeljaka slezine miša.

Kod netretiranih *wild-type* miševa, bela pulpa bila je smeštena u centralnim delovima slezine, dok je crvena pulpa zauzimala perifernu poziciju (Slika 1b). Unutar bele pulpe nalazili su se dobro razvijeni limfni folikuli, prikazani bojenjem na B220, koji su predstavljali B ćelijsku zonu (Slika 1b). Između limfnih folikula i crvene pulpe, jasno se uočavala marginalna zona sastavljena od nekoliko redova B limfocita (Slika 1b). Morfometrijska analiza je pokazala da B ćelijska zona zauzima približno 24%, a marginalna zona 9% ukupne površine mišje slezine (Grafikon 2). Na isečcima slezine obojenim na TCR $\beta$ , jasno se razlikovala se T ćelijska zona, gusto naseljena T limfocitima, koja je zauzimala približno 13% ukupne površine slezine (Grafikon 2). Procentualna zastupljenost bele pulpe, izmerena na isečcima slezine obojenim na F4/80 (Slika 3a), iznosila je približno 42% (Grafikon 2).

Kod *wild-type* miševa tretiranih LPS-om, 24 h nakon tretmana, uočeno je statistički visoko značajno povećanje procentualne zastupljenosti B ćelijske zone (Slika 1d, Grafikon 2) i bele pulpe (Slika 3b, Grafikon 2) u poređenju sa netretiranim *wild-type* miševima (Slika 1b i 3a, Grafikon 2). S druge strane, marginalna zona bila je relativno siromašna B limfocitima i nije se mogla lako raspoznati (Slika 1d). Morfometrijska analiza je pokazala statistički značajno smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone 24 h nakon sistemske administracije LPS-a (Grafikon 2). Međutim, procentualna zastupljenost T ćelijske zone u odnosu na ukupnu površinu slezine miša ostala je nepromenjena 24 h nakon tretmana (Grafikon 2).



Grafikon 2. Procentualna zastupljenost pojedinih zona u odnosu na ukupnu površinu preseka slezine netretiranih *wild-type* miševa i *wild-type* miševa 24 h nakon tretmana LPS-om. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  *wild-type* miševi tretirani LPS-om u poređenju sa netretiranim *wild-type* miševima. WT = *wild-type*; LPS = lipopolisaharid.



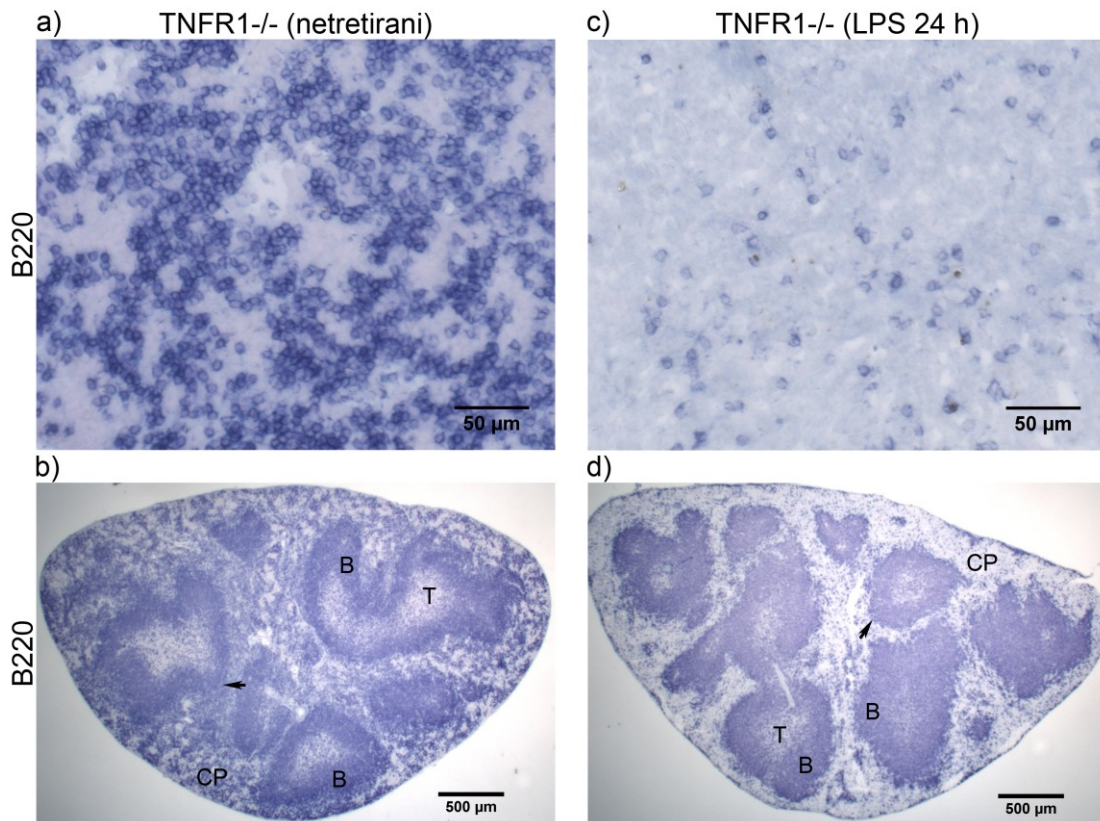
Slika 3. Lipopolisaharid indukuje povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe u slezini *wild-type* miševa. Slezina netretiranog *wild-type* miša (a) i *wild-type* miša 24 h nakon tretmana LPS-om (b). Kriostatski isečci su imunohistohemijski obojeni na makrofage crvene pulpe slezine (braon; F4/80<sup>+</sup>). Regione bele pulpe karakteriše odsustvo bojenja na F4/80. BP = bela pulpa; CP = crvena pulpa; WT = *wild-type*; LPS = lipopolisaharid.



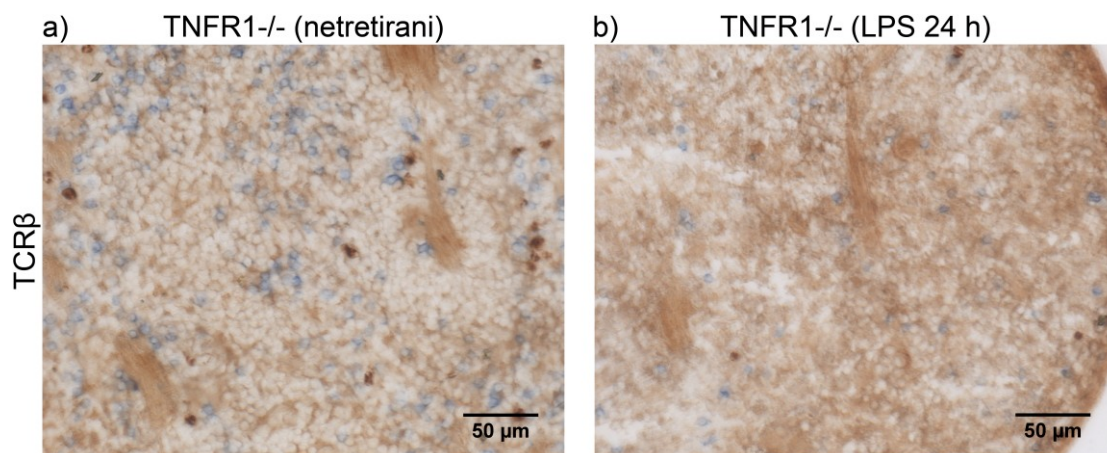
### 4.3. Lipopolisaharidom indukovano smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša nezavisno je od TNFR1 signalnog puta

Dobro je poznato da receptor TNFR1 ima važnu ulogu u imunskom odgovoru na LPS, kao i da su TNFR1<sup>-/-</sup> miševi rezistentni endotoksični šok (Pfeffer i sar., 1993). Stoga smo želeli da ispitamo uticaj TNFR1 signalnog puta na smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine 24 h nakon tretmana LPS-om.

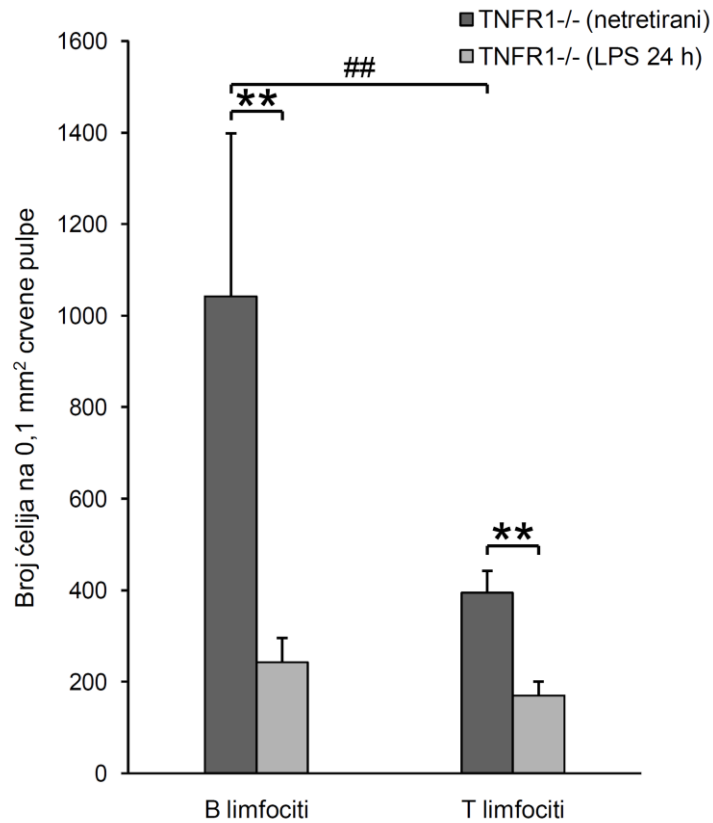
Izvršena je morfometrijska analiza tkivnih isečaka slezine netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa, kao i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa 24 h nakon tretmana LPS-om. U slezini netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa, crvena pulpa je bila gusto naseljena B limfocitima (Slika 4a i b). Broj T limfocita u crvenoj pulpi (Slika 5a) bio je statistički visoko značajno manji (Grafikon 3) u odnosu na broj B limfocita (Slika 4a). Dvadeset četiri časa nakon sistemske administracije LPS-a, u slezini TNFR1<sup>-/-</sup> miševa uočene su identične promene kao i kod *wild-type* miševa tretiranih LPS-om. Morfometrijskom analizom utvrđeno je statistički visoko značajno smanjenje broja B (Slika 4c i d, Grafikon 3) i T limfocita (Slika 5b, Grafikon 3) u crvenoj pulpi slezine 24 h nakon tretmana LPS-om. Potom smo analizirali uticaj LPS-a na dimenzije različitih odeljaka slezine TNFR1<sup>-/-</sup> miševa. Kao što je prethodno opisano (Pasparakis i sar., 1996a; Pasparakis i sar., 1996b), u slezini netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa nedostajali su organizovani primarni limfni folikuli (Slika 4b). Unutar bele pulpe, B ćelijska zona je predstavljala kontinuirani omotač koji je okruživao centralno postavljenu T ćelijsku zonu (Slika 4b). Dvadeset četiri časa nakon tretmana LPS-om, u slezini TNFR1<sup>-/-</sup> miševa, uočeno je statistički visoko značajno povećanje procentualne zastupljenosti B ćeljske zone (Slika 4d, Grafikon 4) i bele pulpe (Slika 6b, Grafikon 4) u poređenju sa intaktnim TNFR1<sup>-/-</sup> miševima (Slika Slika 4b i 6a). Sa druge strane, procenat marginalne zone bio je statistički visoko značajno manji (Slika 4d, Grafikon 4). Procenat T ćelijske zone, kao i kod *wild-type* miševa, ostao je nepromenjen nakon tretmana (Grafikon 4).



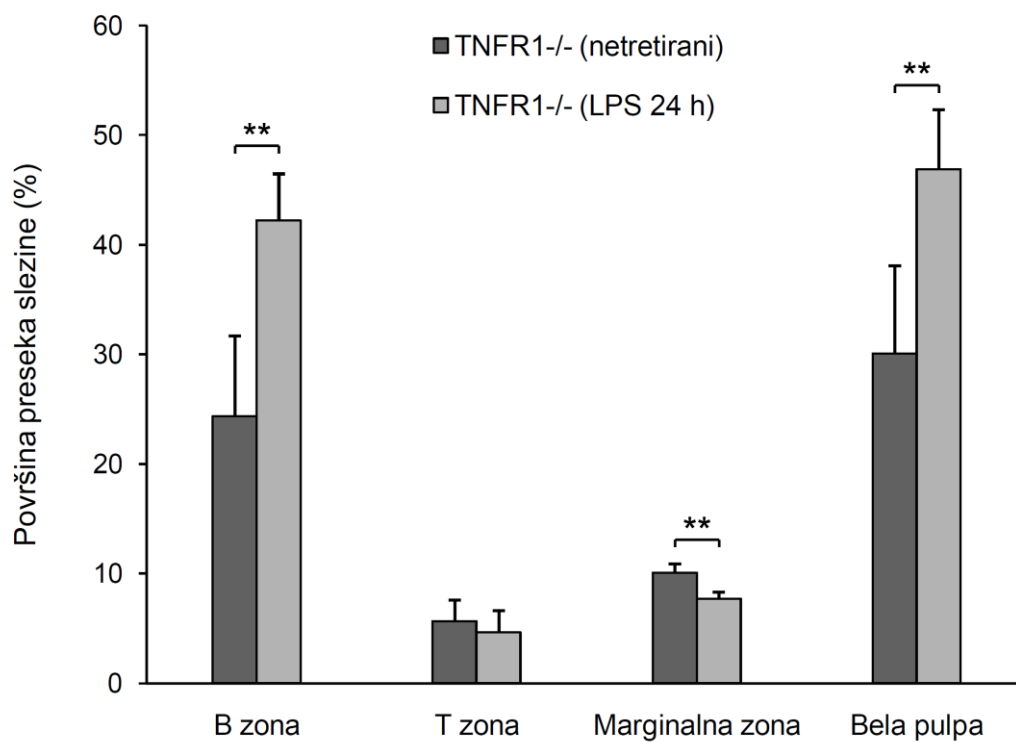
Slika 4. Lipopolisaharid indukuje smanjenje broja B limfocita u crvenoj pulpi slezine  $TNFR1^{-/-}$  miševa. Slezina netretiranog  $TNFR1^{-/-}$  miša (a i b) i  $TNFR1^{-/-}$  miša 24 h nakon tretmana LPS-om (c i d). (a) i (c) su fokusirani na region crvene pulpe. Kristatski isečci su imunohistohemijski obojeni na B limfocite (plavo;  $B220^{+}$ ). CP = crvena pulpa; B = B ćelijska zona; T = T ćelijska zona; strelice = marginalna zona;  $TNFR1^{-/-}$  = engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*; LPS = lipopolisaharid.



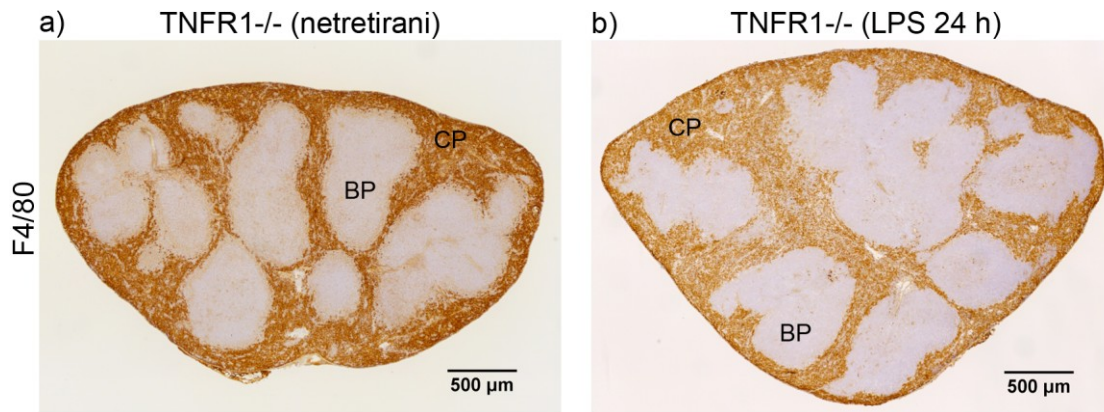
Slika 5. Lipopolisaharid indukuje smanjenje broja T limfocita u crvenoj pulpi slezine  $TNFR1^{-/-}$  miševa. Slezina netretiranog  $TNFR1^{-/-}$  miša (a) i  $TNFR1^{-/-}$  miša 24 h nakon tretmana LPS-om (b). (a) i (b) su fokusirani na region crvene pulpe. Kriostatski isečci su imunohistohemijski obojeni na T limfocite (plavo;  $TCR\beta^{+}$ );  $TNFR1^{-/-}$  = engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*; LPS = lipopolisaharid.



Grafikon 3. Broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa 24 h nakon tretmana LPS-om. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). \*\* $p < 0,01$  TNFR1<sup>-/-</sup> miševi tretirani LPS-om u poređenju sa netretiranim TNFR1<sup>-/-</sup> miševima; ## $p < 0,01$  broj B limfocita kod netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa u poređenju sa brojem T limfocita kod netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa. TNFR1<sup>-/-</sup> = engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*; LPS = lipopolisaharid.



Grafikon 4. Procentualna zastupljenost pojedinih zona u odnosu na ukupnu površinu preseka slezine netretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa i TNFR1<sup>-/-</sup> miševa 24 h nakon tretmana LPS-om. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). \*\* $p < 0,01$  TNFR1<sup>-/-</sup> miševi tretirani LPS-om u poređenju sa netretiranim TNFR1<sup>-/-</sup> miševima. TNFR1<sup>-/-</sup> = engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*; LPS = lipopolisaharid.



Slika 6. Lipopolisaharid indukuje povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe u slezini  $TNFR1^{-/-}$  miševa. Slezina netretiranog  $TNFR1^{-/-}$  miša (a) i  $TNFR1^{-/-}$  miša 24 h nakon tretmana LPS-om (b). Kriostatski isečci su imunohistohemijski obojeni na makrofage crvene pulpe slezine (braon;  $F4/80^{+}$ ). Regione bele pulpe karakteriše odsustvo bojenja na  $F4/80$ . BP = bela pulpa; CP = crvena pulpa;  $TNFR1^{-/-}$  = engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*; LPS = lipopolisaharid.

#### **4.4. Sistemska administracija lipopolisaharida izaziva rane promene u ekspresiji citokina i hemokina u slezini miša**

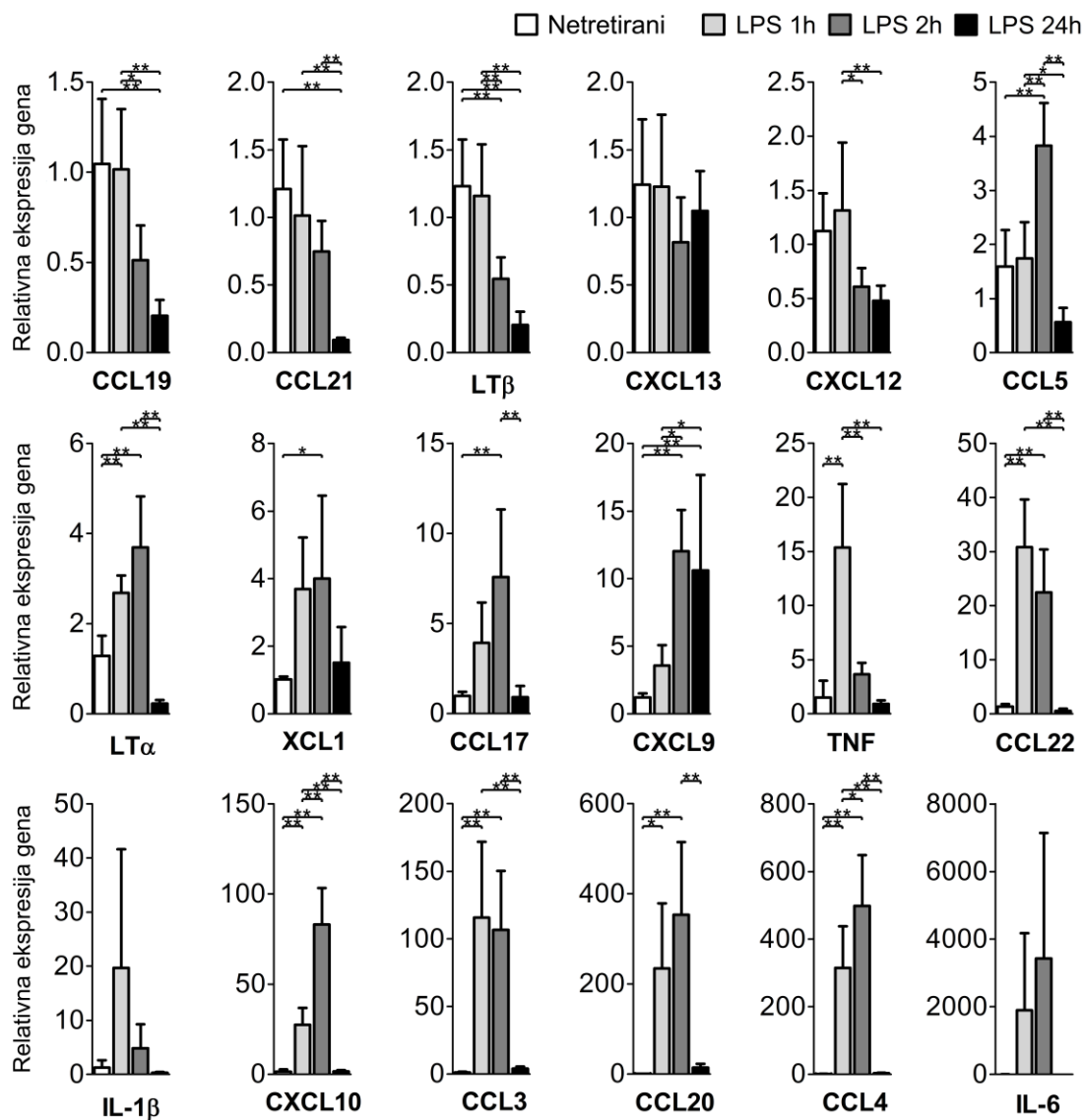
Imajući u vidu da LPS predstavlja snažan ligand urođene imunosti, koja se aktivira veoma brzo, želeli smo da ispitamo uticaj LPS-a na ekspresiju gena za homeostatske i proinflamatorne citokine u mišjoj slezini 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana. Metodom kvantitativnog *real-time* PCR-a, detektovana je povećana ekspresija gena 11 hemokina i proinflamatornih citokina: XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, TNF i LT $\alpha$  (Grafikon 5).

Dva sata nakon sistemske administracije LPS-a, uočeno je značajno povećanje nivoa iRNK za hemokin XCL1, za koga je poznato da specifično privlači subpopulaciju dendritskih ćelija koja eksprimira receptor XCR1 (Dorner i sar., 2009; Lei i Takahama, 2012). Nivo ekspresije gena za LT $\alpha$  značajno je porastao 1 h i 2 h nakon intravenske administracije LPS-a, dok je 24 h nakon tretmana nivo ovog citokina značajno smanjen. S druge strane, nivo ekspresije gena za LT $\beta$  značajno je opao 2 h i 24 h nakon tretmana. Intravenski ubrizgan LPS takođe je izazvao značajno povećanje ekspresije proinflamatornog citokina TNF, kao i "inflamatornih" hemokina (CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 and CCL5), koji se ekspimiraju tokom inflamatornog procesa i mogu imati ulogu u migraciji T limfocita (Groom i Luster, 2011a; Groom i Luster, 2011b; Moser and Loetscher, 2001). Sistemska administracija LPS-a izazvala je i značajno povećanje nivoa iRNK za CCL17 i CCL22, koji dele zajednički receptor CCR4, predominantno ekspimiran od strane T limfocita (Yoshie i Matsushima, 2015). Hemokin CXCL9 ostao je visoko ekspimiran i 24 h nakon tretmana LPS-om. S druge strane, nivoi CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17 i CCL22, značajno su se smanjili 24 h nakon tretmana, u poređenju s nivoima detektovanim 2 h nakon tretmana. Pored toga, detektovana je i smanjena ekspresija proinflamatornog citokina TNF 24 h nakon tretmana u odnosu na nivo ekspresije 1 h nakon tretmana.

Glavni homeostatski hemokini koji su odgovorni za migraciju i naseljavanje limfocita u različite odeljke bele pulpe su CCL19, CCL21 i CXCL13 (Schulz i sar., 2016). Dok CCL19 i CCL21 regulišu migraciju T limfocita u T ćelijsku zonu, hemokin CXCL13 privlači B limfocite u B ćelijsku zonu bele pulpe (Schulz i sar., 2016). U okviru naše studije, nivo ekspresije gena za homeostatski hemokin CXCL13 ostao je

nepromenjen nakon tretmana LPS-om. Dodatno, nivoi iRNK za homeostatske hemokine CXCL12 i CCL19 značajno su se smanjili 2 h i 24 h nakon intravenske injekcije LPS-a. Homeostatski hemokin CCL21 takođe je pokazao značajno smanjen nivo iRNK 24 h nakon tretmana LPS-om. S obzirom na to da je naša morfometrijska analiza pokazala dramatično smanjenje broja B limfocita u crvenoj pulpi slezine 24 h nakon tretmana LPS-om, ostalo je interesantno pitanje koji bi hemokin mogao biti odgovoran za kretanje B limfocita. Nakon tretmana LPS-om, uočeno je značajno povećanje nivoa iRNK za CCL20 (približno  $230\times$  i  $350\times$  1 h i 2 h nakon tretmana, respektivno), praćeno značajnim smanjenjem nivoa iRNK 24 h nakon tretmana. S obzirom na to da smo uočili nepromenjene ili čak smanjene nivoe iRNK za homeostatke hemokine koji regulišu migraciju B limfocita, CCL20 se isticao kao potencijalni kandidat koji bi mogao imati ulogu u mobilisanju B limfocita iz crvene pulpe nakon tretmana LPS-om.

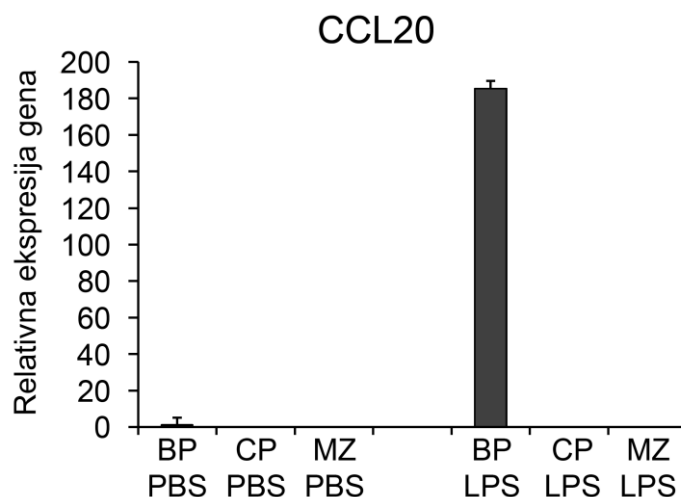




Grafikon 5. Lipopolisaharid izaziva rane promene u ekspresiji gena za citokine u slezini *wild-type* miševa. Relativna promena ekspresije gena za citokine određivana je metodom kvantitativnog *real-time* PCR-a. Korišćene su slezine netretiranih miševa, kao i miševa žrtvovanih 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana LPS-om. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . LPS = lipopolisaharid.

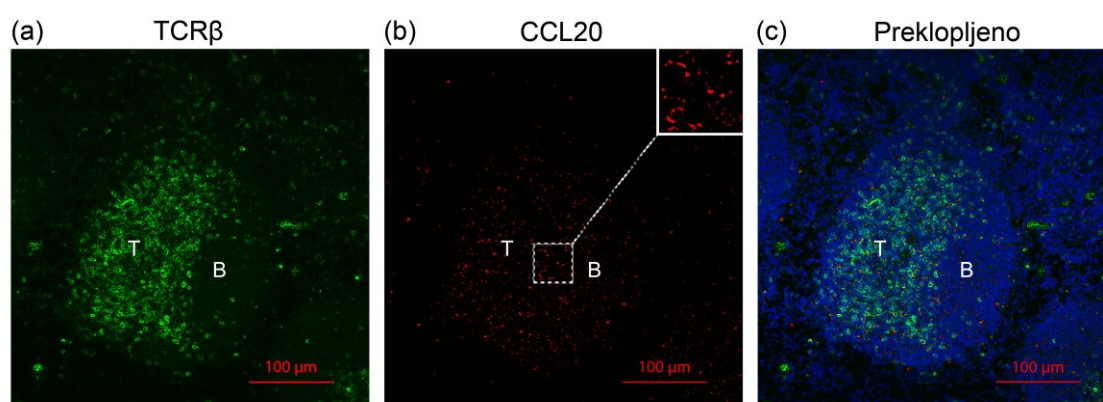
#### 4.5. Lipopolisaharid indukuje produkciju hemokina CCL20 u beloj pulpi slezine miša

Sledeći cilj našeg istraživanja bio je da utvrdimo koji odeljak mišje slezine ima ulogu u produkciji CCL20 koja je indukovana LPS-om. Dva sata nakon sistemske administracije LPS-a, analizirali smo ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine (beloj pulpi, crvenoj pulpi i marginalnoj zoni), dobijenih primenom laserske mikrodisekcije. Metodom kvantitativnog *real-time* PCR-a utvrđeno je da LPS indukuje produkciju CCL20 u beloj pulpi slezine miša, dok u marginalnoj zoni i crvenoj pulpi ovaj hemokin nije detektovan (Grafikon 6).



Grafikon 6. LPS indukuje produkciju CCL20 u beloj pulpi slezine miša. Relativna promena ekspresije gena za hemokin CCL20 određivana je u beloj pulpi (BP), crvenoj pulpi (CP) i marginalnoj zoni (MZ) metodom kvantitativnog *real-time* PCR-a. Eksperimentalnim miševima je ubrizgan LPS i žrtvovani su 2 h nakon tretmana. Podaci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $\bar{x} \pm SD$ ). Trake sa greškama (engl. *error bars*) ukazuju na tehničke replikate. PBS = fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*); LPS = lipopolisaharid.

Konačni cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo lokalizaciju CCL20-produkujućih ćelija u beloj pulpi slezine miša, 2 h nakon sistemske administracije LPS-a. Imunofluorescentna analiza je pokazala da su CCL20-produkujuće ćelije lokalizovane u T ćelijskoj zoni (PALS-u) (Slika 7). Pored toga, uočen je i izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija koje su ravnomerno raspoređene u B ćelijskoj zoni (Slika 7).



Slika 7. Lokalizacija CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša. CCL20 ćelije smeštene su u PALS-u. Izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno je raspoređen u B ćelijskoj zoni. Imunofluorescentna analiza kriostatskog isečka slezine obojenog na (a) T limfocite (zeleno) i (b) CCL20 (crveno), 2 h nakon tretmana LPS-om. Umetnuti deo u gornjem desnom uglu slike (b) predstavlja uvećani deo slike (b), koji je prikazan u kvadratu sa isprekidanim linijama. (c) Preklopljena slika koja obuhvata tri kanala: plavi (bojenje nukleusa DAPI fluorescentnom bojom), zeleni (T limfociti) i crveni (CCL20). B = B ćelijska zona; T = T ćelijska zona.

## 5. DISKUSIJA

U okviru našeg istraživanja ispitivali smo uticaj intravenski ubrizganog LPS-a na populaciju B i T limfocita crvene pulpe slezine miša, kao i na strukturnu organizaciju tkivnih odeljaka slezine. Naš dodatni cilj bio je ispitivanje molekularnih karakteristika slezine nakon sistemske administracije LPS-a.

Naša studija je potvrdila nalaze prethodnih istraživanja da crvena pulpa slezine *wild-type* miševa sadrži veliki broj B i T limfocita (Nolte i sar., 2000), kao i da je broj B limfocita u crvenoj pulpi veći u odnosu na broj T limfocita (Nolte i sar., 2000). Dvadeset četiri časa nakon intravenske injekcije LPS-a (izazivanja stanja nalik sepsi/sistemske inflamaciji) uočili smo značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa. Ove promene bile su praćene značajnim promenama u strukturnoj organizaciji tkiva slezine. Dvadeset i četiri časa nakon sistemske administracije LPS-a uočeno je povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe i B ćelijske zone, kao i smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone (Groeneveld, 1985). Imajući u vidu sve opisane promene, moglo bi se zaključiti da intravenski ubrizgan LPS izaziva premeštanje B limfocita iz crvene pulpe i marginalne zone (Groeneveld, 1985) u B ćelijsku zonu bele pulpe slezine. S druge strane, naše istraživanje je pokazalo da smanjenje broja T limfocita u crvenoj pulpi slezine 24 h nakon tretmana LPS-om nije praćeno povećanjem procentualne zastupljenosti T ćelijske zone. Rezultati morfometrijske analize su pokazali da procentualna zastupljenost T ćelijske zone ostaje nepromenjena 24 h nakon tretmana. Stoga ostaje nejasno kojim putem T limfociti napuštaju crvenu pulpu i koja je njihova konačna odrednica. U istraživanju koje je sprovedeno na pacovima (Semaeva i sar., 2010), uočen je povećan efluks T limfocita, kao i smanjen efluks B limfocita iz slezine rano nakon tretmana LPS-om.

Sledeći cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo molekularne mehanizme koji bi mogli biti uključeni u kontrolu celularnih i strukturnih promena koje se uočavaju nakon tretmana LPS-om.

Dosadašnje studije su pokazale da ključnu ulogu u imunskom odgovoru na LPS ima receptor TNFR1, kao i da TNFR1<sup>-/-</sup> miševi pokazuju rezistenciju na endotoksični

šok čak i nakon tretmana letalnim dozama LPS-a (Pfeffer i sar., 1993). Stoga smo u okviru našeg istraživanja ispitivali uticaj sistemske administracije LPS-a na strukturne i celularne promene slezine TNFR1<sup>-/-</sup> miševa. Morfometrijska analiza slezine TNFR1<sup>-/-</sup> miševa je pokazala da crvena pulpa, kao i kod *wild-type* miševa, sadrži veliki broj B i T limfocita, kao i da je broj B limfocita u crvenoj pulpi veći u odnosu na broj T limfocita. Strukturna organizacija slezine TNFR1<sup>-/-</sup> miševa bila je izmenjena u skladu sa nalazima prethodnih istraživanja (Pasparakis i sar., 1996a; Pasparakis i sar., 1996b). B ćelijska zona predstavljala je homogeni omotač koji je okruživao T ćelijsku zonu, a organizovani limfni folikuli nisu bili prisutni (Pasparakis i sar., 1996a; Pasparakis i sar., 1996b). Dvadeset četiri časa nakon sistemske administracije LPS-a, u slezini TNFR1<sup>-/-</sup> miševa uočene su identične promene kao i kod tretiranih *wild-type* miševa. Broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine bio je značajno manji 24 h nakon tretmana. Stoga se može zaključiti da masivna relokacija B i T limfocita iz crvene pulpe nakon tretmana LPS-om ne zavisi od TNFR1 signalnog puta. Dodatno, kao i kod tretiranih *wild-type* miševa, u slezini tretiranih TNFR1<sup>-/-</sup> miševa uočeno je značajno povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe i B ćelijske zone, dok je procentualna zastupljenost marginalne zone bila značajno smanjena. S druge strane, procenat T ćelijske zone u slezini TNFR1<sup>-/-</sup> miševa ostao je nepromenjen nakon tretmana. Imajući u vidu da je 24 h nakon sistemske administracije LPS-a i kod *wild-type* i kod TNFR1<sup>-/-</sup> miševa uočeno povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe i B ćelijske zone, smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone i nepromenjen procentualni udeo T ćelijske zone, može se pretpostaviti da se bela pulpa povećava zahvaljujući uvećanju B ćelijske zone.

Hemokini (hemotaktični citokini) čine veliku porodicu citokina male molekulske mase (Griffith i sar., 2014; Schulz i sar., 2016; Palomino i Marti, 2015). Zajedno sa hemokinskim receptorima, hemokini regulišu migraciju i naseljavanje ćelija imunskog sistema (Baggiolini, 1998; Griffith i sar., 2014; Lunney, 1998; Moser i Loetscher, 2001; Sallusto i Baggiolini, 2008; Schulz i sar., 2016; Sokol i Luster, 2015). Homeostatski hemokini odgovorni su za normalno kretanje i pozicioniranje ćelija tokom razvoja, kao i za ćelijski saobraćaj u fiziološkim uslovima (Cardona i sar., 2013; Hasegawa i Fujita, 2001; Schulz i sar., 2016). Sa druge strane, produkcija inflamatornih hemokina može biti indukovana tokom imunskog odgovora na mestu infekcije (Cardona i sar., 2013;

Charo i Ransohoff, 2006; Palomino i Marti, 2015; Turner i sar., 2014). Fiziološki značaj hemokina proizilazi iz njihove specifičnosti – odgovarajući članovi hemokinske familije imaju ulogu u migraciji dobro definisanih podtipova leukocita (Bono i sar., 2007; Ebert i sar., 2005; Kim i Broxmeyer, 1999; Palomino i Marti, 2015; Yoshie, 2000). Rezultati našeg istraživanja ukazali su na masivnu relokaciju B i T limfocita iz crvene pulpe slezine 24 h nakon sistemske administracije LPS-a. Kako bismo ispitali potencijalne molekularne mehanizme koji bi mogli biti odgovorni za nastanak ovih promena, analizirali smo ekspresiju gena za homeostatske i "inflamatorne" hemokine, kao i za proinflamatorne citokine u slezini *wild-type* miševa 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana LPS-om. Veoma rano nakon intravenske administracije LPS-a, detektovali smo višu ekspresiju iRNK za 11 hemokina i proinflamatornih citokina (XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, TNF i LT $\alpha$ ) u slezini miša.

U okviru naše studije, 2 h nakon tretmana LPS-om, uočili smo višu ekspresiju hemokina XCL1 (engl. *limphotactin*), koji se proizvodi tokom infekcije i inflamacije od strane različitih ćelijskih tipova kao što su aktivirani CD8<sup>+</sup> T limfociti, CD4<sup>+</sup> T limfociti, NK ćelije, NKT ćelije,  $\gamma\delta$  T limfociti (Lei i Takahama, 2012). XCL1 pripada XC subfamiliji hemokina (Griffith i sar., 2014; Kelner i sar., 1994; Schulz i sar., 2016.), a njegov jedini poznati receptor je XCR1 (Lei i Takahama, 2012; Yoshida i sar., 1998). Kod miševa, hemokinski receptor XCR1 selektivno je eksprimiran od strane CD8<sup>+</sup> subpopulacije dendritskih ćelija (Dorner i sar., 2009). Približno 70-85% CD8<sup>+</sup> dendritskih ćelija u mišjoj slezini eksprimira receptor XCR1 (Dorner i sar., 2009). Istraživanja su pokazala da su CD8<sup>+</sup> dendritske ćelije lokalizovane u crvenoj pulpi, marginalnoj zoni i T ćelijskoj zoni (Dorner i sar., 2009).

Lipopolisaharid je snažan aktivator urođenog imunskog odgovora posredstvom *Toll-like* receptora (Alexander i Rietschel, 2001; Beutler, 2000; Raetz i Whitfield, 2002; Takeda i Akira, 2005; Triantafilou i Triantafilou, 2002). Prepoznavanje LPS-a pokreće intracelularne signalne puteve koji dovode do transkripcije gena i oslobađanja proinflamatornih medijatora (Heumann i Roger, 2002; Kawai i sar., 1999; Rhee, 2014; Ulevitch i Tobias, 1995). Primarno, ovi medijatori pomažu odbrambenim sistemima domaćina koji učestvuju u eliminaciji bakterijske infekcije (Ulevitch i Tobias, 1995). Međutim, prekomerna produkcija istih ovih medijatora doprinosi nastanku septičnog

šoka (Ulevitch i Tobias, 1995). U odgovoru domaćina na LPS, značajnu ulogu imaju mononuklearni fagociti (monociti i makrofagi) (Loefering i Lennartz, 2002; Moore i sar., 1976; Rietschel i sar., 1994; Sweet i Hume, 1996). Makrofagi aktivirani LPS-om postaju metabolički aktivni i osim što stvaraju intracelularne depoe slobodnih kiseoničkih radikala i drugih mikrobicidnih agenasa, proizvode proinflatorne medijatore (Hiemstra i sar., 1993; Mayer i Spitzer, 1991; Roit, 1994). Međutim, pored mononuklearnih fagocita, i drugi ćelijski tipovi imaju ulogu u produkciji proinflatornih medijatora nakon tretmana LPS-om (Salkovski i sar., 1995). Jedan od ključnih medijatora koji se proizvodi u odgovoru na stimulaciju LPS-om je TNF (Cairns, 2000; Giroir i sar., 1992; Morrison i Ryan, 1987; Rietschel i sar., 1994; Van Amersfoort i sar., 2003). TNF je proinflatorni citokin koji se među prvima oslobađa nakon izlaganja LPS-u (Salkovski i sar., 1995; Van Amersfoort i sar., 2003). Kao što je očekivano, 1 h nakon tretmana LPS-om, u slezini miša uočili smo značajno više iRNK proinflatornog citokina TNF. Ovakav nalaz u skladu je sa rezultatima nedavnog istraživanja u okviru koga je detektovana povećana koncentracija TNF u slezini miša 1 h nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Hasegawa-Ishii i sar., 2016). Dodatno, u okviru studije koja je sprovedena na pacovima (Semaeva i sar., 2010), uočeno je značajno povećanje koncentracije proinflatornih (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) i anti-inflatornih citokina (IL-10) u serumu i limfi koja potiče iz slezine u prva tri sata nakon intravenske injekcije LPS-a. Pretpostavlja se da u odgovoru na LPS dolazi do lokalne produkcije proinflatornih i anti-inflatornih citokina unutar slezine, kao i da slezina na ovaj način snabdeva sistemsku cirkulaciju citokinima koji mogu da regulišu inflamatorni odgovor (Semaeva i sar., 2010). Dodatno, u studiji koja je sprovedena na pilićima, uočena je povećana ekspresija TNF i IL-6 u krvi i slezini 3 h nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Zhang i sar., 2017).

Rezultati naše studije takođe su pokazali da tretman LPS-om indukuje povećanu ekspresiju CCL3 (engl. *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$* ), CCL4 (engl. *macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$* ) i CCL5 (engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted, RANTES*). Ovakav nalaz u skladu je sa rezultatima istraživanja u okviru koga je detektovana povećana koncentracija CCL3 i CCL4 u slezini miša 1 h nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Hasegawa-Ishii i sar., 2016). CCL3, CCL4 i CCL5 spadaju u grupu "inflatornih" hemokina koji se

ekspimiraju tokom inflamatornog odgovora i koji imaju značajnu ulogu u regrutovanju efektorskih ćelija (Marques i sar., 2013; Menten i sar., 2002; Moser i Loetscher, 2001). Ova tri hemokina dele zajednički receptor CCR5, koji je ekspimiran na monocitima, makrofagima, Th1 limfocitima, NK ćelijama, Treg limfocitima, CD8<sup>+</sup> T limfocitima, dendritskim ćelijama i neutrofilima (Griffith et al., 2014; Luster, 1998). Dodatno, CCL3 i CCL5 imaju mogućnost vezivanja za receptor CCR1, koji je ekspimiran na monocitima, makrofagima, Th1 limfocitima, bazofilima, dendritskim ćelijama i neutrofilima (Griffith i sar., 2014; Luster, 1998). Pored toga, CCL5 se vezuje i za receptor CCR3 koga u najvećoj meri ekspimiraju eozinofili, a u manjoj meri bazofili i mastociti (Griffith i sar., 2014; Luster, 1998).

Glavni homeostatski hemokini koji regulišu naseljavanje T limfocita u T ćelijsku zonu bele pulpe slezine su CCL19 (engl. *Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine, ELC*; *macrophage inflammatory protein-3 beta, MIP-3β*) i CCL21 (engl. *secondary lymphoid-tissue chemokine, SLC*) (Griffith i sar., 2014; Fritz i Gommerman, 2011; Schulz, 2016). Ovi hemokini konstitutivno su ekspimirani od strane stromalnih ćelija smeštenih u T ćelijskoj zoni (Griffith i sar., 2014; Luther i sar., 2000; Mueller i Garmain, 2009). CCL19 i CCL21 dele zajednički receptor, CCR7, koga ekspimiraju naivni T limfociti, kao i podtip mirujućih memorijskih T limfocita, poznatih kao centralni memorijski T limfociti (T<sub>CM</sub>) (Sallusto i sar., 2000; Yoshida i sar., 1997; Yoshida i sar., 1998). U okviru naše studije, nivoi iRNK za hemokine CCL19 i CCL21 nisu bili povišeni nakon sistemske administracije LPS-a. Zapravo, relativna ekspresija gena za CCL19 bila je značajno smanjena 2 h i 24 h nakon tretmana. Takođe, nivo ekspresije gena za CCL21 bio je značajno smanjen 24 h nakon tretmana.

S druge strane, qRT-PCR analiza je pokazala značajno povećanje ekspresije iRNK za hemokine CCL17 i CCL22, koji bi mogli da uslovljavaju migraciju T limfocita u slezini. CCL17 (engl. *thymus- and activation-regulated chemokine, TARC*) i CCL22 (engl. *macrophage-derived chemokine, MDC*) predstavljaju ligande za hemokinski receptor CCR4 koji je predominantno ekspimiran od strane Th2 limfocita, Treg limfocita, Th17 limfocita i Th22 limfocita (Godiska i sar., 1997; Imai i sar., 1996; Imai i sar., 1998; Zlotnik i Yoshie, 2000; Yoshie i Matsushima, 2015). Istraživanja su pokazala da CCR4 ima važnu ulogu u endotoksičnom šoku koji je indukovano LPS-om,



kao i da CCR4<sup>-/-</sup> (CCR *knockout*) miševi pokazuju značajno smanjen mortalitet nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Chvatchko i sar., 2000; Ness i sar., 2006). U okviru naše studije, takođe smo detektovali povećanu ekspresiju iRNK za hemokine CXCL9 i CXCL10. CXCL9 (monokine induced by gamma-interferon, MIG) i CXCL10 (interferon-induced protein of 10 kDa, IP-10) dele zajednički hemokinski receptor CXCR3 (Loetscher i sar., 1996; Loetscher i sar., 1998; Lu i sar., 1999), koji je indukovan na naivnim T limfocitima veoma brzo nakon aktivacije (Groom i Luster, 2011a; Groom i Luster, 2011b). Receptor CXCR3 ostaje visoko ekspimiran na Th1 CD4<sup>+</sup> T limfocitima, efektorskim CD8<sup>+</sup> T limfocitima, NK ćelijama i NKT ćelijama (Groom i Luster, 2011a; Groom i Luster, 2011b). Kod miševa, samo aktivirani, ali ne i mirujući, B limfociti se boje antitelima na receptor CXCR3 (Bowman i sar., 2000; Park i sar., 2002). Park i sar. (2002) su pokazali da je za odgovor na CXCL9 glodara potrebno najmanje četiri dana aktivacije B limfocita *in vitro*.

Glavni homeostatski hemokin koji u bazalnom stanju reguliše usmeravanje i naseljavanje B limfocita u B ćelijsku zonu bele pulpe slezine je CXCL13 (engl. *B lymphocyte chemoattractant, BLC; B cell-attracting chemokine-1, BCA-1*) (Griffith i sar., 2014; Gunn i sar., 1998; den Haan i sar., 2012; Kim i Broxmeyer, 1999; Schulz et al., 2016). Ovaj hemokin, koji se predominantno proizvodi u B ćelijskoj zoni, privlači B limfocite koji ekspimiraju receptor CXCR5 (engl. *Burkitt's lymphoma receptor 1, BLR-1*) (Cyster i sar., 2000; Förster i sar., 1996). Smatra se da su folikulske dendritske ćelije glavni ćelijski izvor ovog hemokina u sekundarnim limfatičnim organima (Aguzzi i sar., 2014; Fritz i Gommerman, 2011; Murphy i Weaver, 2016; Mueller i Garmain, 2009; Vermi i sar., 2008). U našoj studiji, ekspresija iRNK za hemokin CXCL13 ostala je nepromenjena nakon sistemske administracije LPS-a. S druge strane, 1 h i 2 h nakon tretmana LPS-om, uočili smo značajno višu ekspresiju iRNK za hemokin CCL20 (engl. *liver and activation-regulated chemokine, LARC; macrophage inflammatory protein-3α, MIP-3α; Exodus-1*). Humani CCL20 otkriven je simultano 1997. godine od strane tri grupe autora (Hieshima i sar., 1997; Rossi i sar., 1997; Hromas i sar., 1997), a potom je identifikovana forma ovog hemokina kod glodara (Varona i sar., 1998). CCL20 je hemokin koji pokazuje dvojnju prirodu – pored njegove konstitutivne ekspresije, CCL20 spada i u inducibilne hemokine (Comerford i sar., 2010). Dobro je poznato da CCL20 i njegov receptor, CCR6 (Baba i sar., 1997), učestvuju u organizaciji intestinalnog

imunskog sistema (Comerford i sar., 2010, Schutyser i sar., 2003; Williams, 2006). Istraživanja su pokazala da CCL20 i CCR6 imaju značajnu ulogu u naseljavanju limfocita u intestinalnu sluznicu kako u homeostatskim, tako i u inflamatornim uslovima (Comerford i sar., 2010; Habtezion i sar., 2016; Kunkel i sar., 2003). Studije u okviru kojih je ispitivana ekspresija CCR6 na različitim tipovima ćelija, kao i ćelijski odgovor na CCL20 *in vitro*, ukazale su na potencijalnu ulogu ove hemokinske osovine u privlačenju nezrelih dendritskih ćelija, T limfocita, B limfocita i, u manjoj meri, neutrofilnih granulocita i NK ćelija (Schutyser i sar., 2003). U okviru našeg istraživanja, detektovali smo značajno povećanje ekspresije proinflamatornog citokina TNF, za koga je prethodno pokazano da stimuliše produkciju CCL20 od strane reumatoidnih sinovijalnih ćelija koje nalikuju fibroblastima, *in vitro* (Kawashiri i sar., 2009). Nedavna studija ukazala je na značaj hemokinske osovine CCL20 – CCR6 u migraciji B limfocita nakon tretmana sintetskim Nod1 agonistom, FK156, koji kod miševa indukuje urođeni imunski odgovor *in vivo* (Paradis i sar., 2014). Sistemska administracija FK156, izazvala je smanjenje broja B limfocita u krvi, kao i brzu akumulaciju B limfocita u slezini (Paradis i sar., 2014). Imajući u vidu blisku vezu između ćelijskih elemenata krvi i Bilrotovih putanja crvene pulpe slezine, rezultati pomenutog istraživanja (Paradis i sar., 2014) i rezultati naše studije kolektivno ukazuju na to da CCL20 može imati važnu ulogu u regulaciji migracije B limfocita u slezinu.

Sledeći cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo uticaj intravenski ubrizganog LPS-a na ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine (beloj pulpi, crvenoj pulpi i marginalnoj zoni) 2 h nakon tretmana. Primenom laserske mikrodisekcije i sledstvenog qRT-PCR-a, ustanovili smo da CCL20 indukovani LPS-om potiče iz bele pulpe slezine miša, dok u crvenoj pulpi i marginalnoj zoni ovaj hemokin nije detektovan. Potom smo ispitali i lokalizaciju CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša 2 h nakon tretmana. Imunofluorescentna analiza je pokazala da su CCL20-produkujuće ćelije predominantno smeštene u PALS-u, dok je izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija lokalizovan u B ćelijskoj zoni. Ostaje nejasno koji ćelijski tip ima ulogu u produkciji CCL20. Potencijalni kandidati mogu biti stromalne ćelije (Paradis i sar., 2014), CD4<sup>+</sup> T limfociti (Elgueta i sar., 2015) ili dendritske ćelije (Homey i sar., 2000).

Razultati naše studije ukazuju na strukturnu i funkcionalnu povezanost crvene i bele pulpe. Pored toga, naša studija nagoveštava da postoji fina integracija između urođenog i stečenog imunskog odgovora – LPS, prototip liganda urođene imunosti, indukuje brzu *in vivo* relokaciju B limfocita, koji predstavljaju centralne ćelije stečene imunosti. Ova fina saradnja između urođene i stečene imunosti, potvrđena je i u studiji u kojoj je pokazano da neutrofilni granulociti migriraju iz crvene pulpe u T ćelijsku zonu bele pulpe slezine nakon injekcije LPS-a (Kesteman i sar., 2008).

Studije u kojima se ispituje uticaj LPS-a na slezinu su od izuzetnog značaja, jer mogu da unaprede naše znanje o tome kako mikrobnii produkti oblikuju strukturu limfatičnih organa. Ovakav pristup, iako uprošćen, mogao bi da predstavlja model za sticanje uvida u osnovne aspekte interakcije mikrobnii produkata i imunskog sistema. Ovaj tip istraživanja potom se može proširiti na mnogo složenije sisteme u kojima bi se koristili drugi molekuli sa sličnim uticajem na imunski sistem, kao što su Pam2, Pam3, lipid A i retinoinska kiselina (Ma i Ross, 2009).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata našeg istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. LPS indukuje dramatično smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša, praćeno povećanjem procentualne zastupljenosti bele pulpe, koja se povećava zahvaljujući uvećanju B ćelijske zone. Opisane promene nezavisne su od TNFR1 signalnog puta.

2. Veoma rano nakon intravenske administracije, LPS indukuje povećanje ekspresije iRNK 11 hemokina i proinflamatornih citokina (XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, TNF and LT $\alpha$ ) u slezini miša.

3. Kao što je pokazano metodom laserske mikrodisekcije i sledstvenog qRT-PCR-a, LPS indukuje produkciju CCL20 u beloju pulpi slezine miša.

4. U slezini miševa tretiranih LPS-om CCL20-produkujuće ćelije smeštene su u PALS-u. Izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno je raspoređen u B ćelijskoj zoni.

## 7. LITERATURA

- Abernethy, N.J., Hay, J.B., 1992. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph: physiological considerations and molecular mechanisms. *Lymphology* 25, 1–30.
- Aguzzi, A., Kranich, J., Krautler, N.J., 2014. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* 35, 105–113.
- Allen, C.D., Okada, T., Cyster, J.G., 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Alexander, C., Rietschel, E.T., 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 7, 167–202.
- Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H., Yoshie, O., 1997. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J. Biol. Chem.* 272, 14893–14898.
- Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P.M., Nibbs, R., Nomiyama, H., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Rosenkilde, M.M., Rot, A., Sozzani, S., Thelen, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., 2013. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 66, 1–79.
- Baggiolini, M., 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–568.
- Bajénoff, M., Glaichenhaus, N., Germain, R.N., 2008. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J. Immunol.* 181, 3947–3954.
- Beutler, B., 2000. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 23–28.

- Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., Springer, T.A., 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184, 1101–1109.
- Bonecchi, R., Graham, G.J., 2016. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* 7, 224.
- Bono, M.R., Elgueta, R., Sauma, D., Pino, K., Osorio, F., Miche, P., Fierro, A., Roseblatt, M., 2007. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 33–43.
- Bowman, E.P., Campbell, J.J., Soler, D., Dong, Z., Manlongat, N., Picarella, D., Hardy, R.R., Butcher, E.C., 2000. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J. Exp. Med.* 191, 1303–1318.
- Bronte, V., Pittet, M.J., 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39, 806–818.
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., Wei, K., McMaster, B.E., Wright, K., Howard, M.C., Schall, T.J., 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* 203, 2201–2213.
- Cairns, C.B., Panacek, E.A., Harken, A.H., Banerjee, A., 2000. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Acad. Emerg. Med.* 7, 930–941.
- Cardona, S.M., Garcia, J.A., Cardona, A.E., 2013. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. *Methods Mol. Biol.* 1013, 1–16.
- Cesta, M.F., 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34, 455–465.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621.

- Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., Wang, J.M., 2017. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 1–11.
- Chvatchko, Y., Hoogewerf, A.J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., Power, C.A., 2000. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 191, 1755–1764.
- Comerford, I., Bunting, M., Fenix, K., Haylock-Jacobs, S., Litchfield, W., Harata-Lee, Y., Turvey, M., Brazzatti, J., Gregor, C., Nguyen, P., Kara, E., McColl, S.R., 2010. An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease. *Bioessays* 32, 1067–76.
- Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., Ngo, V.N., 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* 176, 181–193.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., Moser, M., 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 1413–1424.
- den Haan, J.M., Kraal, G., 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J. Innate Immun.* 4, 437–445.
- den Haan, J.M., Mebius, R.E., Kraal, G., 2012. Stromal cells of the mouse spleen. *Front. Immunol.* 3, 201.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R.S., Henn, V., Kroczeck, R.A., 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 31, 823–833.
- Ebert, L.M., Schaerli, P., Moser, B., 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* 42, 799–809.

- Eichner, A., Sixt, M., 2011. Setting the clock for recirculating lymphocytes. *Sci. Signal.* 4, pe43.
- Elgueta, R., Marks, E., Nowak, E., Menezes, S., Benson, M., Raman, V.S., Ortiz, C., O'Connell, S., Hess, H., Lord, G.M., Noelle, R., 2015. CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *J. Immunol.* 194, 505–513.
- Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M., 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87, 1037–1047.
- Fritz, J.H., Gommerman, J.L., 2011. Cytokine/stromal cell networks and lymphoid tissue environments. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 277–289.
- Giroir, B.P., Johnson, J.H., Brown, T., Allen, G.L., Beutler, B., 1992. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 90, 693–698.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., Gray, P.W., 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J. Exp. Med.* 185, 1595–1604.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., Luster, A.D., 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.
- Groeneveld, P.H., van Rooijen, N., Eikelenboom, P., 1983. In-vivo effects of lipopolysaccharide on lymphoid and non-lymphoid cells in the mouse spleen. Migration of marginal metallophilic cells towards the follicle centres. *Cell Tissue Res.* 234, 201–208.
- Groeneveld, P.H., Erich, T., Kraal, G., 1985. In vivo effects of LPS on B lymphocyte subpopulations. Migration of marginal zone-lymphocytes and IgD-blast formation in the mouse spleen. *Immunobiology* 170, 402–411.



- Groom, J.R., Luster, A.D., 2011a. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* 89, 207–215.
- Groom, J.R., Luster, A.D., 2011b. CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* 317, 620–631.
- Gunn, M.D, Ngo, V.N., Ansel, K.M., Eklund, E.H., Cyster, J.G., Williams, L.T., 1998. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 391, 799–803.
- Habtezion, A., Nguyen, L.P., Hadeiba, H., Butcher, E.C., 2016. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology* 150, 340–354.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., Cyster, J.G., 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194, 45–56.
- Hasegawa, H., Fujita, S. 2001. Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 47, 599–607.
- Hasegawa-Ishii, S., Inaba, M., Umegaki, H., Unno, K., Wakabayashi, K., Shimada, A., 2016. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. *Sci. Rep.* 6, 25457.
- Hernández-Ruiz, M., Zlotnik, A., 2017. Mucosal Chemokines. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 62–70.
- Heumann, D., Roger, T., 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta* 323, 59–72.
- Hiemstra, P.S., Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S., van den Barselaar, M.T., van Furth, R., Lehrer, R.I., 1993. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect. Immun.* 61, 3038–3046.

Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., Nomiya, H., 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J. Biol. Chem.* 272, 5846–5853.

Homey, B., Dieu-Nosjean, M.C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J.J., Oldham, E., Catron, D., Buchanan, M.E., Müller, A., deWaal Malefyt, R., Deng, G., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Lebecque, S., Caux, C., Zlotnik, A., 2000. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164, 6621–6632.

Hromas, R., Gray, P.W., Chantry, D., Godiska, R., Krathwohl, M., Fife, K., Bell, G.I., Takeda, J., Aronica, S., Gordon, M., Cooper, S., Broxmeyer, H.E., Klemsz, M.J., 1997. Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* 89, 3315–3322.

Imai, T., Chantry, D., Raport, C. J., Wood, C.L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., Gray, P.W., 1998. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* 273, 1764–1768.

Imai, T., Yoshida, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Yoshie, O., 1996. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J. Biol. Chem.* 271, 21514–21521.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115–122.

Kawashiri, S.Y., Kawakami, A., Iwamoto, N., Fujikawa, K., Aramaki, T., Tamai, M., Arima, K., Kamachi, M., Yamasaki, S., Nakamura, H., Tsurumoto, T., Kono, M., Shindo, H., Ida, H., Origuchi, T., Eguchi, K., 2009. Proinflammatory cytokines synergistically enhance the production of chemokine ligand 20 (CCL20) from rheumatoid fibroblast-like synovial cells in vitro and serum CCL20 is reduced in vivo by biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *J. Rheumatol.* 36, 2397–2402.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., Zlotnik, A., 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395–1399.

Kesteman, N., Vansanten, G., Pajak, B., Goyert, S.M., Moser, M., 2008. Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 83, 640–647.

Kim, C.H., Broxmeyer, H.E., 1999. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* 65, 6–15.

Kraal, G., 1992. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 132, 31–74.

Kraal, G., Mebius, R., 2006. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 250, 175–215.

Kunkel, E.J., Campbell, D.J., Butcher, E.C., 2003. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 10, 313–323.

Lei, Y., Takahama, Y., 2012. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect.* 14, 262–267.

Lo, C.G., Lu, T.T., Cyster, J.G., 2003. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. *J. Exp. Med.* 197, 353–361.

Loegering, D.J., Lennartz, M.R., 2002. Differential effect of Fc gamma receptor ligation on LPS-stimulated TNF-alpha secretion by hepatic, splenic, and peritoneal macrophages. *Inflammation* 26, 305–310.

Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B., 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184, 963–969.

- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., Moser, B., 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.* 28, 3696–3705.
- Lu, B., Humbles, A., Bota, D., Gerard, C., Moser, B., Soler, D., Luster, A.D., Gerard, N.P., 1999. Structure and function of the murine chemokine receptor CXCR3. *Eur. J. Immunol.* 29, 3804–3812.
- Lunney, J.K., 1998. Cytokines orchestrating the immune response. *Rev. Sci. Tech.* 17, 84–94.
- Luster, A.D., 1998. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436–445.
- Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., Cyster, J.G., 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 12694–12699.
- Ma, Y., Ross, A.C., 2009. Toll-like receptor 3 ligand and retinoic acid enhance germinal center formation and increase the tetanus toxoid vaccine response. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1476–1484.
- MacLennan I.C., 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139.
- Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C., Teixeira, M.M., 2013. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1439–1460.
- Mayer, A.M., Spitzer, J.A., 1991. Continuous infusion of Escherichia coli endotoxin in vivo primes in vitro superoxide anion release in rat polymorphonuclear leukocytes and Kupffer cells in a time-dependent manner. *Infect. Immun.* 59, 4590–4598.
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616.

- Menten, P., Wuyts, A., Van Damme, J., 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 455–481.
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D., 2016. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 45, 471–482.
- Milićević, N.M., Klaperski, K., Nohroudi, K., Milićević, Ž., Bieber, K., Baraniec, B., Blessenohl, M., Kalies, K., Ware, C.F., Westermann, J., 2011. TNF receptor-1 is required for the formation of splenic compartments during adult, but not embryonic life. *J. Immunol.* 186, 1486-1494.
- Milićević, N.M., Milićević, Ž., Westermann, J., 2012. Lipopolysaccharide-induced in vivo activation of follicular dendritic cells is tumor necrosis factor receptor-1 independent. *Anat. Rec. (Hoboken)* 295, 87–90.
- Mitchell, J., 1973. Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. *Immunology* 24, 93–107.
- Moore, R.N., Goodrum, K.J., Berry, L.J., 1976. Mediation of an endotoxic effect by macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 19, 187–197.
- Morrison, D.C., Ryan, J.L., 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38, 417–432.
- Moser, B., Loetscher, P., 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2, 123–128.
- Mueller, S.N., Germain, R.N., 2009. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 618–629.
- Mukaida, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S., Kuno, K., Matsushima, K., 1996. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 59, 145–151.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A., 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145–176.

Murphy, K., Weaver, C., 2016. *Janeway's Immunobiology*, ninth ed. Garland Science, New York str. 1–36.

Ness, T.L., Ewing, J.L., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L., 2006. CCR4 is a key modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 177, 7531–7539.

Ngo, V.N., Korner, H., Gunn, M.D., Schmidt, K.N., Riminton, D.S., Cooper, M.D., Browning, J.L., Sedgwick, J.D., Cyster, J.G., 1999. Lymphotoxin  $\alpha/\beta$  and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J. Exp. Med.* 189, 403–412.

Nieuwenhuis, P., Ford, W.L., 1976. Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cell. Immunol.* 23, 254–267.

Nolte, M.A., Hoen, E.N., van Stijn, A., Kraal, G., Mebius, R.E., 2000. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur. J. Immunol.* 30, 626–634.

Pabst, R., 1988., The spleen in lymphocyte migration. *Immunol. Today* 9, 43–45.

Pabst, R., Westermann, J., 1991. The unique role of the spleen and its compartments in lymphocyte migration. *Res. Immunol.* 142, 339–342.

Palomino, D.C., Marti, L.C., 2015. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13, 469–473.

Paradis, M., Mindt, B.C., Duerr, C.U., Rojas, O.L., Ng, D., Boulianne, B., McCarthy, D.D., Yu, M.D., Summers deLuca, L.E., Ward, L.A., Waldron, J.B., Philpott, D.J., Gommerman, J.L., Fritz, J.H., 2014. A TNF- $\alpha$ -CCL20-CCR6 axis regulates Nod1-induced B cell responses. *J. Immunol.* 192, 2787–2799.

Park, B.S., Lee, J.O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* 45, e66.

Park, M.K., Amichay, D., Love, P., Wick, E., Liao, F., Grinberg, A., Rabin, R.L., Zhang, H.H., Gebeyehu, S., Wright, T.M., Iwasaki, A., Weng, Y., DeMartino, J.A., Elkins, K.L., Farber, J.M., 2002. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J. Immunol.* 169, 1433–1443.

Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., Kollias, G., 1996a. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 184, 1397–1411.

Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Douni, E., Kollias, G., 1996b. Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new! *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 223–229.

Pellas, T.C., Weiss, L., 1990a. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am. J. Anat.* 187, 347–354.

Pellas, T.C., Weiss, L., 1990b. Migration pathways of recirculating murine B cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Am. J. Anat.* 187, 355–373.

Pfeffer, K., 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 185-191.

Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Krönke, M., Mak, T.W., 1993. Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457–467.

Raetz, C.R., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700.

- Ramiscal, R.R., Vinuesa, C.G., 2013. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol. Rev.* 252, 146–55.
- Rawlings, D.J., Schwartz, M.A., Jackson, S.W., Meyer-Bahlburg, A., 2012. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 282–294.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., Sher, A., 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819–1829.
- Rhee, S.H., 2014. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. *Intest. Res.* 12, 90–95.
- Rhodin, J.A.G., 1974. *Histology: A Text and Atlas*. Oxford University Press, New York, str. 404.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M., Brade, H., 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8, 217–225.
- Roitt, I. M., 1994. *Immunity to infection, U: I. M. Roitt (ed.), Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, str. 243–271.
- Rossi, D.L., Vicari, A.P., Franz-Bacon, K., McClanahan, T.K., Zlotnik, A., 1997. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J. Immunol.* 158, 1033–1036.
- Salkowski, C.A., Neta, R., Wynn, T.A., Strassmann, G., van Rooijen, N., Vogel, S.N., 1995. Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection. *J. Immunol.* 155, 3168–3179.



Sallusto, F., Baggiolini, M., 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat. Immunol.* 9, 949–952.

Sallusto, F., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A., 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 593–620.

Sánchez-Madrid, F., del Pozo, M.A., 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18, 501–511.

Schulz, O., Hammerschmidt, S.I., Moschovakis, G.L., Förster, R., 2016. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 203–242.

Schutysse, E., Struyf, S., Van Damme, J., 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 409–426.

Semaeva, E., Tenstad, O., Skavland, J., Enger, M., Iversen, P.O., Giertsen, B.T., Wiig, H., 2010. Access to the spleen microenvironment through lymph shows local cytokine production, increased cell flux, and altered signaling of immune cells during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *J. Immunol.* 184, 4547–4556.

Shimizu, K., Morikawa, S., Kitahara, S., Ezaki, T., 2009. Local lymphogenic migration pathway in normal mouse spleen. *Cell Tissue Res.* 338, 423–432.

Sokol, C.L., Luster, A.D., 2015. The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016303.

Steiniger, B.S., 2015. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* 145, 334–346.

Steiniger, B., Barth, P., Hellinger, A., 2001. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* 159, 501–512.

Steiniger, B., Barth, P., Herbst, B., Hartnell, A., Crocker, P.R., 1997. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly

sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* 92, 307–316.

Sweet, M.J., Hume, D.A., 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60, 8–26.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.

Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.

Tan, Y., Kagan, J.C., 2014. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol. Cell* 54, 212–223.

Triantafilou, M., Triantafilou, K., 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends. Immunol.* 23, 301–304.

Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D.J., 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2563–2582.

Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 437–457.

Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., Kuiper, J., 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 379–414.

van Ewijk, W., Nieuwenhuis, P., 1985. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia* 41, 199–208.

Van Rees, E.P., Sminia, T., Dijkstra, C.D., 1996. Structure and Development of the Lymphoid Organs. U: Pathobiology of the Aging Mouse (Mohr, U., Dungworth, D.L., Capen, C.C., Carlton, W.W., Sundberg, J.P., i Ward, J.M., editori), Vol. 1, str. 173–187. ILSI Press, Washington, D.C.

- Varona, R., Zaballos, A., Gutiérrez, J., Martín, P., Roncal, F., Albar, J.P., Ardavin, C., Márquez, G., 1998. Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3 $\alpha$ . *FEBS Lett.* 440, 188–194.
- Vermi, W., Lonardi, S., Bosisio, D., Uguccioni, M., Danelon, G., Pileri, S., Fletcher, C., Sozzani, S., Zorzi, F., Arrigoni, G., Doglioni, C., Ponzoni, M., Facchetti, F., 2008. Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J. Pathol.* 216, 356–364.
- Victoria, G.D., Nussenzweig, M.C., 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.
- Wang, H., Beaty, N., Chen, S., Qi, C.F., Masuik, M., Shin, D.M., Morse, H.C. 3rd, 2012. The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood* 119, 465–468.
- Watson, S.R., Bradley, L.M., 1998. The recirculation of naive and memory lymphocytes. *Cell Adhes. Commun.* 6, 105–110.
- Williams, I.R., 2006. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1072, 52–61.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O., 1998. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* 273, 16551–16554.
- Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitaura, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., Yoshie, O., 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J. Biol. Chem.* 272, 13803–13809.
- Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., Yoshie, O., 1998. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J. Biol. Chem.* 273, 7118–7122.

Yoshie, O., 2000. Immune chemokines and their receptors: the key elements in the genesis, homeostasis and function of the immune system. Springer Semin. Immunopathol. 22, 371–391.

Yoshie, O., Matsushima, K., 2015. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. Int. Immunol. 27, 11–20.

Zhang, Q., Wagas, Y., Yang, P., Sun, X., Liu, Y., Ahmed, N., Chen, B., Li, Q., Hu, L., Huang, Y., Chen, H., Hu, B., Chen, Q., 2017. Cytological study on the regulation of lymphocyte homing in the chicken spleen during LPS stimulation. Oncotarget 8, 7405–7419.

Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12, 121–127.

## Skraćenice

AAM – alternativno aktivirani makrofagi

ACKR – atipični hemokinski receptor (engl. *atypical chemokine receptor*)

ATAC – engl. *activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related*

BCA-1 – engl. *B cell-attracting chemokine-1*

BLC – engl. *B lymphocyte chemoattractant*

BLR-1 – engl. *Burkitt's lymphoma receptor 1*

B2M –  $\beta_2$  mikroglobulin

BP – bela pulpa

BRAK – engl. *breast and kidney-expressed chemokine*

cDNK – komplementarna DNK

6Ckine – engl. *chemokine with 6 cysteines*

CP – crvena pulpa

CTACK – engl. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DARK – engl. *Duffy antigen/receptor for chemokines*

DC – dendritska ćelija (engl. *dendritic cell*)

DC-CK1 – engl. *dendritic cell (DC)-chemokine 1*

DMC – engl. *dendritic cell and monocyte chemokine-like protein*

dPALS – distalni periarterijski limfocitni omotač

ELC – engl. *Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine*

ENA-78 – engl. *epithelial neutrophil activating protein-78*

FDC – folikulska dendritska ćelija (engl. *follicular dendritic cell*)

GCP-2 – engl. *granulocyte chemotactic protein 2*

GPCRs – receptori vezani sa G proteine (engl. *G protein-coupled receptors*)

GRO – engl. *growth-regulated oncogene*

HCC – engl. *hemofiltrate CC chemokine*

IL – interleukin

ILC – engl. *interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine*

IP-10 – engl. *interferon-induced protein of 10 kDa*

IRF3 – interferon regulatorni faktor 3 (engl. *interferon regulatory factor 3*)

I-TAC – engl. *IFN-inducible T cell alpha chemoattractant*

KC – engl. *keratinocyte-derived chemokine*

LARC – engl. *liver and activation-regulated chemokine*

LBP – lipopolisaharid-vezujući protein (engl. *lipopolysaccharide-binding protein*)

LEC – engl. *liver-expressed chemokine*

LIX – engl. *lipopolysaccharide-induced CXC chemokine*

LPS – lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)

LT – limfotoksin

LT-βR – limfotoksin-β receptor

MARC – engl. *mast cell activation-related chemokine*

MARCO – makrofagni receptor kolagenozne strukture (engl. *macrophage receptor with collagenous structure*)

MCP – engl. *monocyte chemotactic protein*

MDC – engl. *macrophage-derived chemokine*

MEC – engl. *mucosae-associated epithelial chemokine*

MGSA – engl. *melanoma growth stimulating activity*

MIG – engl. *monokine induced by gamma-interferon*

MIP – makrofagni inflamatorni protein (engl. *macrophage inflammatory protein*)

MPIF – engl. *myeloid progenitor inhibitory factor*

MRP – engl. *macrophage inflammatory protein-related protein*

MZ – marginalna zona

NAP-2 – engl. *nucleosome assembly protein 2*

NCC – engl. *novel CC chemokine*

nf-κB – nuklearni faktor-κB

NK ćelije – urođenoubilačke (engl. *natural killer*) ćelije

NKT ćelije – urođenoubilačke (engl. *natural killer*) T ćelije

Nod1 – engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*

PAHS – periarterijski hematopoetski omotač (engl. *periarterial hematopoietic sheath*)

PALS – periarterijski limfocitni omotač (engl. *periarterial lymphatic sheath*)

PARC – engl. *pulmonary and activation-regulated chemokine*

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PF4 – engl. *platelet factor 4*

pPALS – proksimalni periarterijski limfocitni omotač

PRRs – receptori za prepoznavanje molekulskih obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*)

qRT-PCR – kvantitativni *real-time* PCR (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RANTES – engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*

SCM – engl. *single C motif*

SDF-1 – engl. *stromal cell-derived factor 1*

SLC – engl. *secondary lymphoid-tissue chemokine*

SR-PSOX – engl. *scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*

TARC – engl., *thymus- and activation-regulated chemokine*

TCA-3 – engl. *T cell activation protein 3*

T<sub>CM</sub> – centralni memorijski T limfociti

TCR $\beta$  – T-ćelijski receptor  $\beta$

TECK – engl. *thymus-expressed chemokine*

T<sub>EFF</sub> – efektorski T limfociti

T<sub>EM</sub> – efektorski-memorijski T limfociti

T<sub>fh</sub> – T folikularni helper limfociti

T<sub>fr</sub> – folikularni regulatorni T limfociti

T<sub>h</sub> – T helper

TNF – faktor nekroze tumora

TNFR1 – engl. *tumor necrosis factor receptor-1*

TNFR1<sup>-/-</sup> – engl. *tumor necrosis factor receptor-1 knockout*

TLRs – receptori slični *Toll-u* (engl. *Toll-like receptors*)

T<sub>RCM</sub> – recirkulišući memorijski T limfociti



Treg – regulatorni T limfociti

T<sub>RM</sub> – rezidentni-memorijski T limfociti

WT – engl. *wild-type*

## **Biografija autora**

Dr Ivana Lalić rođena je 17.3.1986. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine, a diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,35. Tokom studiranja dobila je pohvalnicu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao najbolji student četvrte godine studija. Bila je demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu tokom pet školskih godina. Diplomski rad pod nazivom „Folikularne dendritske ćelije – strukturne i molekularne karakteristike“ odbranila je 15.9.2011. godine, mentor: prof. dr Novica Milićević.

Godine 2011. upisala je specijalističke akademske studije na modulu „Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija, embriologija“. Specijalističke akademske studije završila je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,73. Završni akademski specijalistički rad pod nazivom: „Ultrastrukturalna fenotipizacija epitelnih ćelija timusa“ odbranila je 27.6.2013. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Novica Milićević, mentor, prof. dr Vera Pravica i doc. dr Milica Labudović-Borović. Od 2013. godine student je doktorskih studija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program: molekularna medicina.

Od aprila 2012. godine zaposlena je na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao saradnik u nastavi (2012-2014. godine) i asistent (od 2014. godine). Od juna 2012. godine učesnik je projekta Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, kojim rukovodi prof. dr Novica Milićević (br. 175005, naziv projekta: „Molekularna regulacija strukturne organizacije limfatičnih organa“).

Dr Ivana Lalić autor je ili koautor u 7 radova, od kojih je 5 publikovano u časopisima sa CC/SCI liste.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a \_\_\_\_\_ Ivana Lalić \_\_\_\_\_

broj upisa \_\_\_\_\_ mm-11/13 \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

UTICAJ SISTEMSKE ADMINISTRACIJE LIPOPOLISAHARIDA NA STRUKTURNE,  
CELULARNE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE SLEZINE MIŠA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 19.6.2018.

Ivana Lalić

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije  
doktorskog rada**

Ime i prezime autora      Ivana Lalić  
Broj upisa                    mm-11/13  
Studijski program        Molekularna medicina

Naslov rada

UTICAJ SISTEMSKE ADMINISTRACIJE LIPOPOLISAHARIDA NA STRUKTURNE,  
CELULARNE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE SLEZINE MIŠA

Mentor                        Prof. dr Novica Milićević

Potpisani      Ivana Lalić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 19.6.2018.

Ivana Lalić

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ SISTEMSKE ADMINISTRACIJE LIPOPOLISAHARIDA NA STRUKTURNE, CELULARNE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE SLEZINE MIŠA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 19.6.2018.

Ivana Lalić