

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

Marija A. Jakovljević

**ZNAČAJ SIGNALIZACIJE POSREDOVANE
VANĆELIJSKIM PURINSKIM
NUKLEOTIDIMA U NEUROINFLAMACIJI I
DEMIJELINIZACIJI – IMPLIKACIJE U
MULTIPLOJ SKLEROZI**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Marija A. Jakovljević

**THE ROLE OF PURINERGIC SIGNALING IN
NEUROINFLAMMATION AND
DEMYELINATION – IMPLICATIONS FOR
MULTIPLE SCLEROSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

1. Dr Danijela Laketa, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki Fakultet
2. Dr Irena Lavrnja, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

1. Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki Fakultet
2. Dr Irena Lavrnja, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
3. Dr Đorđe Miljković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
4. Dr Ivana Grković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke “Vinča” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
5. Dr Danijela Laketa, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki Fakultet

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Laboratoriji za neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Ova disertacija pripadala je projektu „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod rukovodstvom prof dr Mirjane Stojiljković i dr Sanje Peković.

Hvala prof dr Nadeždi Nedeljković na ukazanom poverenju i pruženoj mogućnosti da uđem u svet neurobiologije. Bila mi je čast i privilegija da svoje prve naučne korake i uspehe ostvarim u ovoj oblasti i da imam mogućnost da stečeno znanje i veštine prenesem studentima. Veliko hvala na svim sugestijama, konstruktivnim primedbama i pomoći prilikom izrade ove disertacije, kao i na podršci u ključnim trenucima.

Najveću zahvalnost pri izradi ove disertacije dugujem naravno svojim mentorkama, doc dr Danijeli Laketi i dr Ireni Lavrnji, bez čijeg znanja, iskustva, velikog truda, ambicioznosti, perfekcionizma, konstruktivne kritike, strpljenja, prijateljstva i podrške, kako profesionalne tako i lične, ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana u ovom obliku.

Veliku zahvalnost dugujem dr Sanji Peković na svojoj podršci, profesionalnoj i ličnoj, podeljenom znanju, korisnim sugestijama pri izradi ove disertacije i srdačnosti. Hvala prof dr Mirjani Stojiljković koja mi je otvorila vrata Laboratorije za neurohemiju.

Hvala doc dr Sanji Dacić na ukazanom poverenju, podeljenom znanju, strpljenju i srdačnoj atmosferi prilikom angažovanja na praktičnom delu nastave kursa Neurobiologija. Hvala dr Ivani Bjelobabi i dr Danijeli Savić na podeljenom znanju i iskustvu, kao i pomoći i sugestijama pri eksperimentalnom radu i pisanju ove disertacije.

Veliko hvala Mariji Adžić, kolegini, prijateljici i saborcu, na dugogodišnjem prijateljstvu, podršci, razumevanju, podeljenom znanju i intelektualnoj radoznalosti i svim zajedničkim trenucima. Hvala Ivi, na srdačnosti i kolegijalnosti, podeljenom znanju i pomoći u eksperimentalnom radu. Hvala mladim koleginicama Ani i Katarini, na srdačnoj i veseloj atmosferi u laboratoriji i pomoći u eksperimentalnom radu, kao i kolegi Miloradu.

Zahvalna sam i na svim otežavajućim okolnostima tokom izrade ove disertacije, učinile su moju upornost, posvećenost nauci i istrajnost jačim, a uspeh utoliko većim.

Naposletku, najveću zahvalnost za sva životna dostignuća dugujem svojoj porodici.

Mami, tati i Duciju hvala na svemu, a najviše što su uvek bili uz mene. Hvala na svim vrednostima koje sam od vas naučila, kao i na svojoj bezuslovnoj ljubavi, brizi, pažnji, bodrenju, razumevanju i osloncu koji sam u vama uvek pronalazila.

Mom voljenom suprugu Đorđu hvala beskrajno na svemu. Na svoj ljubavi, veri, optimizmu, razumevanju, podršci i pomoći u svim lepim i teškim zajedničkim trenucima, i prošlim i budućim – hvala ti. Hvala mojoj maloj Sofiji, najvećoj radosti mog života i mom najmlađem i najslađem koautoru.

Značaj signalizacije posredovane vanćelijskim purinskim nukleotidima u neuroinflamaciji i demijelinizaciji – implikacije u multiploj sklerozi

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamacijska bolest centralnog nervnog sistema (CNS) koju kao i njen *in vivo* model eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) karakterišu infiltracija imunskih ćelija, aktivacija mikroglije i astrocita, demijelinizacija, oštećenje aksona, ali i remijelinizacija posredovana oligodendrocitnim progenitorskim ćelijama (OPĆ). Tokom neuroinflamacije, ATP ostvaruje pro-, a adenozin antiinflamacijsko dejstvo putem P2, odnosno P1 purinskih receptora. Aktivacija specifičnih purinskih receptora zavisi od koncentracije ATP, ADP i adenozina koju u vanćelijskom prostoru regulišu ektonukleotidaze. Najzastupljenije ektonukleotidaze u CNS su NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73. U MS/EAE uloga NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 eksprimiranih na ćelijama imunskog sistema uglavnom je poznata, dok je uloga ovih enzima prisutnih na ćelijama CNS nedovoljno istražena. Budući da aktivirana mikroglija i astrociti imaju ključnu ulogu u toku neuroinflamacije glavni cilj ove disertacije bio je ispitivanje ekspresije glavnih ektonukleotidaza CNS na pomenutim ćelijama i procena njihovog inflamacijskog fenotipa, kao i ekspresije purinskih receptora u kičmenoj moždini pacova tokom EAE kao animalnog modela MS. S obzirom na ulogu OPĆ u remijelinizaciji tokom MS/EAE, dodatni cilj bio je ispitivanje uticaja proinflamacijskih faktora na vijabilnost i funkcionalnost OPĆ linije Oli-neu i ekspresiju eN/CD73 na tim ćelijama.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da tokom EAE dolazi do fazno-specifičnih promena ekspresije svih ispitivanih komponenti purinskog signalnog sistema u kičmenoj moždini pacova. Uočeno povećanje ekspresije NTPDaza1/CD39 uzrokovano je aktivacijom mikroglije i infiltracijom monocita/makrofaga kao i drugih perifernih imunskih ćelija tokom EAE, a povezano je i sa tranzicijom mikroglije/makrofaga u pravcu antiinflamacijskog fenotipa, kao i indukcijom polarizacije astrocita u pravcu neuroprotektivnog fenotipa. U pogledu NTPDaza2, smanjenje ekspresije ove ektonukleotidaze prisutne prvenstveno na astrocitima u beloj masi kičmene moždine, uslovljeno je smanjenjem ekspresije na ovim ćelijama tokom EAE. Dodatno, tokom EAE došlo je do fazno-specifičnih promena u ekspresiji svih analiziranih purinskih receptora. Delovanje proinflamacijskih faktora na ćelije Oli-neu OPĆ linije izazvalo je porast ekspresije eN/CD73 koji ukazuje na inhibiciju diferencijacije i govori u prilog inhibitornoj ulozi proinflamacijskih faktora prisutnih u CNS tokom neuroinflamacije na diferencijaciju OPĆ a time i na proces remijelinizacije tokom EAE/MS, kao i na ulogu eN/CD73 ovih ćelija u tom procesu. U tom smislu, rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu ulogu glavnih ektonukleotidaza CNS u toku bolesti u EAE/MS patologiji i predstavljaju osnov za razvoj novih potencijalnih terapeutika.

KLJUČNE REČI: Multipla skleroza/MS, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis/EAE, CNS, ATP, NTPDaza1/CD39, NTPDaza2, eN/CD73, neuroinflamacija, mikroglija, astrociti, oligodendrocitne progenitorske ćelije/OPĆ

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ:

The role of purinergic signaling in neuroinflammation and demyelination – implications for multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that is characterized like its *in vivo* model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by immune cell infiltration, microglia and astrocyte activation, demyelination, axonal damage, as well as remyelination guided by oligodendrocyte progenitor cells (OPC). During neuroinflammation, ATP acts pro-, while adenosine acts anti-inflammatory via P2 and P1 purine receptors, respectively. Activation of specific purine receptor depends on ATP, ADP and adenosine extracellular concentrations that are regulated by by ectonucleotidases. In the CNS most abundant ectonucleotidases are NTPDase1/CD39, NTPDase2 and eN/CD73. Role of NTPDase1/CD39 and eN/CD73 in the cells of immune system, unlike in the CNS, in MS/EAE is mostly well known,. Since activated microglia and astrocytes have a key role in the course of neuroinflammation, the main goal of this dissertation was to study expression of major ectonucleotidases in the CNS at these cells and to assess their inflammatory phenotype, likewise to analyze expression of purine receptors in the rat spinal cord during EAE as animal model of MS. Considering role of OPC in remyelination during MS/EAE, additional goal was to assess the effects of proinflammatory factors at viability and functionality of OPC Oli-neu cell line and their expression of eN/CD73.

Results presented herein have demonstrated disease phase-specific changes of all analyzed components of purine signaling system in rat spinal cord during EAE. Upregulation of NTPDase1/CD39 during EAE arised as a consequence of microglial activation and infiltration of monocytes/macrophages and other perypheral immune cells and also was related to transition of microglia/macrophages towards anti-inflammatory phenotype, likewise to induction of astrocyte polarization towards neuroprotective phenotype. Regarding NTPDase2, mainly expressed at white matter astrocytes, observed downregulation resulted from decreased expression by these cells during EAE. Additionally, during EAE all analyzed purine receptors showed phase-specific expression changes. Proinflammatory factors induced in OPC Oli-neu cell line upregulation of eN/CD73, indicating inhibition of differentiation, and arguing in favor of inhibitory effect of proinflammatory factors, present in the CNS during neuroinflammation, at OPC differentiation and remyelination during EAE/MS, likewise the role of eN/CD73 in that process. Thus, results presented herein indicate important role of major CNS ectonucleotidases in the disease course during EAE/MS, representing a base for development of new potential therapeutics.

KEYWORDS: Multiple sclerosis/MS, experimental autoimmune encephalomyelitis/EAE, ATP, NTPDase1/CD39, NTPDase2, eN/CD73, neuroinflammation, microglia, astrocytes, oligodendrocyte progenitor cells/OPC

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Neurobiology

UDC NUMBER:

SKRAĆENICE

ADA (*eng.* adenosine deaminase) - adenzin deaminaza
ADP - adenzin - 5' - difosfat
AK - adenilat kinaza
AMP - adenzin - 5' - monofosfat
APĆ - antigen prezentujuće ćelije
ATP - adenzin - 5' - trifosfat
BCIP (*eng.* 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) - 5-brom-4-hlor-3'-indolifosfat
BMP4 (*eng.* bone morphogenetic factor 4) – koštani morfogenetski protein 4
BSA (*eng.* bovine serum albumin) - albumin seruma govečeta
cAMP - ciklični AMP
CCL2 (*eng.* C-C motif chemokine ligand 2) - hemokin ligand 2
CCL20 (*eng.* C-C motif chemokine ligand 20) - hemokin ligand 20
CCL3 (*eng.* C-C motif chemokine ligand 3) - hemokin ligand 3
cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
CFA (*eng.* Complete Freund's Adjuvant) - kompletni Frojndov adjuvans
CNPaza - 2',3' - ciklična nukleotid 3' – fosfodiesteraza
CNS - centralni nervni sistem
Cox-2 (*eng.* cyclooxygenase-2) - inducibilna ciklooksigenaza
CX3CL1 (*eng.* C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1) – fraktalkin
CXCL1 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 1) - hemokin ligand 1
CXCL10 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 10) - hemokin ligand 10
CXCL12 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 12) - hemokin ligand 12
DA - Dark Agouti
DAB - 3, 3' - diaminobenzidin - tetrahlorid
DAPI (*eng.* 4',6'-diamidino-2-phenylindole) - 4', 6' - diamidin - 2 - fenilindol
DEPC - dietil - pirokarbonat
DIG - digoksigenin
DMEM (*eng.* Dulbecco's modified Eagle medium) - Dulbekov modifikovani Iglav medijum
EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
EDTA (*eng.* ethylenediaminetetraacetic acid) - etilen diamin tetra-sirćetna kiselina
eN - ekto - 5' - nukleotidaza
FCS (*eng.* fetal calf serum) - serum fetusa govečeta
FGF2 (*eng.* fibroblast growth factor 2) - faktor rasta fibroblasta 2
GAPDH (*eng.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GFAP (*eng.* glial fibrillary acidic protein) - glijski fibrilarni kiseli protein
GM-CSF (*eng.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – granulocitno – makrofagni faktor stimulacije kolonija
GPI (*eng.* glycosylphosphatidylinositol) - glikozilfosfatidilinozitol
HRP (*eng.* horseradish peroxidase) - peroksidaza rena
IFN γ (*eng.* interferon γ) - interferon γ
IGF-1 (*eng.* insulin growth factor 1) - insulinski faktor rasta 1
IL-10 - interleukin 10
IL-13 - interleukin 13
IL-17 - intereukin 17

IL-1 α - interleukin 1 α
IL-1 β - interleukin 1 β
IL-6 - interleukin 6
iNOS (*eng.* inducible nitric oxide synthase) - inducibilna sintaza azot oksida
iRNK - informacijska ribonukleinska kiselina
KMB - krvno – moždana barijera
LPS (*eng.* lipopolysaccharide) - lipopolisaharid
MAPK (*eng.* mitogen-activated protein kinases) - mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MBP (*eng.* myelin basic protein) - mijelinski bazni protein
MHC (*eng.* major histocompatibility complex) - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti
MKK - Mandersov koeficijent kolokalizacije
MMP (*eng.* matrix metalloproteinase) - matriksne metaloproteinaze
MOG (*eng.* myelin oligodendrocyte glycoprotein) - mijelinski oligodendrocitnoglikoprotein
MS - multipla skleroza
MTT - 3-(4,5'-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid
NAD⁺ - nikotinamid dinukleotid
NAGM (*eng.* normal appearing grey matter) - siva masa normalnog izgleda
NAWM (*eng.* normal appearing white matter) - bela masa normalnog izgleda
NBT (*eng.* nitro-blue tetrazolium) - azot-plavo tetrazolijum
NDPK (*eng.* nucleoside diphosphate kinase) - nukleozid difosfat kinaza
NF- κ B (*eng.* Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - jedarni faktor- κ B
NGF (*eng.* nerve growth factor) - faktor rasta neurona
NO (*eng.* nitric oxide) - azot – monoksid
NMĆ – nervne matične ćelije
NTPDaza - Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza
NVJ - neurovaskularna jedinica
OPĆ - oligodendrocitne progenitorske ćelije
PBS (*eng.* phosphate buffered saline) - puferovani fiziološki rastvor
PCR (*eng.* polymerase chain reaction) - metoda lančane reakcije polimeraze
PDGFR α (*eng.* platelet derived growth factor receptor α) - α receptor za faktor rasta trombocita
PFA - paraformaldehid
PKK - Pirsonov koeficijent korelacije
PLP (*eng.* proteolipid protein) - protelipidni protein
PNP (*eng.* purine nucleoside phosphorylase) - fosforilaza purinskih nukleozida
PVDF (*eng.* polyvinylidene fluoride) - poliviniliden fluorid
RanBPM (*eng.* Ran binding protein M) - Ran vezujući protein M
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS (*eng.* reactive oxygen species) – reaktivne kiseonične vrste
SDS-PAGE (*eng.* sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis) - natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza
SEM (*eng.* standard error of the mean) - standardna greška srednje vrednosti
SSC (*eng.* saline-sodium citrate) - natrijum – citratni pufer sa sadržajem soli
TBE - Tris-Borat-EDTA
TGF β (*eng.* transforming growth factor β) - transformišući faktor rasta β
TLR (*eng.* Toll-like receptors) - receptori slični Toll-u
TNF α (*eng.* tumor necrosis factor α) - faktor nekroze tumora α

Treg - regulatorni T-limfociti

UDP - uracil - 5' - difosfat

UTP - uracil - 5' - trifosfat

VEGF A (*eng.* vascular endothelial growth factor A) - vaskularni endotelni faktor rasta A

SADRŽAJ

I UVOD

1. Neuroinflamacija.....	1
1.1. Multipla skleroza.....	2
1.1.1. Simptomi, tipovi bolesti i histopatološka slika.....	3
1.1.2. Hipoteze o patogenezi MS.....	3
1.1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE).....	4
1.2. Astrociti.....	6
1.3. Mikroglija i makrofagi.....	9
1.4. Oligodendrociti.....	11
2. Purinska signalizacija.....	13
2.1. Adenozin- 5'-trifosfat (ATP).....	14
2.2. Adenozin.....	15
2.3. Purinski receptori.....	16
2.3.1. P1 purinski receptori.....	16
2.3.2. P2 purinski receptori.....	16
2.3.2.1. P2X familija receptora.....	16
2.3.2.2. P2Y familija receptora.....	17
2.4. Ektonukleotidaze.....	18
2.4.1. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaze (NTPDaze).....	18
2.4.1.1. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza1 (NTPDaza1, CD39).....	19
2.4.1.2. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza 2 (NTPDaza2).....	21
2.4.2. Ekto - 5' - nukleotidaza (eN, CD73).....	21

II CILJEVI.....	23
-----------------	----

III MATERIJAL I METODE.....	24
-----------------------------	----

1. Eksperimentalne životinje.....	24
1.1. Indukcija EAE i evaluacija toka bolesti.....	24
1.2. Izolacija RNK iz kičmene moždine.....	25
1.3. Sinteza komplementarne DNK.....	25
1.4. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.....	26
1.5. Izolacija grube membranske frakcije iz kičmene moždine.....	27
1.6. Određivanje koncentracije proteina.....	27
1.7. Western Blot.....	27
1.8. Priprema tkiva za imunohistohemijska i imunofluorescentna obeležavanja i metodu <i>in situ</i> hibridizacije.....	28
1.9. <i>In situ</i> hibridizacija.....	28
1.10. Imunohistohemijsko obeležavanje.....	30
1.11. Imunofluorescentno obeležavanje.....	30
1.12. Kvantifikacija imunofluorescence i analiza kolokalizacije.....	30
1.13. Izolacija limfocita iz poplitealnih limfnih čvorova.....	31
1.14. Izolacija mononuklearne frakcije ćelija iz kičmene moždine.....	32
1.15. Protočna citofluorimetrija.....	32
2. Održavanje Oli-neu ćelijske kulture.....	34

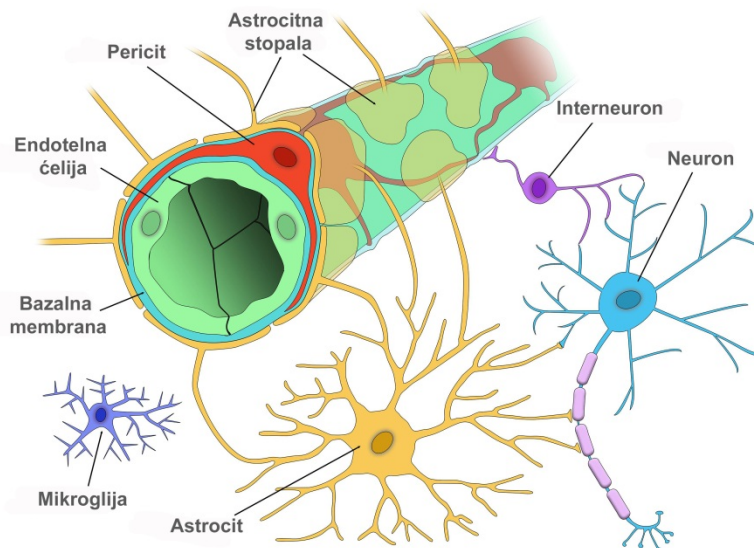
2.1. Određivanje vijabilnosti ćelija.....	35
2.2. Izolacija RNK iz Oli-neu ćelija.....	36
2.3. Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR).....	36
2.4. Detekcija kontaminacije genomskom DNK metodom PCR.....	36
2.5. Određivanje optimalne temperature hibridizacije prajmera.....	37
2.6. Tretman ćelija i metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.....	37
2.7. Gel elektroforeza.....	38
2.8. Izolacija ukupnih proteina iz Oli-neu ćelija i Western Blot.....	38
2.9. Analiza citotoksičnog efekta citofluorimetrijskom metodom uz pomoć aneksin V / propidijum jodid bojenja.....	38
2.10. Određivanje proliferacije Oli-neu ćelija.....	39
2.11. Analiza morfologije Oli-neu ćelija.....	39
2.12. Imunofluorescentno obeležavanje.....	40
2.13. Izolacija membranske frakcije.....	41
2.14. Određivanje AMP – hidrolizujuće aktivnosti u membranskoj frakciji Oli-neu ćelija.....	41
3. Statistička obrada podataka.....	41
 IV REZULTATI.....	 42
1. Ekspresija komponenti purinskog signalnog sistema tokom EAE	
1.1. EAE - tok i karakterizacija bolesti.....	42
1.2. Genska ekspresija komponenti purinskog signalnog sistema.....	44
1.3. Proteinska ekspresija NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73.....	45
1.4. Proteinska ekspresija purinskih receptora P2Y ₁ , P2Y ₁₂ i P2Y ₁₃	45
1.5. NTPDaza1/CD39.....	48
1.5.1. Promene tkivne ekspresije NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini	48
1.5.2. Ćelijska ekspresija NTPDaza1/CD39 iRNK.....	49
1.5.3. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na mikrogliji/makrofagima i astrocitima.....	50
1.5.4. Karakterizacija inflamacijskog fenotipa NTPDaza1 ⁺ mikroglije/makrofaga.....	53
1.5.5. Karakterizacija inflamacijskog tipa NTPDaza1 ⁺ aktivirane mikroglije/makrofaga....	57
1.5.6. Funkcionalno stanje mikroglije i makrofaga.....	61
1.5.7. Heterogenost NTPDaza1 ⁺ astrocita.....	63
1.5.8. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na neuronima.....	66
1.6. NTPDaza2.....	67
1.6.1. Lokalizacija NTPDaza2 imunohistohemijskog signala.....	67
1.6.2. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima astrocita.....	67
1.6.3. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima mikroglije/makrofaga.....	70
1.6.4. Kolokalizacija NTPDaza2 sa CD4 markerom limfocita.....	70
1.6.5. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima drugih ćelija CNS.....	70
1.7. Ekspresija ektonukleotidaza na ćelijama mononuklearnih infiltrata	72
1.7.1. NTPDaza1/CD39 na ćelijama mononuklearnih infiltrata.....	72
1.7.2. Karakterizacija NTPDaza1+ ćelija infiltrata na vrhuncu EAE.....	73
1.8. Ekspresija ektonukleotidaza u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora	74
2. Ekspresija ektonukleotidaza na ćelijama oligodendrocitne loze.....	76
2.1. Kolokalizacija eN/CD73 sa markerima oligodendrocita tokom EAE.....	76
2.2. Uticaj proinflamacijskih faktora na preživljavanje, proliferaciju i smrt Oli-neu oligodendrocitnih progenitorskih ćelija.....	77
2.3. Uticaj proinflamacijskih faktora na ekspresiju i aktivnost eN/CD73 u Oli-neu oligodendrocitnim progenitorskim ćelijama.....	78
 V DISKUSIJA.....	 82

VI ZAKLJUČCI.....	98
VII LITERATURA.....	100
VIII PRILOZI.....	133
IX BIOGRAFIJA.....	137

I UVOD

1. Neuroinflamacija

Za pravilno funkcionisanje centralnog nervnog sistema (CNS) sistema neophodno je da se nervne i glijske ćelije – mikroglija, astrociti i oligodendrociti, koje predstavljaju nosioce funkcije ovog sistema, nalaze u hemijski izuzetno kontrolisanoj mikrosredini. Ćelije CNS izolovane su od krvotoka zahvaljujući barijerama, među kojima je najznačajnija krvno – moždana barijera (KMB) (Abbott *i sar.* 2010). Prema najnovijim saznanjima, KMB čine neurovaskularne jedinice (NVJ) koje predstavljaju morfofunkcionalne veze između neurona, protoplazmatičnih astrocita, kao i endotelnih ćelija, pericita i bazalne lamine zidova kapilara (Slika 1). U okviru NVJ astrociti svojim stopalima naležu na spoljašnji zid kapilara sazdan od bazalne membrane i pericita, dok unutrašnji zid kapilara čine endotelne ćelije povezane vezama tipa *zonula occludens* koje sprečavaju slobodnu razmenu materija između krvi i moždanog parenhima u fiziološkom stanju (Zlokovic 2008, Sweeney *i sar.* 2016).



Postojanje fizičke barijere između CNS i ostatka organizma omogućava tzv. „imunska privilegovanost“ tog sistema koja znači da su antigeni u CNS zaštićeni od reakcije perifernog imunskog sistema, osim u slučaju narušavanja KMB tokom inflamacije i drugih patoloških stanja CNS (Zlokovic 2008).

Zbog svojih specifičnosti, inflamacija u CNS označena je posebnim terminom – neuroinflamacija. Ovaj termin obuhvata imunski odgovor od akutnog, urođenog imunskog odgovora rezidentnih ćelija CNS – pre svega mikroglije i astrocita koji ima protektivnu ulogu, do hronične inflamacije i posledičnog oštećenja parenhima CNS usled sadejstva lokalnog imunskog odgovora rezidentnih ćelija i perifernog adaptivnog imunskog odgovora (Becher *i sar.* 2017) čiji su nosioci B-limfociti i CD4⁺ i CD8⁺ T-limfociti (Abbas *i sar.* 2014). Akutna neuroinflamacijska reakcija ima ulogu u eliminaciji

infekcije ili reparaciji oštećenog tkiva i samoograničavajuća je, u smislu da se aktivacija imunskih i glijških ćelija završava spontano, čime dolazi do razrešenja inflamacije. Jedna od osnovnih funkcija urođene imunosti je obezbeđivanje pravilne aktivacije stečene imunosti, naročito naivnih CD4⁺ T-limfocita, s tim što rezidentne imunске ćelije CNS poput mikroglije, ne mogu direktno da aktiviraju ćelije stečene imunosti (Ransohoff & Brown 2012). Po aktivaciji na periferiji, efektorski T-limfociti deluju na rezidentne i regrutovane ćelije urođene imunosti i, zajedno sa proteinima komplemента, uklanjaju infekciju ili povredu prisutnu u CNS. Rezidentne ćelije - mikroglija i astrociti, sa druge strane, oslobađaju citokine i hemokine koji privlače cirkulišuće periferne limfocite i mijeloidne ćelije, kao i ćelije urođene imunosti poput NK i NKT ćelija, mastocita i granulocita. Pored toga, mikroglija i astrociti povećavaju ekspresiju glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti klase II (*eng.* major histocompatibility complex, MHC) omogućavajući prezentaciju antigena T-limfocitima (Ransohoff & Brown 2012, Becher *i sar.* 2017).

Lokalni imunski odgovor u velikoj meri određuje razmeru i prirodu samog adaptivnog imunskog odgovora, ali i obrnuto. Periferne infekcije i/ili prethodna oštećenja CNS mogu dovesti do povećane podložnosti CNS za nastanak nekontrolisanog inflamacijskog odgovora. U takvim uslovima dolazi do hronične neuroinflamacije koja podrazumeva perzistentnu aktivaciju imunskih i glijških ćelija, koja za posledicu ima oštećenje ili smrt neurona, odnosno neurodegeneraciju (Amor *i sar.* 2014). Hronična neuroinflamacija predstavlja zajednički imenilac brojnih CNS patologija poput multiple skleroze (MS), amiotrofične lateralne skleroze, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, različitih encefalitisa, kao i traumatskih i ishemijskih povreda CNS (Zlokovic 2008, Amor *i sar.* 2014).

1.1. Multipla skleroza (MS)

MS je hronična inflamacijska bolest CNS (Calabresi 2004, Bjelobaba *i sar.* 2017, Lassmann 2018). Gubitak mijelinskog omotača, degeneracija aksona i ćelijska smrt neurona dovode do nastanka karakterističnih plaka u CNS i izazivaju poremećaje neuroloških, kognitivnih i psiholoških funkcija, koji se vremenom pogoršavaju (Compston & Coles 2002). Bolest najčešće pogađa radno sposobno stanovništvo starosti od 20 do 40 godina, a ređe decu ili starije osobe (Wootla *i sar.* 2012). Etiologija je nepoznata, a današnje stanovište je da bolest nastaje u složenom sadejstvu genetičke podložnosti i brojnih spoljašnjih faktora rizika (Wootla *i sar.* 2012). Posledično, lek za multiplu sklerozu još uvek nije otkriven, ali su u primeni raznovrsni terapeutici koji ublažavaju simptome i modifikuju tok bolesti (Bjelobaba *i sar.* 2017).

Klinička slika i patološke promene ove bolesti su prvobitno opisane od strane nekolicine evropskih patologa u 19. veku, ali je tek Žan-Marten Šarko, francuski neurolog (1825 – 1893), na osnovu prethodnih i sopstvenih zapažanja, označio sklerozu kao zasebnu bolest i nazvao je “skleroza diseminovanih plaka” (*fran.* sclerose en plaque) (Charcot 1868, Lassmann 2018). Ne postoji jedinstven dijagnostički test za multiplu sklerozu. Savremeni princip postavljanja dijagnoze za ovu bolest, utvrđen međunarodnim dogovorom, podrazumeva sledeće kriterijume (Goldenberg 2012):

1. Kriterijum prostorne diseminacije: postojanje najmanje dve različite lezije (plake) u CNS;
2. Kriterijum vremenske diseminacije: postojanje najmanje dve simptomatske epizode bolesti, koje se utvrđuje magnetnom rezonancom u razmaku od 3 meseca;
3. Kriterijum inflamacije: postojanje hronične inflamacije CNS, koja se utvrđuje analizom cerebrospinalne tečnosti i utvrđivanjem prisustva oligoklonalnih traka.

MS je, prema kliničkoj i histopatološkoj slici, veoma kompleksna i heterogena bolest (Lassmann 2018). Dodatno, tokom prethodnih decenija uočeno je uvećanje prevalence, najverovatnije usled produženja životnog veka opšte populacije, promene načina života i povećane izoženosti nepovoljnim faktorima sredine, zatim povećanje incidence MS, posebno kod žena, kao i gubitak uticaja geografske širine na tlu Evrope i severne Amerike, koji je najverovatnije posledica velikih migracija stanovništva (Koch-Henriksen & Sorensen 2010).

U pogledu genetičkih faktora koji imaju uticaja na patogenezu MS, do sada je otkriven značaj MHC haplotipova, kao i određenih alela gena za citokine i njihove receptore (Hollenbach & Oksenberg 2015, Miljkovic & Spasojevic 2013). Glavni sredinski faktori rizika identifikovani u opsežnim studijama su nedostatak vitamina D, pušenje, higijena i gojaznost (Ascherio & Munger 2016). Hipoteza o uticaju manjka vitamina D na razvoj MS daje logično objašnjenje povećanja incidence bolesti sa povećanjem geografske širine, budući da je glavni izvor vitamina D za čoveka sunčeva svetlost, a naročito B tip ultravioletnog zračenja (Holick 2004). Higijenska hipoteza pretpostavlja da izloženost patogenima u ranom detinjstvu pomaže adekvatnom formiranju imunskog sistema i na taj način sprečava pojavu alergijskih i autoimunskih bolesti (Bach 2002). Od svih patogena koji su potencijalno dovedeni u vezu sa razvojem MS, najznačajniji je Epstein – Barr virus (Pender 2011).

1.1.1. Simptomi, tipovi bolesti i histopatološka slika

Najčešći inicijalni simptom MS je optički neuritis, koji podrazumeva delimični ili potpuni gubitak vida (Kister *i sar.* 2013). Više od 30% MS pacijenata ima mišićne spazme, najčešće u nogama (Kister *i sar.* 2013). Drugi rani simptomi bolesti su poremećaji poput parestezije (osećaj obamrlosti i peckanja), diplopije, ataksije, vrtoglavice i poremećaja funkcije urinarnog sfinktera (Kister *i sar.* 2013). Najčešća manifestacija MS je unilateralna obamrlost noge koja se širi ka karlici, abdomenu i toraksu (Kister *i sar.* 2013). Prema toku bolesti, neurolozi svrstavaju pacijente u 4 osnovne kategorije: relapsno – remisioni, sekundarno – progresivni, primarno – progresivni i progresivno – relapsni oblik (Hauser & Goodin 2005). Najčešći oblik bolesti je relapsno – remisioni koji se javlja kod 85% pacijenata. Nedavno je predložen još jedan vid MS – mijelokortikalni, kojeg karakterišu demijelinizacija kičmene moždine i kore velikog mozga, ali ne i bele mase velikog mozga (Trapp *i sar.* 2018). Pored toga, kod 10% pacijenata javlja se i benigna forma MS (Amato *i sar.* 2006).

Pomenuti simptomi u vezi su sa oštećenjem mijelinskog omotača kao i samih nervnih ćelija, koji se mogu detektovati u vidu lezija na histološkim preparatima mozga i kičmene moždine osoba obolelih od MS. Prema tipu, lezije mogu biti klasične aktivne sa izraženo narušenom KMB, hronične aktivne, odnosno lezije koje se sporo šire sa prisutnim niskim stepenom demijelinizacije po obodu lezije i manjim oštećenjem KMB, neaktivne lezije i remijelinizovane plake (Lassmann 2018).

Lezije mogu nastati na bilo kom mestu u mozgu ili kičmenoj moždini, ali se češće javljaju na mestima veće gustine venskih sudova (Haider *i sar.* 2016). U lezijama u sivoj masi prisutne su infiltracija limfocita i aktivacija mikroglije manjeg obima u odnosu na lezije u beloj masi (Peterson *i sar.* 2001, Bo *i sar.* 2003, Lassmann 2018).

1.1.2. Hipoteze o patogenezi MS

U literaturi postoje dve suprotstavljene hipoteze o patogenezi MS: hipoteza autoimunosti i hipoteza oligodendrogliopatije (Barnett & Prineas 2004, Nakahara *i sar.* 2012, Stys *i sar.* 2012). Prema hipotezi autoimunosti, T- i B-limfociti specifični za sopstvene proteine mijelinskog omotača aktiviraju se u

perifernim limfnim organima, migriraju u CNS, prolaze KMB i dospevaju u CNS parenhim. U parenhimu napadaju proteine mijelina i oligodendrocite čime izazivaju njihovu smrt i posledičnu demijelinizaciju, kao i aktivaciju astrocita i mikroglije i oštećenje aksona (Nakahara *i sar.* 2012, Miljkovic & Spasojevic 2013). Prema novijim podacima, u MS lezijama dominantno su prisutni CD8⁺ T-limfociti i CD20⁺ B-limfociti, dok su CD4⁺ T-limfociti prisutni u manjoj meri (Machado-Santos *i sar.* 2018).

Hipoteza o oligodendrogliopatiji kao inicijalnom događaju potiče iz tri ključne neuropatološke studije različitih tipova lezija MS pacijenata (Lucchinetti *i sar.* 2000, Barnett & Prineas 2004, Traka *i sar.* 2015) u kojima je uočena apoptoza oligodendrocita vrlo rano tokom nastanka lezije, bez prisustva inflamacijskih ćelija, poput T-limfocita i makrofaga, što implicira oligodendrogliopatiju kao inicijalni događaj kod ovog tipa MS lezija. Apoptoza oligodendrocita biva praćena aktivacijom mikroglije, odnosno lokalnim imunskim odgovorom, koji zatim dovodi do regrutacije limfocita i njihove infiltracije u parenhim CNS. Uzrok oligodendrogliopatije nije poznat, ali postoje pretpostavke o štetnom dejstvu oksidativnog stresa, toksičnosti izazvane glutamatom, oštećenja mitohondrija itd. (Bradl & Lassmann 2010).

Hipoteza autoimunosti danas je široko prihvaćena, iako je glavni korpus dokaza zasnovan na najbolje okarakterisanom eksperimentalnom životinjskom modelu MS – autoimunskom eksperimentalnom encefalomijelitisu koji ipak pokazuje izvesne razlike u odnosu na bolest koju modeluje (Sriram & Steiner 2005, Constantinescu *i sar.* 2011). Takođe, glavni nedostatak ove hipoteze je da, pored brojnih napora naučnika, nije izolovan specifičan antigen koji izaziva MS kod ljudi (Lassmann 2018). Sa druge strane, hipoteza oligodendrogliopatije je zasnovana na temeljnim neuropatološkim studijama MS pacijenata. Glavni nedostatak ove hipoteze je manjak eksperimentalnih podataka u odnosu na hipotezu autoimunosti.

Nezavisno od redosleda događaja koji prethode njihovom nastanku, kada se jednom formiraju demijelinizacione plake, jedan od mehanizama oporavka tako oštećenog tkiva je i remijelinizacija. Remijelinizacija je složen proces koji podrazumeva nekoliko koordinisanih faza: proliferaciju adultnih oligodendrocitnih progenitorskih ćelija (OPĆ) rasprostranjenih u beloj i sivoj masi CNS, njihovu migraciju do mesta demijelinizacije, diferencijaciju u zrele oligodendrocite, obavljanje demijelinizovanih aksona i formiranje novog mijelinskog omotača (Kipp *i sar.* 2012). Postoje brojni faktori prisutni tokom neuroinflamacije, poput citokina, hemokina, faktora rasta, hormona itd. za koje je pokazano da utiču na proliferaciju, preživljavanje, migraciju i diferencijaciju OPĆ. Iako remijelinizacija može delimično popraviti kliničku sliku, generalni zaključak u patologiji MS je da je remijelinizacija nedovoljno uspešan proces (Kipp *i sar.* 2012), s obzirom na to da je mijelinski omotač remijelinizovanih vlakana tanji i ima kraće internoduse od neoštećenih mijelinskih omotača (Bradl & Lassmann 2010). Iako tačan uzrok nepotpune remijelinizacije nije poznat, pretpostavlja se da je u to uključena mikroglija čiji je zadatak da fagocituje ostatke mijelinskog omotača, kao i da pomoću oslobođenih citokina i hemokina, regrutuje OPĆ na mesto lezije (Prineas *i sar.* 1993, Peferoen *i sar.* 2014).

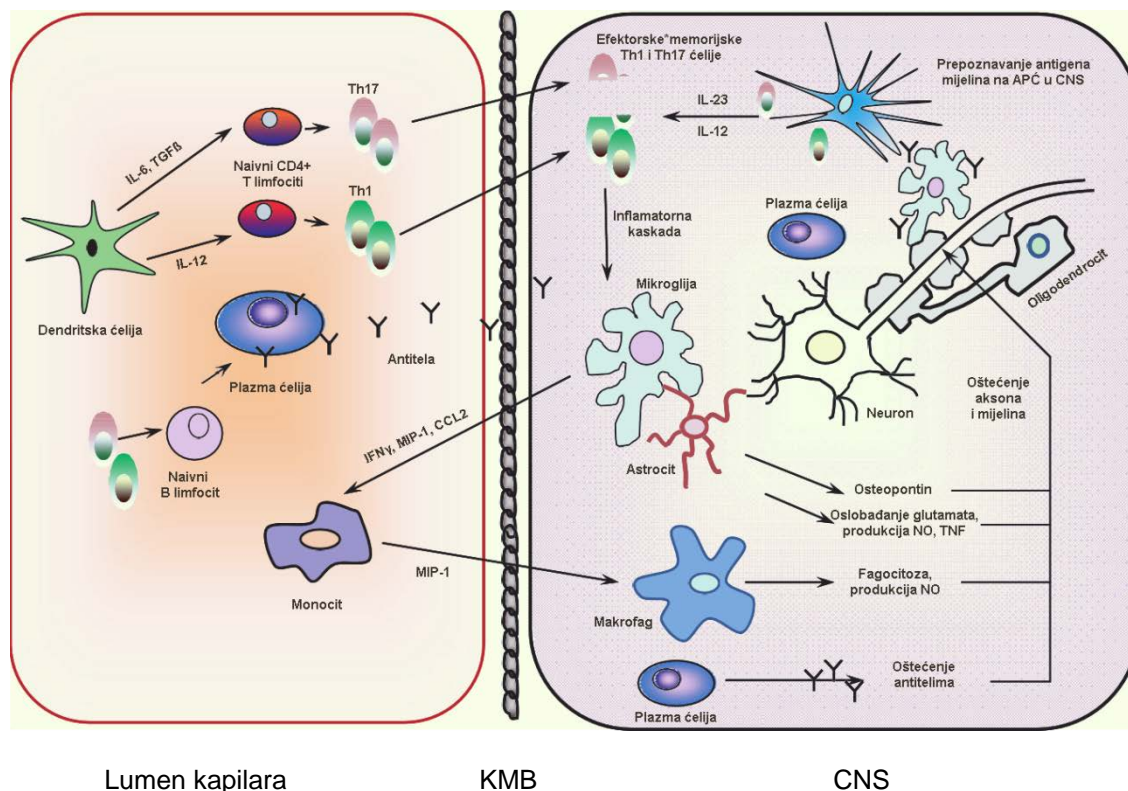
1.1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE)

U *in vivo* istraživanjima MS koristi se nekolicina animalnih modela među kojima je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) najčešće korišćen i najbolje okarakterisan (Constantinescu *i sar.* 2011). Iako su u ovim istraživanjima korišćene različite vrste sisara, EAE se najčešće izaziva kod genetički podložnih sojeva miša poput SJL/J i C57BL/6, odnosno Lewis i Dark Agouti sojeva pacova

(Kipp *i sar.* 2012). Kod navedenih eksperimentalnih životinja EAE je moguće izazvati korišćenjem prečišćenih antigena prisutnih u mijelinskom omotaču, poput protelipidnog proteina (*eng.* proteolipid protein, PLP), mijelinskog baznog proteina (*eng.* myelin basic protein, MBP) ili mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina (*eng.* myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) i/ili imunizacijom pomoću homogenata mozga ili kičmene moždine. Aktivna imunizacija se, uobičajeno, vrši emulzijom antigena, odnosno homogenatom kičmene moždine, u kompletnom Freundovom adjuvansu (*eng.* Complete Freund Adjuvant, CFA) sa dodatkom *Mycobacterium tuberculosis* kod pacova, odnosno sa ili bez dodatnih injekcija toksina *Bordetella pertussis* kod miševa. Takođe, za izazivanje EAE koristi se i adoptivni transfer aktiviranih T-limfocita specifičnih za neki od antigena prisutnih u mijelinskom omotaču (pasivna imunizacija) (Constantinescu *i sar.* 2011). Pored navedenog, danas postoje i transgene životinje koje spontano razvijaju EAE (Bjelobaba *i sar.* 2017). Uočeno je da razvoj bolesti zavisi od prisutnih haplotipova MHC, pola i starosti životinje, kao i antigena i količine *Mycobacterium tuberculosis* kojima se vrši imunizacija. Prema toku EAE, bolest može biti: akutno monofazna, relapsno – remisiona i hronična progresivna. (Bjelobaba *i sar.* 2018).

Mehanizam nastanka EAE podrazumeva aktivaciju ćelija stečenog, a u manjoj meri i urođenog imuniteta (Slika 2). Naivni CD4⁺ T-limfociti specifični za sopstvene proteine mijelina aktiviraju se u perifernim limfnim čvorovima od strane dendritskih ćelija koje prezentuju proteine mijelinskog omotača. Ovako aktivirani, T-limfociti se diferenciraju u pomoćničke Th1 limfocite koji oslobađaju interferon γ (*eng.* interferon γ , IFN γ) i Th17 koji oslobađaju interleukin 17 (IL-17), pri čemu je pokazano da u patogenezi EAE indukovane pomoću CFA Th17 ćelije imaju vodeću ulogu (Nacka-Aleksic *i sar.* 2015, Murphy *i sar.* 2010, Miljkovic & Spasojevic 2013, Van Kaer *i sar.* 2019). Pomoćnički T-limfociti su neophodni za sazrevanje drugih imunskih ćelija koje u manjoj meri učestvuju u patogenezi EAE poput B-limfocita i citotoksičnih CD8⁺ limfocita. Pored toga, neophodni su i za adekvatno funkcionisanje makrofaga i neutrofila. Th1 i Th17 ćelije prolaze kroz KMB i dospevaju u parenhim CNS gde moraju biti reaktivirane. Pored dendritskih ćelija kao glavnih antigen prezentujućih ćelija (APĆ), prezentaciju antigena u CNS vrše perivaskularni, meningealni i makrofagi horoidnog pleksusa (Becher *i sar.* 2006). Reaktivirani encefalitogeni T-limfociti u parenhimu CNS dovode do smrti oligodendrocita i demijelinizacije, kao i aktivacije astrocita i mikroglije (Nakahara *i sar.* 2012, Miljkovic & Spasojevic 2013). Veoma važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora tokom EAE imaju FoxP3⁺ regulatorni T-limfociti (Treg) koji oslobađanjem antiinflamacijskih citokina interleukina 10 (IL-10) i transformišućeg faktora rasta β (*eng.* transforming growth factor β , TGF β), ali i pomoću membranskih molekula suzbijaju odgovor Th ćelija i dovode do razrešenja neuroinflamacije (Borsellino *i sar.* 2007, Antonioli *i sar.* 2013, Van Kaer *i sar.* 2019). Pored toga, Treg ćelije proizvode adozin koji takođe deluje antiinflamacijski (Ernst *i sar.* 2010). Osim navedenih ćelija koje imaju važnu ulogu u patogenezi EAE, utvrđeno je učešće i drugih ćelija imunskog sistema, poput ćelija urođene imunosti (Van Kaer *i sar.* 2019). Uprkos određenim odstupanjima, EAE model u odnosu na sve ostale modele MS u najvećoj meri reflektuje kliničke, imunološke i histopatološke osobine humane bolesti (Van der Staar 2012) i predstavlja trenutno njen najprihvatljiviji animalni model koji je pružio brojna saznanja o patologiji i terapijskom potencijalu različitih supstanci. Ipak, on ne reprezentuje svu složenost MS (Bjelobaba *i sar.* 2017). Npr. EAE je autoimunska bolest, dok u slučaju MS za to ne postoje dokazi (Baker & Amor 2014). Pored toga, u patogenezi EAE ključnu ulogu igraju Th1 i Th17 CD4⁺ limfociti, dok je poznato da u lezijama pacijenata obolelih od MS dominiraju CD8⁺ limfociti (Salou *i sar.* 2015). Glavni nedostaci animalnog modela vezani su za razlike u aktivnosti urođene i stečene imunosti koje reflektuju evolutivnu udaljenost glodara i čoveka, smanjenu genetičku varijabilnost sojeva životinja ukrštenih u srodstvu u odnosu na ljude, kao i smanjenu izloženost spoljašnjim faktorima/patogenima i posledičnu nezrelost imunskog sistema (Bert *i sar.* 2011).

Kao što je već pomenuto, ključnu ulogu u otpočinjanju kao i toku bolesti kod EAE pored perifernih imunskih ćelija - CD4⁺ T-limfocita i dendritskih ćelija, monocita/makrofaga, imaju i rezidentne ćelije CNS - astrociti i mikroglija.



Slika 2. Mehanizmi patogeneze EAE. Nakon imunizacije, dendritske ćelije u limfnom čvoru prezentuju antigen naivnim CD4⁺ T-limfocitima čime ih aktiviraju i nastaje Th1 i Th17 proinflamacijski fenotip. Pored toga, dolazi do diferencijacije naivnih B-limfocita u plazma ćelije koje aktivno proizvode antitela, kao i prodora monocita iz krvi u moždani parenhim gde se diferenciraju u makrofage. Ulazak pomenutih ćelija kroz KMB u CNS dovodi do aktivacije mikroglije i astrocita, a zajedno sa oslobađanjem proinflamacijskih citokina, NO, glutamata, antitela itd. izaziva oštećenje mijelinskog omotača i aksona. Modifikovano prema Constantinescu *i sar.* (2011).

1.2. Astrociti

Astrociti su glijske ćelije zvezdastog oblika koje su opisane od strane nekoliko neuroanatomata u drugoj polovini XIX veka (Parpura & Verkhratsky 2012). Kod čoveka, astrociti su najbrojnije i najraznovrsnije glijske ćelije (He *i sar.* 2007), sa ključnom ulogom u fiziologiji i patofiziologiji CNS (Franke *i sar.* 2012). Zajedno sa oligodendrocitima, ependimskim ćelijama, ćelijama horoidnog pleksusa, tancitama itd. čine makrogliju koja je neuroektodermalnog porekla. Astrociti nastaju od nervnih matičnih ćelija (NMĆ) iz ventrikularne zone, pri čemu postoji malo dokaza o nastanku novih astrocita u fiziološkim uslovima, dok je proliferacija veoma izražena tokom aktivacije astrocita i nastanka glijskog ožiljka (Correale & Farez 2015). U odnosu na morfologiju i tkivnu zastupljenost, postoje dva osnovna tipa astrocita kod sisara: protoplazmatični astrociti sa radialno orijentisanim nastavcima prisutni u sivoj masi i fibrozni astrociti čiji se nastavci pružaju paralelno sa pružanjem nervnih vlakana u beloj masi CNS (Oberheim *i sar.* 2012). Pored ova dva tipa, postoje i specijalizovani astrociti poput Milerove glije u mrežnjači, Bergmanove glije i plaštanih astrocita u malom mozgu itd.

(Correale & Farez 2015, Cunningham *i sar.* 2018). Astroцити čoveka pokazuju veću morfofunkcionalnu raznovrsnost u odnosu na astroците glodara (Oberheim *i sar.* 2012).

Astroцити učestvuju u procesima razvića nervnog sistema, sinaptogeneze, sazrevanja, održavanja i plastičnosti sinapsi, održavanja KMB, a imaju i ključnu ulogu u homeostazi CNS (Simard & Nedergaard 2004). Učestvuju u homeostazi jona i neurotransmitera, transportu vode, regulaciji lokalnog krvotoka i hemorepciji (Butt *i sar.* 2018). U međucelijskoj signalizaciji astroцити koriste različite signalne molekule među kojima je adenzin - 5' - trifosfat (ATP) jedan od najznačajnijih (Franke *i sar.* 2012). Svojim stopalima formiraju *glia limitans* u okviru KMB koja, u fiziološkim uslovima, sprečava ulazak ćelija krvne loze u parenhim CNS (Correale & Farez 2015).

U neuroinflamaciji prisutnoj u MS/EAE, astroцити učestvuju u nastanku, toku i oporavku od bolesti. U uslovima inflamacije dolazi do promena karakterističnih za astrogliozu (Sofroniew, 2015) - astroцити proliferišu i uvećavaju veličinu ćelijskog tela, njihovi nastavci povećavaju dijametar i skraćuju se, a raste ekspresija glijskog fibrilarnog kiselog proteina (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP) koji predstavlja marker ovih ćelija (Markiewicz & Lukomska 2006). Aktivirani astroцити mogu da ispoljavaju proinflamacijska ili neuroprotektivna svojstva (Correale & Farez 2015, Pekny *i sar.* 2016, Yi *i sar.* 2019). Nedavno su otkrivena dva fenotipa aktiviranih astrocita sa proinflamacijskim, odnosno antiinflamacijskim svojstvima, označena kao A1 i A2 tip astrocita (Zamanian *i sar.* 2012, Liddelov *i sar.* 2017, Haindl *i sar.* 2019). Pokazano je *in vitro* da A1 fenotip astrocita nastaje zajedničkim dejstvom interleukina 1 α (IL-1 α), faktora nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor, TNF α) i proteina komplementa C1q i učestvuje u oštećenju neurona i oligodendrocita. Pored toga, ovaj tip astrocita indukuje i apoptozu, pomaže aktivaciju Th ćelija, njihovu proliferaciju i funkciju. Nasuprot tome, A2 fenotip astrocita ima neuroprotektivnu ulogu i stimuliše rast i preživljavanje neurona, kao i popravku oštećenih sinapsi (Liddelov & Barres 2017).

Propagacija MS najverovatnije se dešava prema pretpostavljenoj hipotezi „dva talasa“ (Yi *i sar.* 2019). Prema ovoj hipotezi, nakon aktivacije u perifernim limfnim organima, T-limfociti dospevaju u perivaskularni prostor CNS gde ih reaktiviraju APC, što predstavlja prvi talas. Reaktivirani T-limfociti proliferišu i oslobađaju proinflamacijske citokine: TNF α , IL-17, granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija (eng. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i IFN γ . Pomenuti faktori deluju na ćelije CNS, prevashodno mikrogliju i astroците, koji kao odgovor na njih oslobađaju hemoatraktante, hemokine i citokine što dalje privlači drugi talas T-limfocita i makrofaga u parenhim CNS (Slika 2). Na taj način formira se pozitivna povratna sprema sa proinflamacijskim efektima, u kojoj astroцити imaju značajnu ulogu. Pored pojačanog oslobađanja hemokina i citokina, u aktiviranim astroцитima povišena je ekspresija stotine gena koji učestvuju u prezentaciji antigena, oksidativnom stresu, inflamaciji, oštećenju KMB i signalnoj transdukciji (Yi *i sar.* 2019). Astroцити svoje proinflamacijske efekte ostvaruju putem tri mehanizma: oštećenjem KMB, aktivacijom imunskih ćelija i sprečavanjem remijelinizacije.

Oštećenje KMB astroцити postižu izazivanjem smanjenja prisustva proteina čvrstih veza na endotelnim ćelijama, kao i podsticanjem njihove apoptoze oslobađanjem interleukina-1 β (IL-1 β), TNF α , hemokin liganda 2 (eng. C-C motif chemokine ligand 2, CCL2), azot – monoksida (NO), glutamata i vaskularnog endotelnog faktora rasta A (eng. Vascular endothelial growth factor A, VEGF A) (Thiel & Audus 2001, Didier *i sar.* 2003, Stamatovic *i sar.* 2003, Argaw *i sar.* 2012, Rochfort *i sar.* 2016, Vazana *i sar.* 2016, Yi *i sar.* 2019). Pored toga, astroцити aktiviraju endotelne ćelije i podstiču ih na produkciju hemokina, a dovode i do degradacije komponenti bazalne membrane KMB pomoću

matriksnih metaloproteinaza (*eng.* Matrix metalloproteinase, MMP) (Maeda & Sobel 1996, Watson *i sar.* 1996, Estess *i sar.* 1999, Wang *i sar.* 2014, Yi *i sar.* 2019).

Astroцити učestvuju u regrutaciji leukocita i mikroglije pomoću CD44, hemokin liganda 10 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL10), hemokin liganda 12 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12), CCL2 i hemokin liganda 20 (*eng.* C-C motif chemokine ligand 20, CCL20) (Haegel *i sar.* 1993, Ambrosini *i sar.* 2005, McCandless *i sar.* 2008, Kim *i sar.* 2014, Mills Ko *i sar.* 2014, Yi *i sar.* 2019). Astroцити takođe utiču na reaktivaciju encefalitogenih CD4⁺ T-limfocita (Liu *i sar.* 2007, Broux *i sar.* 2015, Yi *i sar.* 2019) i pojačavaju odgovor CD8⁺ T-limfocita (Krumbholz *i sar.* 2005, Saikali *i sar.* 2010, Yi *i sar.* 2019). Pored toga, oslobađanjem nekolicine faktora među kojima je najznačajniji interleukin 6 (IL-6) aktivirani astroцити podstiču i aktivaciju mikroglije (Savarin *i sar.* 2015).

Pokazano je i da astroцити učestvuju u oštećenju mijelinskog omotača pomoću MMP (Maeda & Sobel 1996) i sprečavanju remijelinizacije i oporavka tkiva formiranjem glijskog ožiljka (Bannerman *i sar.* 2007, Yi *i sar.* 2019). Uz to, astroцити sprečavaju remijelinizaciju putem inhibicije migracije OPC na mesto demijelinizacije posredstvom hemokin liganda 1 (*eng.* C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1), netrina 1 i semaforina 3a (Vora *i sar.* 2012, Boyd *i sar.* 2013, Tepavcevic *i sar.* 2014, Yi *i sar.* 2019) i diferencijacije OPC posredstvom IL-6, faktora rasta fibroblasta 2 (*eng.* fibroblast growth factor 2, FGF2), koštanog morfogenetskog proteina 4 (*eng.* bone morphogenetic factor 4, BMP4), CXCL10 i TNF- α (Zhou *i sar.* 2006, Sabo *i sar.* 2011, Bonora *i sar.* 2014, Moore *i sar.* 2015, Petkovic *i sar.* 2016, Yi *i sar.* 2019). Pored toga, astroцити mogu da utiču na smanjenje oporavka oštećenog tkiva oslobađanjem glutamata, reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* reactive oxygen species, ROS) i NO delujući ekscitotoksično i izazivajući ćelijsku smrt endotelnih ćelija, OPC, oligodendrocita i neurona (Tran *i sar.* 1997, Liu *i sar.* 2001, Mossakowski *i sar.* 2015, Wang *i sar.* 2017, Yi *i sar.* 2019). Dodatno, proinflamacijski efekti astrocitа delom su posredovani P2Y purinskim receptorima, a predložen je i mehanizam disregulacije purinske signalizacije u hroničnoj inflamaciji koja se javlja tokom MS (Oliveira-Giacomelli *i sar.* 2018).

Nasuprot brojnim dokazima o proinflamacijskim dejstvima astrocitа tokom MS/EAE, istraživanja su pokazala da su simptomi bolesti teži kod miševa kod kojih nije došlo do aktivacije astrocitа (Toft-Hansen *i sar.* 2011, Lopes Pinheiro *i sar.* 2016), što ukazuje na to da astroцити imaju pretežno protektivnu ulogu tokom ove bolesti (Yi *i sar.* 2019). Postoji korpus dokaza u prilog tvrdnjama o protektivnom dejstvu astrocitа kroz ponovno učvršćivanje KMB, suzbijanje inflamacije, podsticanje remijelinizacije i regeneracije aksona, kao i neuroprotekcije (Yi *i sar.* 2019). Pored toga, pokazano je *in vitro* da pod dejstvom citokina oslobođenih iz aktivirane mikroglije dolazi do smanjenja ekspresije P2Y₁ receptora na astroцитима što dovodi do nastanka neuroprotektivnog fenotipa (Shinozaki *i sar.* 2017). Antiinflamacijsku ulogu astroцити ostvaruju višestrukim efektima na potporu *glia limitans* (Agrawal *i sar.* 2006, Masaki *i sar.* 2013, Masaki 2015), ograničavanjem mesta povrede i inflamacije formiranjem barijere nalik glijskom ožiljku (Voskuhl *i sar.* 2009), suzbijanjem dejstva APC (Zhang *i sar.* 2012, Mittal & Roche 2015), suzbijanjem odgovora makrofaga (Koning *i sar.* 2009), stimulisanjem nastanka Treg fenotipa limfocita oslobađanjem CXCL12 (Meiron *i sar.* 2008) i TGF β (Gimsa *i sar.* 2004), kao i ćelijske smrti Th limfocita (Xiao *i sar.* 2000, Hara *i sar.* 2011, Steelman *i sar.* 2013, Wang *i sar.* 2013, Yi *i sar.* 2019). Pored navedenog, astroцити svoje protektivno dejstvo ostvaruju i posredstvom različitih signalnih molekula podstičući proliferaciju, migraciju i diferencijaciju OPC, a indukcijom ekspresije antioksidativnih enzima učestvuju i u zaštiti od oksidativnog stresa u neuroinflamacijskim uslovima tokom MS/EAE (Yi *i sar.* 2019).

1.3. Mikroglia i makrofagi

Mikroglijske ćelije predstavljaju glavne ćelije urođene imunosti i rezidentne makrofage CNS i čine prvu liniju odbrane CNS (O'Loughlin *i sar.* 2018). One čine ~10% ćelija CNS, a nastaju od ćelija mezodermalnog porekla tokom prvog trimestra embrionalnog razvića kada migriraju u CNS i imaju ključnu ulogu u njegovom razviću, kao i u normalnoj fiziologiji u adultnom periodu (Kettenmann *i sar.* 2011). Tokom razvića, dolazi do programirane ćelijske smrti gotovo polovine nastalih neurona i glijskih ćelija, posebno oligodendrocita u čijem uklanjanju učestvuju mikroglijske ćelije, kao jedine profesionalne fagocitujuće ćelije u CNS (Wolf *i sar.* 2017). One prepoznaju ćelije koje prolaze kroz proces programirane ćelijske smrti, migriraju do njih i fagocituju ih (Wolf *i sar.* 2017). Dodatno, kroz proces "orezivanja" mikroglia uklanja nepotrebne sinapse fagocitozom, (Kettenmann *i sar.* 2013, Siskova & Tremblay 2013, Hristovska & Pascual 2015, Hong *i sar.* 2016). Smatra se da se ovaj proces odigrava obeležavanjem tih sinapsi proteinima sistema komplementa, C1q i C3, a pokazano je i da hemokin fraktalkin (*eng.* C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1, CX3CL1) ima takođe ulogu u ovom procesu, pri čemu su mikroglijske ćelije jedine u CNS koje ekspimiraju receptor za ovaj hemokin - CX3CR1 (Wolf *i sar.* 2017). S druge strane, mikroglia podstiče proliferaciju NMC oslobađanjem trofičkih faktora, kao i preživljavanje neurona (Bilimoria & Stevens 2015, Filiano *i sar.* 2015, Michell-Robinson *i sar.* 2015, Butt *i sar.* 2018).

U adultnom CNS prisutna je „mirujuća“ mikroglia ramifikovane morfologije: malog ćelijskog tela i brojnih, izrazito razgranatih, tankih nastavaka (Kettenmann *i sar.* 2011) koja ekspimirira P2Y₁₂ receptor (O'Loughlin *i sar.* 2018). Iako označena kao mirujuća, mikroglia je zapravo konstantno aktivna u okviru svog teritorijalnog domena: njeni nastavci su stalno u pokretu i nadziru svoju okolinu i potencijalna oštećenja (Davalos *i sar.* 2005, Nimmerjahn *i sar.* 2005). Izrazito brzi pokreti nastavaka kojima jedna mikroglijska ćelija kroz svega nekoliko sati pregleda svoj teritorijalni domen omogućavaju kontinualnu zaštitu ili potporu prilikom nailaženja na malo oštećenje krvnog suda ili izolovani slučaj oštećenja neurona, ali omogućavaju i brze reakcije u slučaju većih oštećenja tkiva ili inflamacije (Davalos *i sar.* 2005). Danas je poznato da postoji heterogenost mikroglije u pogledu funkcije, lokalizacije i podtipova (Wolf *i sar.* 2017). Pokazano je da mikroglia bele i sive mase različito ekspimiraju (Anderson *i sar.* 2007) imunoregulatorne molekule (de Haas *i sar.* 2008), što verovatno ukazuje na to da je mijelinu prisutnom u beloj masi potreban ili neophodan određen mikroglijski fenotip kakav nije prisutan u sivoj masi (Kettenmann *i sar.* 2011). Razlike među subpopulacijama mikroglijskih ćelija mogu imati uticaj na razviće, fiziološku funkciju, ali i podložnost oštećenjima prilikom inflamacije (Hristova *i sar.* 2010). U kontekstu neuroinflamacije u bolestima u kojima dolazi do oštećenja mijelinskog omotača i smrti oligodendrocita, značajno je pomenuti da heterogenost mikroglije u određenim regionima bele i sive mase CNS, prati i heterogenost subpopulacija oligodendrocita (Kitada & Rowitch 2006, Kettenmann *i sar.* 2011).

Mikroglia zadobija svoj aktivirani fenotip u odgovoru na inflamaciju, povredu, infekciju i neurodegeneraciju, nakon čega migrira na mesto povrede i prolifериše. Aktivirani fenotip podrazumeva ameboidni oblik mikroglije, sa uvećanim telom, smanjenim brojem skraćenih i zadebljanih nastavaka, izmenjenom ekspresijom molekula koji učestvuju u međućelijskoj komunikaciji, kao i komunikaciji ćelije sa vanćelijskom sredinom i oslobađanjem medijatora inflamacije (Gertig & Hanisch 2014, Bjelobaba *i sar.* 2017). Po aktivaciji, mikroglia ispoljava molekule MHC II, CD14 i CD40 (Mattiace *i sar.* 1990, Bozic *i sar.* 2015, Janova *i sar.* 2016). Aktivirana mikroglia tokom inflamacije moduliše odgovor imunskih, nervnih i glijskih ćelija prezentacijom antigena T-limfocitima, oslobađanjem

citokina koji utiču na efektorske funkcije tih ćelija i uklanjanjem oštećenih delova tkiva fagocitozom (Ransohoff & Perry 2009).

Pored mikroglije, najbrojnije imunske ćelije u aktivnim MS/EAE lezijama u mozgu i kičmenoj moždini čine makrofagi. Makrofagi mogu biti poreklom iz krvi, nastali diferencijacijom monocita, ili iz perivaskularnog prostora, horoidnog pleksusa i moždanih ovojnica (Bogie *i sar.* 2014). Smatra se da je mikroglija dominantno prisutna u začecima novih, aktivnih lezija, kao i na mestima širenja hroničnih lezija, a da makrofagi u lezije dospevaju nakon inicijalnog oštećenja mijelina i fagocitoze njegovih ostataka i dalje regrutuju limfocite u CNS (O'Loughlin *i sar.* 2018). U prilog tome govore i studije u kojima je odsustvo mikroglijskih ćelija ili smanjena ekspresija mikroglijskih gena dovela do ublažavanja simptoma EAE i demijelinizacije (O'Loughlin *i sar.* 2018). Međutim, mikroglija može poprimiti fenotip makrofaga (Kettenmann *i sar.* 2011), te je distinkcija ova dva tipa ćelija u uslovima neuroinflamacije veoma kompleksna. Tokom neuroinflamacije, fenotip mikroglije se menja od proinflamacijskog ka antiinflamacijskom, koji doprinosi konačnom razrešenju neuroinflamacije. Mikroglija i makrofagi u ranim aktivnim lezijama pokazuju dominantnu ekspresiju proinflamacijskih markera sa ulogom u fagocitozi (CD68), prezentaciji antigena (MHC I i II, CD86) i u produkciji ROS. Većina studija ukazuje na slabu antigen – prezentujuću funkciju mikroglije u odnosu na makrofage, ali svakako ukazuje na to da one mogu modulirati ili uvećati inflamaciju predvođenu T-limfocitima (O'Loughlin *i sar.* 2018). U kasnijim fazama aktivnih lezija, ćelije stiču intermedijarni fenotip i počinju da koeksprimiraju i antigene koji se vezuju za antiinflamacijski fenotip (CD206 i CD163) (Zrzavy *i sar.* 2017, O'Loughlin *i sar.* 2018). Kako makrofagi, prema profilisanju genske ekspresije, pokazuju izrazito fagocitujući i inflamacijski fenotip, dok mikroglija ima supresovan ćelijski metabolizam na početku bolesti, smatra se da ove ćelije imaju različite uloge u patologiji i da, najverovatnije, makrofagi monocitnog porekla u blizini Ranvijerovih suženja iniciraju demijelinizaciju, dok je mikroglija aktivna u uklanjanju ostataka oštećenog mijelina i ćelija (Yamasaki *i sar.* 2014). Analiza transkriptoma mikroglijskih ćelija MS pacijenata pokazala je i regionalne razlike: u sivoj masi povećana je ekspresija gena za interferone tipa I, a u beloj gena za jedarni faktor κ B (*eng.* Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) signalni put. Takođe, mikroglijske ćelije u sivoj masi pojačano ekspimiraju gene uključene u glikolizu i homeostazu gvožđa, dok u beloj masi povećavaju ekspresiju gena koji učestvuju u metabolizmu lipida (van der Poel *i sar.* 2019).

U zavisnosti od specifičnog miljea faktora prisutnih u tkivu tokom inflamacije, mikroglija i makrofagi polarizuju se ka jednom od dva aktivaciona fenotipa okarakterisana u *in vitro* uslovima i označena kao M1 i M2 (Mosser & Edwards 2008, Cherry *i sar.* 2014). Proinflamacijski M1 fenotip makrofaga nastaje klasičnom aktivacijom pod dejstvom lipopolisaharida (*eng.* lipopolysaccharide, LPS), IFN γ i u uslovima hipoksije, a karakteriše se produkcijom proinflamacijskih citokina TNF α i IFN γ , kao i ROS i NO. Proinflamacijski fenotip mikroglije/makrofaga dalje stimuliše reaktivaciju i diferencijaciju T-limfocita u Th1 i Th17 fenotip koji kroz uspostavljenu pozitivnu povratnu spregu potenciraju dalju proinflamacijsku aktivaciju mikroglije/makrofaga, što zajednički rezultuje oštećenjem KMB, neurodegeneracijom i hroničnom inflamacijom. Noviji podaci pokazuju da je za uspešan proces remijelinizacije neophodna smrt tipa nekroptoze proinflamacijskog fenotipa mikroglije i repopulacija antiinflamacijskim fenotipom (Lloyd *i sar.* 2019).

M2 fenotip mikroglije/makrofaga predstavlja alternativno aktivirani, antiinflamacijski fenotip, indukovan i okarakterisan *in vitro* nakon dejstva interleukina 4 (IL-4) ili interleukina 13 (IL-13) (Saijo & Glass 2011, Bjelobaba *i sar.* 2017). Fenotip mikroglije nalik M2, kakav je uočen *in vivo*, karakteriše se tankim ćelijskim telima i granatim nastavcima (Gonzalez & Pacheco 2014). Ovakav fenotip

karakteriše se produkcijom neurotrofičnih faktora poput faktora rasta neurona (*eng. nerve growth factor, NGF*), insulinskog faktora rasta (*eng. insulin growth factor 1, IGF-1*), kao i antiinflamacijskih citokina IL-10 i TGF β koji zaustavljaju proces inflamacije, sprečavaju dalje oštećenje neurona i stimulišu uklanjanje ostataka oštećenih ćelija i mijelina što je neophodno za proces remijelinizacije (Mayo *i sar.* 2012, Voss *i sar.* 2012). Osim toga, M2 mikroglija aktivno regrutuje OPC na mesto lezije i oslobađa faktore koji stimulišu proces remijelinizacije (Olah *i sar.* 2012, Miron *i sar.* 2013).

U *in vivo* uslovima, međutim, aktivirana mikroglija i makrofagi najčešće eksprimiraju čitav spektar odlika intermedijarnog M1/M2 fenotipa koji se po osobinama i funkciji nalaze između M1 i M2 fenotipa i označavaju se kao fenotip nalik M1, odnosno nalik M2 (*eng. M1-like, M2-like phenotype*) (Martinez & Gordon 2015, Ransohoff 2016). U MS lezijama uočeni su intermedijarni M1/M2 fenotipovi mikroglije i makrofaga (Vogel *i sar.* 2013, Peferoen *i sar.* 2015) pri čemu je proinflamacijski fenotip nalik M1 bio dominantno prisutan tokom akutne odnosno rane faze bolesti (Gao & Tsirka 2011).

Brojni literaturni podaci ukazuju na to da mikroglija i astrociti imaju ključnu ulogu u neuroinflamaciji prisutnoj tokom MS/EAE (Mensah-Brown *i sar.* 2011, Bjelobaba *i sar.* 2018). Zajedno, mikroglija i astrociti pokreću proces neuroinflamacije koji rezultuje demijelinizacijom, ćelijskom smrću i oštećenjem aksona (Murphy *i sar.* 2010, Brambilla *i sar.* 2014). Tokom MS, koaktivacija mikroglije/makrofaga i astrocita vodi ka hroničnoj neuroinflamaciji i ireverzibilnoj neurodegeneraciji (Brosnan & Raine 2013, Lassmann 2018), dok tokom akutne monofazne bolesti prisutne u EAE dolazi do razrešenja neuroinflamacije, popravke oštećenog mijelinskog omotača i oporavka tkiva. Brojni literaturni podaci ukazuju da to koji će se tip neuroinflamacije razviti, hronični ili akutni, zavisi od inflamacijskog fenotipa aktivirane mikroglije/makrofaga i astrocita (Brosnan & Raine 2013, Cherry *i sar.* 2014). Nedavno je pokazano da mikroglija suprimira sekundarnu progresiju EAE (Tanabe *i sar.* 2019).

Odnos mikroglije i oligodendrocita u patologiji MS je složen. Aktivirana mikroglija oslobađa brojne pomenute proinflamacijske citokine koji mogu imati štetno dejstvo na okolne ćelije, uključujući i oligodendrocite (O'Loughlin *i sar.* 2018). Takođe, kod obolelih osoba u aktivnim MS lezijama, kao i u beloj i sivoj masi normalnog izgleda (*eng. normal appearing white and gray matter, NAWM i NAGM*), mikroglija oslobađa u velikim količinama ROS i NO, usled ekspresije NADPH oksidaze, mijeloperoksidaze i inducibilne sintaze azot oksida (*eng. inducible nitric oxide synthetase, iNOS*) (Mahad *i sar.* 2015, O'Loughlin *i sar.* 2018) i dovodi do akutnog ili hroničnog oksidativnog stresa, oštećenja mitohondrija i disfunkcije respiratornog lanca i energetskog metabolizma, što je kod energetski zahtevnih ćelija kao što su oligodendrociti pogubno (O'Loughlin *i sar.* 2018). Oksidativna oštećenja prisutna su i u animalnim modelima MS, ali u manjoj meri (Nikic *i sar.* 2011). Takođe, sami oligodendrociti u uslovima inflamacije i stresa eksprimiraju medijatore inflamacije, poput CXCL10, CCL2 i hemokin liganda 3 (*eng. C-C motif chemokine ligand 3, CCL3*) koji učestvuju u regrutaciji mikroglije na mesto oštećenja i u modulaciji njenog aktivnog stanja (Peferoen *i sar.* 2014).

1.4. Oligodendrociti

Za razliku od mikroglije i astrocita, koji igraju ključne uloge u procesu neuroinflamacije, oligodendrociti su zbog izuzetno aktivnog metabolizma veoma podložni oštećenjima u brojnim patologijama CNS, a posebno tokom MS. Butt i saradnici navode da je specijalizovana uloga ovih ćelija u formiranju mijelinskog omotača oko aksona u CNS potvrđena tek 60 - ih godina prošlog veka upotrebom elektronskog mikroskopa (Butt *i sar.* 2018). Mijelinski omotač sačinjavaju hipertrofirane

ćelijske membrane zrelih oligodendrocita koje svojim nastavcima višestruko koncentrično obavijaju segmente aksona formirajući pravilne internoduse, razdvojene delovima bez mijelina – nodusima. Mijelin se odlikuje visokim sadržajem lipida sa malim udelom proteina čija je uloga učvršćivanje veza između lamela mijelinskog omotača. Među lipidima najzastupljeniji su holesterol, fosfolipidi i glikolipidi, a među proteinima: PLP, MBP i 2',3'- ciklična nukleotid 3' – fosfodiesteraza (CNPaza) (Jahn *i sar.* 2009, Bjelobaba *i sar.* 2017). Formiranjem mijelinskog omotača koji omogućava koncentrisanje jonskih kanala u zoni nodusa, oligodendrociti obezbeđuju brzo skokovito prostiranje akcionih potencijala, a pružaju i metaboličku i mehaničku potporu aksonima. U skladu sa tim, brojne studije pokazuju da su aksoni i oligodendrociti međusobno funkcionalno zavisni i da je mijelinski omotač ključan za funkciju i dugotrajnost aksona (Butt *i sar.* 2018).

Zreli oligodendrociti koji formiraju mijelinski omotač nastaju diferencijacijom OPC tokom embrionalnog razvića ili perinatalnog perioda, ali i tokom adultnog perioda. Budući da je mijelinizacija proces koji traje do kasnog adultnog perioda – u kori velikog mozga kod ljudi čak i do 50. godine života (Yeung *i sar.* 2014), neophodno je da postoji populacija OPC i tokom adultnog perioda od kojih će nastajati zreli oligodendrociti. Postojanje takve populacije takođe je bitno i u slučajevima oštećenja mijelinskog omotača tj. demijelinizacije, zbog mogućnosti nastanka novih zrelih oligodendrocita i reparacije mijelinskog omotača – remijelinizacije. Smatra se da populacija NG2 ćelija prisutnih u adultnom CNS predstavlja upravo tu populaciju OPC, što je i dokazano u studijama koje su se bavile analizom embrionalnog porekla ćelija u CNS i koje ukazuju da približno 30% oligodendrocita u adultnom mozgu nastaje od NG2 ćelija (Nishiyama *i sar.* 2016, Butt *i sar.* 2018). NG2 ćelije, zbog svoje specifičnosti, predstavljaju četvrti tip glijških ćelija prisutan u čitavom parenhimu CNS (Butt *i sar.* 2018). Karakterišu se ekspresijom NG2 hondroitin sulfat proteoglikana i α receptora za faktor rasta trombocita (*eng.* platelet derived growth factor receptor α , PDGFR α), ali ne ekspimiraju markere za rane OPC poput A2B5, ili markere zrelih oligodendrocita poput CNPaze (Verkhatsky & Butt 2013). Iako je pokazano da su upravo NG2+PDGFR α + ćelije te koje, tokom embrionalnog razvića i adultnog perioda formiraju oligodendrocite (Verkhatsky & Butt 2013), razlog zbog kog se NG2 ćelije posmatraju kao poseban tip glijških ćelija, je taj što NG2 ćelije formiraju kontakte sa neuronima što predstavlja njihovu specifičnost i zato se i nazivaju sinantociti (Butt *i sar.* 2018)

Demijelinizacija prisutna u MS/EAE podrazumeva smrt zrelih oligodendrocita i oštećenje mijelinskog omotača. Nije poznato da li do ovih događaja dolazi zbog inflamacije u CNS ili izražene podložnosti oligodendrocita oksidativnom stresu usled velike metaboličke aktivnosti kao i niske koncentracije antioksidativnog glutaciona i visoke koncentracije gvožđa unutar ovih ćelija (Bradl & Lassmann 2010). Kako u ranim aktivnim lezijama u sivoj i beloj masi nisu prisutne infiltrirane imunske ćelije, ali jeste aktivirana mikroglija zajedno sa umirućim oligodendrocitima, pretpostavlja se da je proinflamacijska aktivacija mikroglije inicijalni događaj ove patologije (Miljkovic & Spasojevic 2013) ili da postoji sadejstvo sa solubilnim faktorima koje oslobađaju imunske ćelije prisutne u perivaskularnim prostorima u blizini lezija (Lassmann 2018). Dodatno, jedan od faktora u patologiji MS može biti i izmenjena zastupljenost različitih subpopulacija oligodendrocita uočena kod pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (Jäkel *i sar.* 2019).

Pored oksidativnog stresa brojni faktori su uključeni u oštećenje i smrt oligodendrocita. Usled oksidativnog stresa, kao i dejstva proinflamacijskih faktora, povrede ili infekcije, može doći i do aktivacije enzima sfingomijelinaza koji razlaže sfingomijelin, konstituent mijelinskog omotača, do ceramida. Ceramid aktivira proapoptotske gene koji dovode do smrti oligodendrocita (Bradl & Lassmann 2010). Pored toga, oligodendrociti ekspimiraju receptore koji ih čine podložnim

ekscitotoksičnoj smrti, poput receptora za ATP, glutamat, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionsku kiselinu (AMPA) i kainat (Bradl & Lassmann 2010). Inflamacijski citokini poput TNF α mogu da izazovu smrt zrelih oligodendrocita direktnim dejstvom na ove ćelije. (Jurewicz *i sar.* 2005). IFN γ ima nešto složeniju ulogu: dovodi do smrti proliferišućih OPC, kao i nezrelih oligodendrocita u nešto manjoj meri, dok na zrele oligodendrocite uglavnom nema uticaja (Horiuchi *i sar.* 2006, Bradl & Lassmann 2010). S druge strane, inflamacijski citokini mogu i indirektno da dovedu do smrti oligodendrocita, aktivacijom mikroglije i astrocita koji proizvode ROS i NO (Bradl & Lassmann 2010). Takođe, oligodendrociti, kao i ostale ćelije CNS, u uslovima inflamacije ekspimiraju MHC I molekule za prezentaciju (auto)antigena čime postaju podložni citotoksičnom dejstvu CD8⁺ T-limfocita, što je važan mehanizam u MS patologiji (Bradl & Lassmann 2010).

Remijelinizacija je proces ponovnog formiranja mijelinskog omotača oko demijelinizovanih nervnih vlakana prisutnih u MS lezijama koji može u izvesnoj meri da povрати funkciju tih aksona. Smatra se da proces remijelinizacije vrše OPC, a ne preostali zreli oligodendrociti, iako noviji podaci ukazuju da bi i zreli oligodendrociti mogli imati ulogu u ovom procesu (Bradl & Lassmann 2010, Jäkel *i sar.* 2019, Nave & Ehrenreich 2019). Proces remijelinizacije je izrazito složen, sastoji se od nekoliko mehanizama koji moraju biti dobro koordinisani da bi proces bio uspešan. Ti mehanizmi podrazumevaju proliferaciju OPC, njihovu migraciju na mesto lezije, diferencijaciju u zrele oligodendrocite, uspostavljanje kontakta sa oštećenim aksonima i njihovu remijelinizaciju.

Brojni faktori koji se oslobađaju tokom neuroinflamacije utiču na proliferaciju, preživljavanje, migraciju i diferencijaciju OPC. Za TNF α i IFN γ je pokazano da inhibiraju diferencijaciju, a za TNF α i IL-1 β da inhibiraju proliferaciju i izazivaju apoptozu OPC, čime se usporava proces remijelinizacije (Peferoen *i sar.* 2014). Nasuprot tome, TGF β inhibira proliferaciju OPC i podstiče diferencijaciju oligodendrocita čime doprinosi remijelinizaciji. IL-6 takođe utiče na proliferaciju i diferencijaciju oligodendrocitnih progenitora, dok faktori rasta poput IGF-1, PDGF i FGF stimulišu proliferaciju OPC, a uključeni su i u migraciju i remijelinizaciju (Peferoen *i sar.* 2014). Hemokini koje proizvode astrociti – CXCL1 i CXCL12 stimulišu proliferaciju OPC, dok CXCL1 utiče i na njihovu migraciju (Kadi *i sar.* 2006). Adenozin koji nastaje hidrolizom ATP u vanćelijskoj sredini, ima različita dejstva na maturaciju OPC, u zavisnosti od koncentracije i receptora preko kojih deluje (Coppi *i sar.* 2015). Kod većeg broja ispitivanih MS pacijenata, postoji neophodan broj OPC za uspešan proces remijelinizacije, što navodi na zaključak da je problem u procesu njihovog sazrevanja (Kuhlmann *i sar.* 2008). Tako, na sposobnost remijelinizacije utiču i razlike u ekspresiji transkripcionih faktora Olig1 i Olig2, koji su prisutni u različitim fazama razvića. (Bradl & Lassmann 2010). Pored toga, stepen remijelinizacije je veoma različit kod svakog pacijenta i zavisi od pozicije lezije, pa se tako remijelinizacija češće dešava u subkortikalnom regionu u odnosu na periventrikularnu belu masu (Lassmann 2018).

2. Purinska signalizacija

Signalna uloga purinskih nukleotida uočena je još u prvoj polovini 20. veka u kardiovaskularnom sistemu zamorčeta (Drury & Szent-Gyorgyi 1929). Koncept prema kom ATP ima signalnu ulogu u vanćelijskoj sredini predložio je 1972. godine britanski naučnik Džefri Burnstok (Burnstock 1972). Njegov koncept zasnovan je na otkriću signalne uloge ATP na ne-adrenergičkim, ne-holinergičkim inhibitornim vlaknima koja inerviraju glatke mišićne ćelije zamorčeta. Četiri godine nakon predstavljanja ove hipoteze otkriveno je da ATP služi kao ko-transmitter većine nervnih vlakana u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Burnstock 1976). Iako je hipoteza o purinskoj signalizaciji dugo nailazila na osporavanje naučne zajednice, ona je tokom poslednje decenije prošlog veka konačno

prihvaćena nakon uspješne farmakološke karakterizacije i kloniranja komponenti purinskog signalnog sistema (Burnstock 2012).

Sistem purinske signalizacije nastao je veoma rano tokom evolucije i evolutivno je vrlo konzerviran (Burnstock & Verkhratsky 2009). Kod primitivnih beskičmenjaka otkriveni su receptori nalik sisarskim purinskim receptorima, a otkriven je i purinski signalni sistem kod biljaka (Burnstock 2011). Kao signalni molekul ATP ostvaruje kratkotrajne efekte u procesima neurotransmisije, neuromodulacije i sekrecije, dok u procesima ćelijske proliferacije, diferencijacije i smrti prilikom razvića i regeneracije ostvaruje dugotrajne trofičke efekte. (Burnstock 2011). Purinska signalizacija ima značajnu ulogu u velikom broju fizioloških procesa poput komunikacije među neuronima u CNS, nocicepcije, regulacije imunskog odgovora, embrionalnog razvića, kontrole tonusa glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, angiogeneze, kao i aktivacija trombocita (Yegutkin 2014). Takođe, brojna su patofiziološka stanja u kojima je otkriven etiološki, ali i terapijski značaj purinske signalizacije poput bolesti nervnog, kardiovaskularnog, kožnog, urinarnog, skeletnog, mišićnog, respiratornog, reproduktivnog i čulnog sistema, kao i u kanceru, raznim infekcijama i dijabetesu (Burnstock 2018).

Pored ATP, ulogu signala u purinskom signalnom putu imaju i drugi purinski, ali i pirimidinski nukleotidi i nukleozidi: adenzin - 5'- difosfat (ADP), uracil - 5'- trifosfat (UTP), uracil - 5'- difosfat (UDP), UDP - glukoza, UDP - galaktoza i nikotinamid dinukleotid (NAD⁺), adenzin i diadenzin polifosfati (Abbracchio *i sar.* 2009).

Purinska signalizacija se ostvaruje kao rezultat aktivnosti na nivou: (1) oslobađanja purinskih nukleotida i nukleozida u vanćelijsku sredinu, (2) aktivacije specifičnih nukleotidnih receptora prisutnih na ćelijskoj membrani, (3) degradacije nukleotida do adenozina od strane ekto-enzima, (4) aktivacije adenozinskih receptora i (5) degradacije adenozina do inozina i hipoksantina i/ili njegovog transporta u unutarćelijsku sredinu (Yegutkin 2008, 2014). Dodatno, paralelno sa hidrolizom ATP i ADP do adenozin - 5'- monofosfata (AMP) od strane ektonukleotidaza, u vanćelijskoj sredini odigrava se i njihova resinteza pod dejstvom adenilat kinaze (AK) i nukleozid difosfat kinaze (NDPK) koje kroz reakcije fosforilacije generišu ADP odnosno nukleotid-trifosfate (Yegutkin 2014).

Konačno, adenzin nastao hidrolizom AMP uklanja se iz vanćelijske sredine delovanjem ekto-enzima adenzin deaminaze 1 i 2 (eng. adenosine deaminase 1/2, ADA1/2) i fosforilaze purinskih nukleozida (eng. purine nucleoside phosphorylase, PNP), ili transportom u ćeliju posredstvom specifičnih membranskih transportera, pri čemu se najveći deo adenozina vraća u ćeliju posredstvom koncentrativnih nukleozidnih transportera (Yegutkin 2014).

2.1. Adenzin - 5'- trifosfat (ATP)

Pokazano je da ATP ima značajnu ulogu u embrionalnom i perinatalnom razviću CNS, sinaptičkoj plastičnosti, regeneraciji nervnog sistema i adultnoj neurogenezi, kao i u komunikaciji između nervnih i glijskih ćelija (Abbracchio *i sar.* 2009). U pogledu značaja ATP u patofiziološkim stanjima, uočena je njegova uloga u neuroinflamaciji, traumatskoj povredi, ishemiji, neurodegenerativnim bolestima, epilepsiji i neuropatskom bolu (Tu & Wang 2009).

Unutarćelijske koncentracije ATP u fiziološkim uslovima su reda veličine mmol/l, dok su vanćelijske koncentracije reda veličine od nmol/ do μmol/l (Franke & Illes 2006). ATP dospeva iz unutarćelijske u vanćelijsku sredinu regulisanim i neregulisanim procesima. Mogući izvori vanćelijskog ATP u nervnom sistemu su nervne, glijske i endotelne ćelije (Franke & Illes 2006). Pod regulisanim

procesima podrazumeva se oslobađanje ATP putem vezikula ili putem jonskih kanala i transportera. Oslobađanje ATP vezikularnom egzocitozom dešava se na završecima aksona nezavisno ili u kooperaciji sa drugim neurotransmiterima. Oslobađanje nukleotida olakšanom difuzijom putem membranskih jonskih kanala i nukleotidnih transportera javlja se u glijskim i endotelnim ćelijama, limfocitima i drugim tipovima ćelija i predstavlja normalan fiziološki proces, a posredovan je velikim anjonskim kanalima, koneksinskim i paneksinskim hemikanalima, brojnim transporterima organskih anjona, ABC transporterima i kanalima P2X₇ receptora (Erlinge & Burnstock 2008, Yegutkin 2008, Corriden & Insel 2010, Junger 2011, Lazarowski 2012, Lohman *i sar.* 2012). S druge strane, ATP se oslobađa i usled patoloških procesa izazvanih traumatskom povredom, nekrozom, apoptozom ili usled dejstva brojnih mehaničkih i hemijskih stimulusa poput bubrenja ćelije u hipotoničnoj sredini i dejstva farmakoloških agenasa koji dovode do porasta Ca²⁺ u citosolu (Yegutkin 2008, Junger 2011, Lazarowski 2012, Idzko *i sar.* 2014). U takvim okolnostima, ATP dostiže milimolarne koncentracije u vanćelijskoj sredini i predstavlja signal opasnosti (*eng.* danger associated molecular pattern, DAMP) (Di Virgilio & Vuerich 2015, Pandolfi *i sar.* 2016).

ATP, kao i drugi nukleotidi, učestvuje u neuroprotekciji i neuroregeneraciji, uključujući i procese proliferacije i diferencijacije pluripotentnih ćelija CNS. Pored uloge u neuronsko - glijskoj komunikaciji, ATP ima ulogu gliotransmitera, odnosno medijatora glijsko - glijske komunikacije, koji omogućava prenošenje informacije o Ca²⁺ talasima među astrocitima (Abbracchio *i sar.* 2009). Budući da ima ulogu signala opasnosti, poznato je da ATP indukuje aktivaciju mikroglije i da kontroliše njenu proliferaciju i migraciju, kao i sekreciju inflamacijskih citokina, što ukazuje na njegovu ulogu u imunomodulaciji (Abbracchio *i sar.* 2009). Pored toga, ATP ima ulogu i u aktivaciji astrocita, koja podrazumeva povećanje broja nastavaka, migraciju i proliferaciju astrocita, kao i oslobađanje molekula koji imaju ulogu u reorganizaciji tkiva (Abbracchio *i sar.* 2009).

2.2. Adenozin

Adenozin u vanćelijskoj sredini najvećim delom potiče od hidrolize ATP, dok se jednim delom oslobađa iz ćelija posredstvom nukleozidnih transportera (Wall & Dale 2007). U fiziološkim uslovima, adenozin je prisutan u vanćelijskoj sredini u niskim mikromolarnim koncentracijama, dok se u uslovima metaboličkog stresa njegova koncentracija povećava do 100 μmol/l (Safarzadeh *i sar.* 2016). Adenozin u CNS ima brojne uloge, poput modulacije aktivnosti nervnih i glijskih ćelija, njihove međusobne komunikacije i razvića nervnog sistema (Fellin *i sar.* 2006, Dare *i sar.* 2007), regulacije spavanja i budnosti, lokomocije, regulacije bola i dejstva etanola (Dunwiddie & Masino 2001). Pored uloge u CNS, adenozin ima značajnu ulogu u regulaciji urođenog i stečenog imunskog odgovora koju ostvaruje kroz inhibiciju limfocita, neutrofila, monocita/makrofaga i dendritskih ćelija (Abbracchio *i sar.* 2009, Safarzadeh *i sar.* 2016). Pokazano je da do promena u adenozinskoj signalizaciji dolazi u brojnim patologijama CNS, poput multiple skleroze (Tsutsui *i sar.* 2004), ishemije, epilepsije, neurodegenerativnih i psihijatrijskih oboljenja (Boison 2008). Generalno, adenozin ima neuroprotektivnu ulogu (Burnstock 2017), dok u odnosu na ATP deluje uglavnom antagonistički (Abbracchio *i sar.* 2009). U uslovima neuroinflamacije adenozin, nasuprot ATP, ostvaruje uglavnom imunosupresivne i antiinflamacijske efekte (Di Virgilio & Vuerich 2015, Faas *i sar.* 2017). Manjak adenozina i drugih metabolita ATP u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata koji boluju od multiple skleroze povezuje se sa lošijom kliničkom slikom (Lazarino *i sar.* 2010), a otkrivena je i korelacija visoke koncentracije proinflamacijskih citokina TNFα i IL-6 sa niskom koncentracijom adenozina u plazmi i serumu pacijenata (Mayne *i sar.* 1999).

2.3. Purinski receptori

Purinski nukleotidi dospeli u vanćelijsku sredinu svoje dejstvo ostvaruju aktivacijom purinskih receptora. Purinski receptori se dele na dve grupe - P1 receptore specifične za nukleozide, pre svega adenzin i P2 receptore specifične za ATP, ADP, ali i uridinske nukleotide.

2.3.1. P1 purinski receptori

Familija adenzinskih P1 receptora okarakterisana je farmakološki i klonirana kod nekoliko vrsta sisara, uključujući čoveka, miša i pacova. Sastoji se iz četiri tipa receptora spregnutih sa G proteinima i označenih kao A₁, A_{2a}, A_{2b} i A₃ (Fredholm *i sar.* 2001). Adenzin predstavlja glavni ligand za sva četiri tipa receptora, ali se A₃ može aktivirati i inozinom (Fredholm *i sar.* 2001). Kod sisarskih vrsta, proteinske sekvence A₁, A_{2a} i A_{2b} su izrazito evolutivno konzervirane, dok je sekvenca A₃ varijabilnija (Allard *i sar.* 2017). Kao i svi receptori spregnuti sa G proteinima, i adenzinski receptori su integralni membranski proteini izgrađeni od sedam transmembranskih domena. Po pravilu, A₁ i A₃ adenzinski receptori spregnuti su sa proteinima G_{i/o} familije i inhibiraju nastanak cikličnog AMP (cAMP) sekundarnog glasnika, dok su A_{2a} i A_{2b} spregnuti sa G_s proteinom i pokreću proizvodnju cAMP (Abbraccio *i sar.* 2009). Svi adenzinski receptori aktiviraju najmanje jednu podfamiliju mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK) (Schulte & Fredholm 2003). Podaci o količini eksprimirane informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) adenzinskih receptora u CNS pokazuju da se svi adenzinski receptori eksprimiraju u CNS, ali se razlikuju u pogledu svoje zastupljenosti u pojedinačnim regionima (Fredholm *i sar.* 2001, Safarzadeh *i sar.* 2016).

Adenzinski receptori se međusobno razlikuju i u pogledu afiniteta prema adenzinu. Kod čoveka, A₁, A_{2a} i A₃ su receptori visokog, nanomolarnog afiniteta, dok A_{2b} ima nizak, mikromolarni afinitet za adenzin (Muller & Jacobson 2011). Kod miša i pacova, visok nanomolarni afinitet imaju A₁ i A_{2a}, dok A_{2b} i A₃ imaju mikromolarne afinitete (Dunwiddie & Masino 2001, Muller & Jacobson 2011).

Podaci iz literature govore u prilog tome da adenzin i svi njegovi receptori imaju ulogu u procesima neuroinflamacije prisutnim u MS/EAE (Johnston *i sar.* 2001, Tsutsui *i sar.* 2004, Chen *i sar.* 2010, Mills *i sar.* 2012, Wei *i sar.* 2013, Loram *i sar.* 2015).

2.3.2. P2 purinski receptori

Na osnovu farmakoloških osobina, P2 receptori čiji su ligandi ATP, ADP, UTP i UDP podeljeni su u dve familije: P2X i P2Y (Burnstock & Kennedy 1985, Ralevic & Burnstock 1998). Ove dve familije su naknadno okarakterisane kao jonotropna P2X i metabotropna P2Y familija ATP receptora (Abbraccio & Burnstock 1994). P2 receptori su široko rasprostranjeni kod sisara i zastupljeni u svim tipovima ćelija, uključujući i ćelije CNS (Burnstock & Knight 2004) u kome učestvuju u regulaciji različitih procesa poput prenosa nervnog impulsa, percepcije bola, fagocitoze i održavanja intaktne KMB (Weisman *i sar.* 2012).

2.3.2.1. P2X familija receptora

P2X familija jonotropnih receptora sastoji se od sedam receptora označenih P2X₁₋₇ prema redosledu kloniranja, dužine od 379 do 595 aminokiselina (Khakh 2001) za koje se vezuje ATP kao ligand. Receptori ove familije su klasični ligand-zavisni katjonski kanali čija se pora propustljiva za Na⁺, K⁺ i Ca²⁺ otvara po vezivanju ATP (Abbraccio *i sar.* 2009). Oni poseduju dva transmembranska regiona, dugačak vanćelijski lanac sa mestom vezivanja ATP, kao i unutarćelijske N- i C-terminalne domene

(Khakh *i sar.* 2001). Biohemijske studije pokazale su da su P2X receptori trimeri (Nicke *i sar.* 1998) i da formiraju homo-, ali i heterooligomere: P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6} i P2X_{4/7} (Illes & Alexandre Ribeiro 2004, Abbraccio *i sar.* 2009), sa izuzetkom P2X₆ koji ne formira homooligomere (Burnstock & Knight 2004). Najveći afinitet prema ATP ~1 μ mol/l pokazuje P2X₁ receptor dok P2X₇ receptor ima najmanji afinitet ~ 0.1 mmol/l (Abbraccio *i sar.* 2009).

P2X receptori su različito eksprimirani u strukturama CNS, uključujući koru velikog mozga, mali mozak, hipokampus, moždano stablo, kičmenu moždinu itd. (Weisman *i sar.* 2012). Svi receptori ove grupe su prisutni na neuronima, dok su P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₆ i P2X₇ prisutni na astrocitima, a P2X₁, P2X₄ i P2X₇ na mikrogliji (Weisman *i sar.* 2012). Na OPC i oligodendrocitima prisutni su P2X₄ i P2X₇ receptori (Welsh & Kucenas 2018). Glavne uloge P2X familije receptora su u modulaciji sinapsi i njihovoj plastičnosti, komunikaciji nervnih i glijskih ćelija, neurogenezi, nocicepciji itd. (Weisman *i sar.* 2012, Boue-Grabot & Pankratov 2017).

Pojedini P2X receptori prisutni su na ćelijama imunskog sistema i imaju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (Di Virgilio & Vuerich 2015). Kod čoveka, B- i T-limfociti, NK ćelije, neutrofili, eozinofili, mastociti i makrofagi poseduju P2X₁, P2X₄ i P2X₇ receptore (Idzko *i sar.* 2014), dok je P2X₅ prisutan na T-limfocitima (de Rijck *i sar.* 2005).

Kada je u pitanju neuroinflamacija, pokazano je da su P2X₄ i P2X₇ receptori uključeni u patološke procese u multiploj sklerozi i EAE (Domercq & Matute 2019). Ekspresija P2X₄ je povišena u mikrogliji/makrofagima i na mestima infiltracije imunskih ćelija u akutnom i hroničnom EAE (Guo & Schluesener 2005, Vazquez-Villoldo *i sar.* 2014), kao i u uzorcima tkiva pacijenata obolelih od MS (Vazquez-Villoldo *i sar.* 2014). Blokiranje P2X₄ receptora pogoršava simptome, dok potencijacija njegove aktivacije alosteričkim modulatorom ivermektinom, kao i njegova prekomerna ekspresija ublažavaju simptome tokom EAE (Zabala *i sar.* 2018). P2X₇ receptor ima ulogu u oštećenju neurona i oligodendrocita u MS (Matute *i sar.* 2007), a njegova pojačana ekspresija zabeležena je na kortikalnim astrocitima (Narcisse *i sar.* 2005, Amadio *i sar.* 2017) i na mikrogliji kod pacijenata obolelih od MS (Yiangou *i sar.* 2006), dok njegova blokada pospešuje oporavak tokom EAE (Matute *i sar.* 2007, Lang *i sar.* 2010). Yiangou i saradnici (2006) predložili su mehanizam dejstva P2X₇ receptora u MS: povišen nivo ATP u vanćelijskoj sredini usled ćelijske smrti aktivira ove receptore na mikrogliji i makrofagima, stimulišući produkciju i oslobađanje IL-1 β koji dalje na ovim ćelijama indukuje produkciju inducibilne ciklooksigenaze (*eng.* cyclooxygenase-2, Cox-2) (Yiangou *i sar.* 2006).

2.3.2.2. P2Y familija receptora

P2Y familija metabotropnih receptora sastoji se od osam receptora označenih P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} dužine od 328 do 377 aminokiselina (Weisman *i sar.* 2012) za koje se kao ligandi mogu vezivati ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-glukoza, UDP-galaktoza, ali i cisteinil-leukotrieni i prostaglandin E2 (Abbraccio *i sar.* 2009, Bruser *i sar.* 2017). Svi receptori ove familije sastoje se od sedam transmembranskih domena, vanćelijskog N-terminalnog domena koji poseduje nekoliko potencijalnih mesta za glikozilaciju i unutarćelijskog C-terminalnog domena koji poseduje nekoliko mesta za fosforilaciju protein kinazama (Weisman *i sar.* 2012). Mogu formirati homo- i heterodimere sa drugim receptorima ove familije (Ecke *i sar.* 2008), ali i sa receptorima drugih familija poput A₁ adenozienskog receptora (Fischer & Krugel 2007). Na osnovu sličnosti sekvence, aminokiselina prisutnih na mestu za vezivanje liganda i selektivnosti za G proteine, razlikuju se dve podfamilije P2Y receptora, od koji jednu čine P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ i P2Y₁₁, a drugu P2Y₁₂, P2Y₁₃ i P2Y₁₄ (Abbraccio *i sar.* 2006). Receptori prve podfamilije uglavnom su spregnuti za Gq/G₁₁ i aktivacijom fosfolipaze C započinju put

oslobađanja Ca^{2+} iz endoplazminog retikuluma (Verkhatsky 2005). Receptori druge podfamilije spregnuti su sa $\text{G}_{i/o}$ proteinima koji inhibiraju adenil ciklazu sprečavajući nastanak cAMP (Abbraccio *i sar.* 2006).

P2Y receptori prisutni su veoma rano tokom embrionalnog razvića u CNS i široko su rasprostranjeni i na neuronima i na glijskim ćelijama (Abbraccio *i sar.* 2009). Prisutni su u brojnim regionima CNS poput kore velikog mozga, malog mozga, hipokampusu, kičmene moždine itd. (Weisman *i sar.* 2012). Imaju važne uloge u razviću CNS, modulaciji sinaptičke transmisije, čulne recepcije, regulaciji funkcije KMB, regulaciji migracije, hemotakse itd. (Weisman *i sar.* 2012)

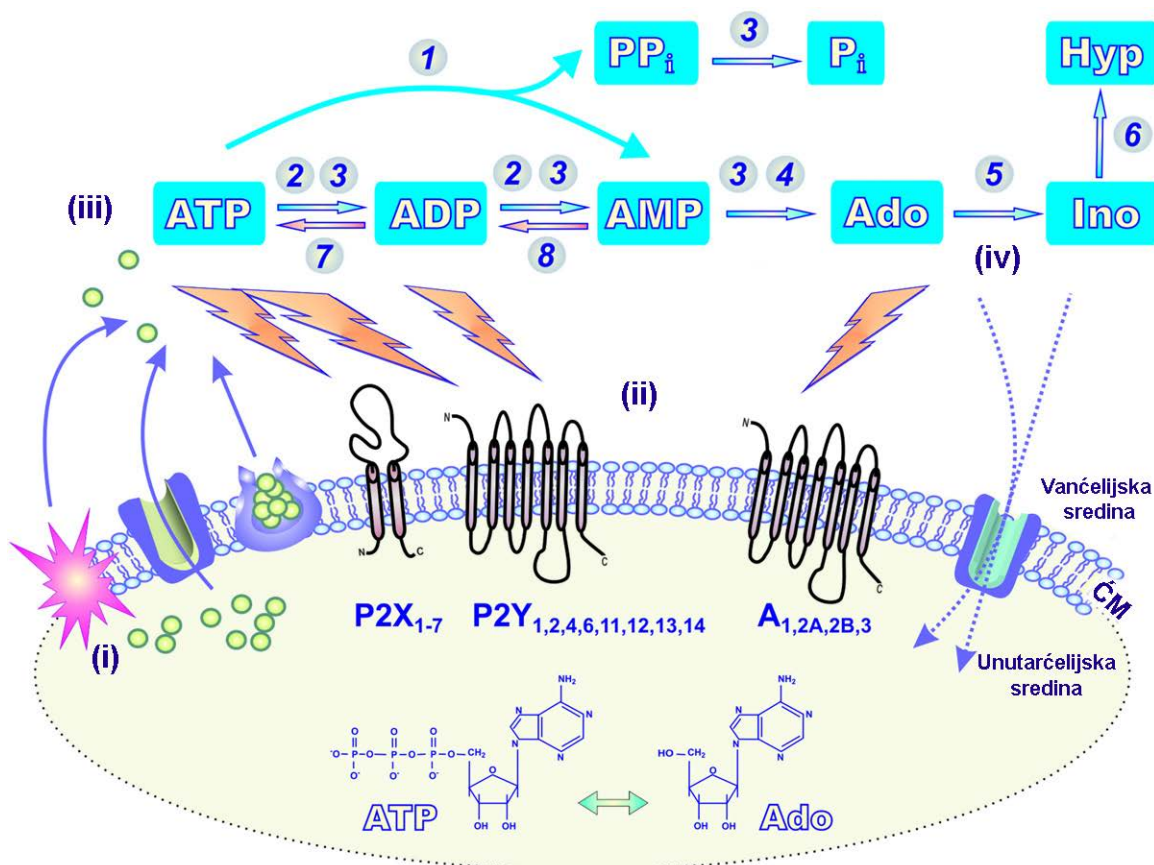
P2Y receptori eksprimirani su na svim ćelijama imunskog sistema (Le Duc *i sar.* 2017), a P2Y₁₂ receptor predstavlja i marker mirujuće mikroglije (Goldmann *i sar.* 2016). Do sada je od svih P2Y receptora u MS/EAE otkrivena jedino uloga P2Y₁₂ receptora (Bagatini *i sar.* 2018). Smanjena imunoreaktivnost P2Y₁₂ receptora u blizini lezija u CNS kod MS pacijenata u korelaciji je sa stepenom demijelinizacije kako u aktivnim lezijama, tako i u NAWM (Amadio *i sar.* 2010, Mildner *i sar.* 2017, Zrzavy *i sar.* 2017). Kod pacijenata u remisiji je povećana i povezuje se sa antiinflamacijskim fenotipom mikroglije (Beaino *i sar.* 2017). U aktiviranoj mikrogliji, ekspresija P2Y₁₂ se smanjuje (Orr *i sar.* 2009), a postoje podaci i da je povećana u antiinflamacijskom fenotipu mikroglije M2 (Moore *i sar.* 2015).

2.4. Ektonukleotidaze

Sposobnost membranskih enzima ektonukleotidaza da hidrolizuju purinske nukleotide u vanćelijskoj sredini poznata je već decenijama (Pearson *i sar.* 1980, Plesner 1995). Ektonukleotidaze regulišu koncentracije vanćelijskih nukleotida i nukleozida i njihovu dostupnost purinskim receptorima, čime započinju ili zaustavljaju aktivaciju određenih signalnih puteva (Zimmermann *i sar.* 2012). Postoje četiri glavne familije ektonukleotidaza: ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaze, ekto-5'-nukleotidaza, ektonukleotid pirofosfataze/fosfodiesteraze i alkalne fosfataze (Yegutkin 2008).

2.4.1. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaze (NTPDaze)

Članovi ove familije predstavljaju ektonukleotidaze u užem smislu (Zimmermann *i sar.* 2012) i skraćeno se označavaju kao familija NTPDaza. Prisutni su u gotovo svim tkivima (Robson *i sar.* 2006, Kukulski *i sar.* 2011). Hidrolizuju vanćelijske nukleotid tri- i difosfate do nukleozid monofosfata u prisustvu milimolarnih koncentracija Ca^{2+} i Mg^{2+} jona na fiziološkom pH (Kukulski *i sar.* 2005, Zimmermann *i sar.* 2012). Familija NTPDaza sastoji se od osam članova koji su numerisani prema redosledu otkrića (Robson *i sar.* 2006, Yegutkin 2008, Zimmermann *i sar.* 2012). NTPDaze 1, 2, 3 i 8 predstavljaju enzime lokalizovane na ćelijskoj membrani (Yegutkin 2014), dok su NTPDaze 4, 5, 6 i 7 lokalizovane unutar ćelije (Robson *i sar.* 2006). NTPDaze 5 i 6 mogu biti sekretovane u vanćelijsku sredinu, dok su NTPDaze 4 i 7 lokalizovane na unutrašnjoj strani membrana citoplazmatskih organela (Robson *i sar.* 2006, Zimmermann *i sar.* 2012). Klasične ektonukleotidaze, NTPDaze 1, 2, 3 i 8 su izrazito glikozilovani proteini molekulske težine 70 – 80 kDa koji poseduju dva transmembranska regiona, dugačku vanćelijsku petlju u okviru koje se nalazi katalitičko mesto enzima, kao i unutarćelijske N- i C- terminalne domene. NTPDaze postoje u formi monomera i oligomera (Yegutkin 2014), pri čemu oligomerizacija pospešuje katalitičku aktivnost ovih enzima (Stout & Kirley 1996, Wang *i sar.* 1998). Od svih članova ove familije, poznato je da se u CNS eksprimiraju NTPDaze 1, 2, i 3, pri čemu su najzastupljenije NTPDaza1 i 2 (Zimmermann 2012).



Slika 3. Shematski prikaz komponenti purinskog signalnog puta. Metabolizam vanćelijskih nukleotida sastoji se od (i) oslobađanja endogenog ATP i drugih nukleotida (zeleni krugovi) nakon oštećenja ćelije ili nelitičkim mehanizmom oslobađanja putem egzocitoze, jonskih kanala ili transportera, (ii) aktivacije jonotropnih P2X₁₋₇, metabotropnih P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}, (iii) metabolizma nukleotida do nukleozida i aktivacije adenozijskih receptora A_{1,2a,2b,3}, (iv) dalje deaminacije adenozina (Ado) do inozina (Ino) i hipoksantina (Hyp) i/ili njihovog transporta u ćeliju. U metabolizmu nukleotida učestvuju enzimi nukleotid pirofosfataza/fosfodiesteraze – NPP (1), članovi porodice NTPDaza (2) i alkalne fosfataze (3), ekto - 5'- nukleotidaza/CD73 (4), ADA (5) i PNP (6). Povratne reakcije fosfotransfera katalizuju adenozin kinaza - AK (7) i nukleozid difosfat kinaza - NDPK (8). Modifikovano prema Yegutkin (2014).

2.4.1.1. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza1 (NTPDaza1, CD39)

Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza1 (NTPDaza1/CD39, ATPDaza i ekto-apiraza) je najbolje proučeni član porodice ektonukleotidaza (Zimmermann *i sar.* 2012, Yegutkin 2014). Maliszewski *i sar.* (1994) otkrili su ga kao marker aktivacije B-limfocita 1994. godine i dali mu naziv CD39, a dve godine kasnije otkrivena je njegova ektonukleotidazna uloga (Wang & Guidotti 1996) nakon čega je usklađena nomenklatura i ovaj enzim je svrstan u familiju ektonukleotidaza pod nazivom NTPDaza1. Gen za NTPDaza1/CD39 kod čoveka nalazi se na 10q24 hromozomu i označen je *ENTPD1*, dok se kod miša nalazi na 19C3 hromozomu i označen je *Entpd1* (Robson *i sar.* 2006). NTPDaza1/CD39 čoveka poseduje 510, a pacova 511 AK i 7 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju, dok je dužina aminokiselinske sekvence kod miša ista kao kod čoveka, s tim što protein ima 6 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju. Kod čoveka postoji 6 izoformi molekulske težine 34 – 59 kDa. Molekulska težina

neglikozilovanog enzima kod miša i pacova iznosi ~57 kDa (Zimmermann *i sar.* 2012). NTPDaza1/CD39 je N-glikozilovani protein molekulske težine 70 – 100 kDa (Kaczmarek *i sar.* 1996). Kao i svi drugi članovi ove familije, i NTPDaza1/CD39 podleže posttranslacionoj obradi u endoplazminom retikulumu i Goldžijevom aparatu, a katalitičku aktivnost stiče tek po ukotvljavanju u ćelijsku membranu u čemu glikozilacija igra presudnu ulogu (Zhong *i sar.* 2001). U pogledu katalitičkih osobina, NTPDaza1/CD39 ima najveći afinitet prema ATP od svih ektonukleotidaza. Km za ATP kod čoveka iznosi ~ 17 $\mu\text{mol/l}$ dok je Km kod miša nešto niži (Zimmermann *i sar.* 2012). S obzirom da je odnos hidrolize ATP i ADP kod NTPDaza1/CD39 ~ 1 : 1.5 – 1 (Kukulski *i sar.* 2005, Kukulski *i sar.* 2011), ovaj enzim hidrolizuje ATP gotovo direktno do AMP, uz oslobađanje neznatne količine ADP. Budući da ima visok afinitet i prema ATP i ADP u odnosu na ostale ektonukleotidaze, NTPDaza1/CD39 ima glavnu ulogu u uklanjanju liganada P2 receptora u vanćelijskoj sredini. NTPDaza1/CD39 može postojati u obliku monomera ili homooligomera: dimera, trimera i tetramera, od kojih je stanje homodimera najčešće (Robson *i sar.* 2006). Dodatno, ovi enzimi mogu da formiraju i heterooligomere. Bliske molekulske interakcije koje impliciraju formiranje takvih kompleksa uočene su između NTPDaza1/CD39 i NTPDaza2 enzima pacova, kao i između NTPDaza1/CD39 enzima i P1 i P2Y familije purinskih receptora pacova u transfekovanim humanim ćelijskim linijama HEK293 i 1321N1 (Schicker *i sar.* 2009). Za P2X familiju purinskih receptora nije uočena bliska molekulska interakcija sa NTPDaza1/CD39 enzimom (Schicker *i sar.* 2009), iako je njegovo prisustvo neophodno za aktivaciju ovih receptora (Schaefer *i sar.* 2007). Opisana je i solubilna NTPDaza1/CD39 prisutna u plazmi čoveka i miša koja učestvuje u hidrolizi ADP (Coade & Pearson 1989, Yegutkin *i sar.* 2007, Yegutkin *i sar.* 2012). Pored uloge u regulaciji purinske signalizacije hidrolizom nukleotida, pokazano je da NTPDaza1/CD39 preko svog N – termina vezuje Ran vezujući protein M (eng. Ran binding protein M, RanBPM) koji reguliše Ras/ERK signalni put, ali i katalitičku aktivnost samog NTPDaza1/CD39 enzima (Robson *i sar.* 2006, Wu *i sar.* 2006, Zimmermann *i sar.* 2012).

U CNS, enzim je visoko ekspimiran u neuropilu talamusa, putamena i hipokampusu (Langer *i sar.* 2008), dok je u svim delovima CNS prisutan na endotelnim vaskularnim ćelijama i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova, kao i na mikrogliji (Braun *i sar.* 2000). Prisustvo NTPDaza1/CD39 uočeno je i u primarnoj kulturi neurona i astrocita (Wang *i sar.* 1997). Takođe, ekspimirira se i u OPC, ali nije prisutna u nezrelim i zreim oligodendrocitima (Welsh & Kucenas 2018).

NTPDaza1/CD39 učestvuje u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima (Yegutkin 2014). Poznata je uloga u migraciji (Farber *i sar.* 2008), fagocitozi (Bulavina *i sar.* 2013) i procesu ramifikacije mikroglije (Matyash *i sar.* 2017). NTPDaza1/CD39 takođe učestvuje u regulaciji funkcije KMB (Bynoe *i sar.* 2015) i kontroli moždanog krvotoka (Sevigny *i sar.* 2002). NTPDaza1/CD39 učestvuje u regulaciji funkcije ćelija imunskog sistema poput B-limfocita, NK ćelija, dendritskih ćelija, monocita, makrofaga, neutrofila i Treg limfocita (Dwyer *i sar.* 2007). NTPDaza1/CD39 predstavlja marker Treg ćelija kod miša (Borsellino *i sar.* 2007). Ima ulogu u autoimunskim bolestima poput alopecije, dijabetesa i inflamacijske bolesti creva, infekcijama, aterosklerozi, ishemiji i kanceru (Antonioli *i sar.* 2013, Deaglio & Robson 2011). Ekspresiju NTPDaza1/CD39 regulišu neki proinflamacijski citokini, oksidativni stres i hipoksija (Eltzschig *i sar.* 2009, Deaglio & Robson 2011) putem transkripcionih faktora Sp1, Stat3 i Gfi-1 (Eltzschig *i sar.* 2009, Chalmin *i sar.* 2012).

Prema literaturnim podacima, NTPDaza1/CD39 pokazuje izmenjenu funkciju tokom MS i EAE (Antonioli *i sar.* 2013). Kod pacijenata obolelih od MS otkriven je smanjen broj NTPDaza1⁺ Treg ćelija i smanjena je regulacija proliferacije Th17 ćelija koje učestvuju u patogenezi ove bolesti (Fletcher *i sar.* 2009). Hidrolitička aktivnost NTPDaza1 povećana je u limfocitima pacijenata obolelih

od MS (Spanevello *i sar.* 2010), dok je u CNS MS pacijenata uočeno značajno povećanje NTPDaza1/CD39 na mikrogliji u lezijama prisutnim u beloj masi (Huizinga *i sar.* 2012). Tokom EAE, u serumu obolelih pacova uočena je smanjena ATPazna i ADPazna aktivnost, dok je u kičmenoj moždini uočeno povećanje ovih aktivnosti (Lavrnja *i sar.* 2009).

2.4.1.2. Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza 2 (NTPDaza2)

Ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza 2 (NTPDaza2) je prvi put klonirana i okarakterisana kod pacova (Kegel *i sar.* 1997), a zatim i kod čoveka (Mateo *i sar.* 1999). Kod čoveka postoje tri alternativno splajsovane varijante ovog enzima (Mateo *i sar.* 2003), od kojih je samo α varijanta katalitički aktivna. Kod pacova postoje dve alternativno splajsovane varijante NTPDaza2 enzima, α i β (Vlajkovic *i sar.* 1999), pri čemu je NTPDaza2 α češći oblik ovog enzima, molekulske težine 54 kDa, poseduje 7 potencijalnih mesta za N – glikozilaciju i lokalizovan je na ćelijskoj membrani Na C-terminusu nalazi se mesto za fosforilaciju protein kinazom C (PKC). NTPDaza2 β je lokalizovana na ćelijskoj membrani, ali i na membranama organela unutar ćelije, molekulske težine 60 kDa, i na C-terminusu ne poseduje mesto za fosforilaciju PKC-om, ali poseduje tri mesta za fosforilaciju kazein kinazom 2 (CK2). Obe forme su prisutne u mozgu pacova, naročito u malom i srednjem mozgu, kao i u slezini i timusu (Vlajkovic *i sar.* 1999, Zimmermann *i sar.* 2012). Kao i NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 dobija katalitičku sposobnost tek po ukotvljavanju u ćelijsku membranu. Takođe je N - glikozilovan protein, kao i sve membranske ektonukleotidaze (Zimmermann *i sar.* 2012). U odnosu na NTPDaza1/CD39 odlikuje se nešto nižim afinitetom prema ATP ($K_m \sim 70 \mu\text{mol/l}$) (Zimmermann *i sar.* 2012). Dodatno, pokazuje vrlo nizak afinitet prema ADP zbog čega hidrolizuje prevashodno ATP, a odnos stepena hidrolize ATP prema ADP iznosi 10 – 40 : 1 (Kukulski *i sar.* 2005, Yegutkin 2008, Kukulski *i sar.* 2011) što za posledicu ima nagomilavanje ADP. U tom smislu, pored uloge u hidrolizi ATP, NTPDaza2 predstavlja glavni izvor ADP u vanćelijskoj sredini. NTPDaza2 formira homooligomere: dimere, trimere i tetramere, kao i heterooligomer sa NTPDaza1/CD39 (Zimmermann *i sar.* 2012).

U CNS, NTPDaza2 je enzim visoko eksprimiran u adultnim pluripotentnim ćelijama subventrikularne zone i subgranularnog sloja zubate vijuge, pa se smatra da ima ulogu u proliferaciji ovih ćelija (Braun *i sar.* 2003, Shukla *i sar.* 2005, Mishra *i sar.* 2006, Gampe *i sar.* 2015). Prisutna je na OPC, ali ne i na nezrelim i zrelim oligodendrocitima (Welsh & Kucenas 2018). NTPDaza2 je lokalizovana i na specijalizovanim astrocitima, poput laminarnih astrocita u moždanom stablu i kori velikog mozga (Braun *i sar.* 2003), tanicitima i posebnim nestelatnim astrocitima sive mase prisutnim u habenuli (Gampe *i sar.* 2012), kao i Milerovoj gliji (Iandiev *i sar.* 2007). NTPDaza2 je dominantna ektonukleotidaza u primarnoj kulturi astrocita (Wink *i sar.* 2006, Brisevac *i sar.* 2015). Eksprimira se i u satelitskim glijskim ćelijama u ganglijama dorzalnog korena (Braun *i sar.* 2004, Zimmermann *i sar.* 2012). U perifernom nervnom sistemu, ovaj enzim eksprimiraju nemijelinizujuće Švanove ćelije i enteričke glijske ćelije (Braun *i sar.* 2004).

Kada je u pitanju MS/EAE, za sada nedostaju literaturni podaci o ulozi NTPDaza2 u ovoj patologiji.

2.4.2. Ekto - 5' - nukleotidaza (eN, CD73)

Pored NTPDaza1/CD39 i NTPDaza2, ekto – 5' – nukleotidaza (eN/CD73) je visoko eksprimirana u CNS (Langer *i sar.* 2008). Uloga ovog enzima je hidroliza ribo- i dezoksiribonukleozid - 5' - monofosfata pri čemu najefikasnije hidrolizuje AMP (Zimmermann *i sar.* 2012). Enzim eN/CD73 je

Zn²⁺ vezujući protein ukotvljen u membranu pomoću glikozilfosfatidilinozitola sa vanćelijskim katalitičkim domenom (Zimmermann *i sar.* 2012). Njegova Km vrednost za AMP kreće se u rasponu od 1 do 50 μmol/l u zavisnosti od tkiva (Zimmermann *i sar.* 2012). Kako je glavna uloga ovog enzima produkcija adenzina, on se smatra glavnim kontrolorom dostupnosti adenzina u vanćelijskoj sredini, kao i posledične aktivacije P1 receptora (Zimmermann *i sar.* 2012). ATP i ADP su glavni inhibitori ovog enzima, pri čemu je Ki u niskom mikromolarnom opsegu, što zapravo ukazuje na to da visoke količine ATP i ADP oslobođene iz ćelija inhibiraju eN/CD73 i nastanak adenzina, sve dok se njihove vanćelijske koncentracije ne smanje hidrolizom od strane drugih ektonukleotidaza do nivoa nekoliko μmol/l (James & Richardson 1993). Gen za eN/CD73 je prvi put kloniran kod pacova (Misumi *i sar.* 1990), a zatim kod čoveka (Misumi *i sar.* 1990). *Knock out* životinje su zdrave i normalno se ponašaju (Zimmermann *i sar.* 2012). Ovaj enzim je na membrani najčešće prisutan u obliku homodimera. Molekulska težina monomera iznosi 60 – 80 kDa, a dimera 160 kDa (Zimmermann 1992, Zimmermann *i sar.* 2012). Pored membranske, postoji i solubilna forma eN/CD73 prisutna u serumu (Sunderman 1990) i sinovijalnoj tečnosti (Johnson *i sar.* 1999). Među proteinima vanćelijske sredine, laminin povećava, dok fibronektin smanjuje njegovu aktivnost (Olmo *i sar.* 1992). Ovaj enzim uspostavlja i snažne specifične interakcije sa tenascinom C koji učestvuje u ćelijskoj adheziji i migraciji (Sadej *i sar.* 2008).

Uloge eN/CD73 su brojne i značajne: u transportu tečnosti, funkciji endotelne barijere, adaptaciji na hipoksiju i ishemiju, u funkcionisanju nervnog sistema, transportu leukocita kroz endotel i u imunskoj kontroli kancera (Zimmermann *i sar.* 2012).

Ova ektonukleotidaza široko je distribuirana u CNS sisara, i nalazi se na neuronima, astrocitima, završecima mahovinastih vlakana, ćelijama horoidnog pleksusa i endotelnim ćelijama krvnih sudova (Zimmermann & Braun 1996, Lavrnja *i sar.* 2015). Visoko se eksprimira u OPC i smanjuje se tokom diferencijacije, a potpuno je odsutan kod zrelih oligodendrocita (Zhang *i sar.* 2014, Welsh & Kucenas 2018).

U imunskom sistemu, eN/CD73 zajedno sa NTPDaza1/CD39 predstavlja marker Treg ćelija kod miša (Borsellino *i sar.* 2007), ali se eksprimira i na drugim imunskim ćelijama i kod miša i kod čoveka (Antonioli *i sar.* 2013). NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 se često ekspimiraju na istim ćelijama delujući zajednički u pravcu hidrolize ATP do adenzina, efikasno regulišući nivo oba molekula od ključnog značaja za inflamaciju (Antonioli *i sar.* 2013). Pored enzimske, eN/CD73 ima i ulogu u ćelijskoj adheziji i migraciji (Airas *i sar.* 1995, Airas & Jalkanen 1996, Adzic & Nedeljkovic 2018).

Kod muških pacijenata obolelih od MS, nivo eN/CD73 smanjen je u krvi u odnosu na zdrave osobe (Kobarfard *i sar.* 2019). Tokom EAE, nivo hidrolize AMP u serumu je smanjen, dok je u kičmenoj moždini pacova povećan (Lavrnja *i sar.* 2009). Promene su u skladu sa uočenim porastom ekspresije eN/CD73 na nivou iRNK i proteina, pretežno povezanim sa aktivacijom astrocita (Lavrnja *i sar.* 2015). Literaturni podaci o ulozi eN/CD73 u EAE donekle su kontradiktorni jer je ranije pokazano da je ekspresija eN/CD73 neophodan preduslov za prodor limfocita u CNS i indukciju EAE (Mills *i sar.* 2008), dok je u jednoj skorijoj studiji pokazano da težina bolesti ne zavisi od prisustva ove ektonukleotidaze (Hernandez-Mir & McGeachy 2017).

II CILJEVI

Imajući u vidu navedene podatke o uključenosti purinskog sistema u patogenezu i tok MS u humanoj populaciji, osnovni cilj ove disertacije bilo je ispitivanje ekspresije komponenti purinskog signalnog sistema u kičmenoj moždini tokom EAE. Konkretno, postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Analizirati histološku distribuciju i kvantitativne promene ekspresije NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini pacova u fiziološkim uslovima i tokom EAE.
2. Identifikovati rezidentne i infiltrirane ćelije koje eksprimiraju NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini i proceniti njihov inflamacijski fenotip u kontekstu M1/M2 (mikroglija, makrofagi), odnosno A1/A2 (astrociti) polarizacije tokom EAE.
3. Okarakterisati fenotip NTPDaza1⁺ imunskih ćelija prisutnih u mononuklearnoj frakciji izolovanoj iz kičmene moždine na vrhuncu EAE u pogledu ekspresije markera CD4, CD40 i CD45.
4. Analizirati histološku distribuciju NTPDaza2, ćelijsku lokalizaciju i kvantitativne promene ekspresije ovog proteina u kičmenoj moždini pacova u fiziološkim uslovima i tokom EAE.
5. Korelirati uočene promene nivoa ekspresije NTPDaza1/CD39 i NTPDaze2 sa nivoima ekspresije ATP-senzitivnih i ADP-senzitivnih P2 receptora i adenozijskih P1 receptora u kičmenoj moždini tokom faza EAE.
6. Ispitati promene ekspresije NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 u populaciji CD4⁺ i CD4⁻ ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom EAE.
7. Ispitati uticaj proinflamacijskih faktora na vijabilnost i funkcionalnost oligodendrocitne progenitorske ćelijske linije Oli-neu i ekspresiju eN/CD73 na tim ćelijama.

III MATERIJAL I METODE

1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije korišćene su ženke visoko - srođenog soja pacova Dark Agouti (DA) koji je podložan izazivanju eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE). Životinje starosti 8 nedelja na početku eksperimenta dobijene su iz lokalne kolonije. Životinje su gajene u uslovima *ad libitum* pristupa vodi i briketiranoj hrani, konstantne temperature i vlažnosti, smene ciklusa svetlosti i mraka na 12 h i standardnog broja životinja po kavezu (4 – 5). Eksperimentalni rad u okviru disertacije izveden je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu u skladu sa direktivom Evropske Komisije (2010/63/EU) i uz odobrenje Etičke komisije za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ zavedeno pod brojem 01-11/14.

1.1. Indukcija EAE i evaluacija toka bolesti

Ženke DA pacova anestetizirane su i imunizovane subkutanom injekcijom 150 μ l encefalitogene emulzije u zadnju šapu. Encefalitogena emulzija sastojala se od encefalitogene suspenzije i CFA (Sigma-Aldrich, Švajcarska) u odnosu 1:1. Encefalitogena suspenzija sadržavala je (u odnosu 1g:1ml) homogenat tkiva kičmene moždine pacova u puferovanom fiziološkom rastvoru (PBS) čiji je sastav prikazan u Tabeli 1. Frojndov adjuvans je imunostimulans u obliku emulzije koji u svojoj kompletnoj formi sadrži 0.5 - 1 mg/ml inaktiviranih bakterija soja *Mycobacterium tuberculosis*. Grupa životinja iste starosti koje nisu imunizovane nakon anestezije predstavljala je fiziološku kontrolu u eksperimentu. Sve imunizovane životinje ispoljile su simptome bolesti monofaznog toka sa potpunim oporavkom. Životinje su svakodnevno posmatrane u cilju praćenja simptoma bolesti i merenja telesne mase tokom 30 dana od dana imunizacije. Prilikom praćenja neuroloških simptoma bolesti korišćena je standardna skala od 0 do 5 (Milicevic *i sar.* 2003) sa sledećim značenjem: 0 – odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 0.5 – smanjen tonus repa; 1 – atonija repa; 1.5 – nespretan hod, nepotpuna sposobnost uspravljanja ili oba; 2 – pareza zadnjih ekstremiteta; 2.5 – nepotpuna paraliza zadnjih ekstremiteta; 3 – potpuna paraliza zadnjih ekstremiteta; 3.5 - potpuna paraliza zadnjih uz slabost prednjih ekstremiteta; 4 – tetraplegija i 5 – moribundno stanje ili smrt. Prvi znaci bolesti kod životinja pojavili su se 9. dana, dok su 10. dana sve životinje imale smanjen tonus ili atoniju repa, što je označeno kao početna faza bolesti (Ep). Simptomi su se progresivno pogoršavali narednih 5 dana, pri čemu su najteže simptome životinje ispoljavale 14. i 15. dana, što je označeno kao vrhunac bolesti (Ev). Nakon toga, životinje bi počele da se oporavljaju i od 24. dana primećeno je potpuno odsustvo simptoma kod životinja i 30. dan posle imunizacije označen je kao kraj bolesti (Ek).

Tabela 1. Sastav fosfatnog pufera i puferovanog fiziološkog rastvora.

Rastvor	Sastav i proizvođač
0.2 M Fosfatni pufer pH 7.4	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (Moss Hemoss, Srbija) 0.2 M Na ₂ HPO ₄ (VWR Chemicals, SAD) pH 7.4
PBS	8.7 g NaCl (Zorka, Srbija) 50 ml 0.2M fosfatnog pufera dopunjeno do 1 l dejonizovanom vodom

Životinje su, nakon intraperitonealne anestezije rastvorom Zoletil R 50 (Virbac, Francuska; 30 mg/kg) i perfuzije 0.9% sterilnim fiziološkim rastvorom (Hemofarm, Srbija), žrtvovane dekapitovanjem u jednoj od tri vremenske tačke. Na isti način žrtvovane su i neimunizovane životinje iz grupe fizioloških kontrola (Fk). Po žrtvovanju, na ledu su izolovani lumbosakralni delovi kičmene moždine i poplitealni limfni čvorovi iz imunizovanog ekstremiteta.

1.2. Izolacija ribonukleinske kiseline (RNK) iz kičmene moždine

Za izolaciju ukupne RNK iz kičmenih moždina DA pacova (najmanje 5 po eksperimentalnoj grupi) korišćen je TRIzol reagens (ThermoFisher Scientific, SAD) i protokol koji se zasniva na standardnoj fenol - hloroform metodi za izolaciju nukleinskih kiselina. Prilikom rada vođeno je računa o odsustvu kontaminacije RNKazama. Po određivanju mase, pojedinačni uzorci homogenizovani su na ledu u TRIzol reagensu u odnosu mase tkiva i volumena reagensa 1:10. Nakon inkubacije sa reagensom u trajanju od 5 minuta, tokom koje je došlo do liziranja ćelija, dodat je hloroform (Zorka, Srbija) u zapreminskom odnosu 1:5. Nakon centrifugiranja 15 minuta na temperaturi 4°C i pri brzini 12000 × g, dobijene su tri faze od kojih je gornja, vodena faza sadržala izolovanu RNK. Nakon pažljivog izdvajanja te faze u drugu mikrotubu, dodat je izopropanol (J.T.Baker, SAD) u zapreminskom odnosu 1:1 i uzorci su vorteksovani. Pri ovom koraku, uzorci bi bili ostavljani na temperaturi -20 °C preko noći, a zatim sutradan centrifugirani 10 minuta na temperaturi 4°C i pri brzini 12000 × g. Tako dobijeni RNK talog prečišćen je dvostrukim centrifugiranjem u 75% rastvoru etanola u vodi tretiranoj dietil - pirokarbonatom (DEPC, 0,0001% DEPC u dejonizovanoj vodi, autoklavirano) u trajanju od 5 minuta na temperaturi 4 °C i pri brzini 7500 × g. Nakon odlivanja supernatanta, RNK talog je osušen na vazduhu i rastvoren u UltraPure vodi (Invitrogen, SAD) koja ne sadrži DNKazne i RNKazne enzime. Po rastvaranju, koncentracija RNK u uzorcima određivana je merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm na spektrofotometru. Stepent kontaminacije uzoraka proteinima i organskim jedinjenjima određivan je pomoću odnosa apsorbanci na talasnim dužinama od 260 i 280 nm, odnosno apsorbanci na talasnim dužinama 260 i 230 nm. Uzorci kod kojih su ovi odnosi imali vrednost između 1.8 i 2.0, smatrani su nekontaminiranim. Nakon određivanja koncentracije i stepena čistoće, zapremina uzorka koja sadrži 1 µg RNK korišćena je dalje za sintezu komplementarne DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije.

1.3. Sinteza cDNK

Za sintezu cDNK korišćena je metoda reverzne transkripcije. Sinteza je izvedena uz pomoć „High Capacity cDNA Reverse Transcription“ kompleta (Applied Biosystems, SAD) prema sledećem protokolu: zapremini uzorka koja sadrži 1 µg RNK dodata je UltraPure voda do 10 µl zapremine, a zatim Master Mix smeša reagenasa za reverznu transkripciju do 20 µl ukupne zapremine. Tako pripre

Tabela 2. Sastav smeše reagenasa za reverznu transkripciju po uzorku.

Reagens	Zapremina (µl)
25× dNTP (100 mM)	0.8
10× nasumični prajmeri	2
Enzim MultiScribe™ reverzna transkriptaza	1
10× pufer za reverznu transkripciju	2
UltraPure voda	4.2

mljeni uzorci dalje su izlagani sledećem termalnom ciklusu: 25°C tokom 10 minuta, 37°C tokom 2 sata i 85°C tokom 5 minuta. Sastav Master Mix smeše reagenasa za reverznu transkripciju po uzorku prikazan je u Tabeli 2. Dobijeni uzorci cDNK razblaženi su 10x i korišćeni za analizu genske ekspresije metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

1.4. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu

Nivo genske ekspresije različitih gena od interesa određivan je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu na „QuantStudio™ 3 Real-time PCR System“ aparatu (Applied Biosystems, SAD) i analiziran pomoću QuantStudio™ Design and Analysis softvera. Primenjena je metoda SYBR Green zasnovana na interkalaciji fluorescentne boje u dvolančani molekul DNK. Merenje intenziteta fluorescentnog signala pomoću Ct vrednosti i praga fluorescentnog signala omogućava posredno određivanje količine cDNK odnosno iRNK prisutne u uzorku. Vrednost praga fluorescentnog signala (eng. threshold) odnosno granična vrednost pri kojoj fluorescentni signal nadjačava pozadinski signal je određena automatskom metodom u softveru, a Ct vrednost koja predstavlja broj ciklusa svakog uzorka neophodan da fluorescentni signal pređe vrednost praga očitana je na osnovu prazne vrednosti. Sastav reakcione smeše jednog uzorka prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Sastav reakcione smeše jednog uzorka.

Hemikalija	Zapremina
cDNK	2 µl
QTM SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, SAD)	5 µl
UltraPure voda (Invitrogen, Nemačka)	2 µl
Sense prajmer specifičan za gen od interesa (Invitrogen, Nemačka)	0.5 µl
Antisense prajmer specifičan za gen od interesa (Invitrogen, Nemačka)	0.5 µl

Uslovi reakcije bili su sledeći: aktivacija „hot start“ enzima Taq polimeraze na 95 °C u trajanju od 10 minuta praćena sa 40 termalnih ciklusa sa sledećim koracima: denaturacija na 95 °C u trajanju od 15 sekundi, vezivanje prajmera za DNK lanac na optimalnoj temperaturi određenoj za svaki prajmer u trajanju od 30 sekundi, elongacija sintetisanog DNK lanca na 72°C u trajanju od 30 sekundi i merenje fluorescentnog signala na 72 °C u trajanju od 5 sekundi. Sekvence prajmera korišćenih u ovoj metodi prikazane su u Tabeli 4. Za određivanje relativnog nivoa ekspresije gena od interesa u svakoj vremenskoj tački bolesti u odnosu na internu kontrolu, odnosno nivo ekspresije gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (*eng.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), korišćena je 2^{-dCt} metoda računanja. Rezultati su izračunati kao odnos iRNK gena od interesa u vremenskoj tački bolesti i GAPDH i predstavljeni kao množilac ili procenat vrednosti dobijene za Fk koja je predstavljena kao 1 ili 100%. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu ponovljena je najmanje dva puta za svaki gen od interesa sa $n \geq 5$ uzoraka po eksperimentalnoj grupi iz dva životinjska eksperimenta.

Tabela 4. Sekvence prajmera.

Gen od interesa	Sense sekvenca	Antisense sekvenca
<i>Entpd1</i>	TCAAGGACCCGTGCTTTTAC	TCTGGTGGCACTGTTTCGTAG
<i>Entpd2</i>	CCCTCATGACCTTCTTCCTG	CCAAGAGACCCGGTATAGCA
<i>Entpd3</i>	GCCTCCACCCAGATATCCTT	CCGTAGCACTGGAACTGTG
<i>Nt5e</i>	CAAATCTGCCTCTGGAAAGC	ACCTTCCAGAAGGACCCTGT

<i>P2ry1</i>	CTGGATCTTCGGGGATGTTA	CTGCCCAGAGACTTGAGAGG
<i>P2ry12</i>	CGAAACCAAGTCACTGAGAGA	CCAGGAATGGAGGTGGTGTG
<i>P2ry13</i>	GGCATCAACCGTGAAGAAAT	TTGGCAATCACCGTGTA AAA
<i>P2rx1</i>	GTGTTTGGGATTCAC TTTGATA	TCTGCTTGTAGTAGTGCCTCTT
<i>P2rx2</i>	AGAAGAGTGACTACCTCAAGCA	ACAGTTCCAGTTGATGATGACT
<i>P2rx3</i>	CCTCACCGACAAGGACATA	ACACCCAGCCGATCTTAAT
<i>P2rx4</i>	TCCTGATAAGACCAGCATTT	CAAGAGGGTGAAGTTTTCTG
<i>P2rx5</i>	CAAATCTCTACTGTCCCATCTT	TAGTAGTGTGGGTTGCATTTAG
<i>P2rx7</i>	TCGGAGAGA ACTTTACAGAGG	TCGGAGAGA ACTTTACAGAGG
<i>Adora1</i>	GTGATTTGGGCTGTGAAGGT	GAGCTCTGGGTGAGGATGAG
<i>Adora2a</i>	TGCAGAACGTCACCAACTTC	CAAAACAGGCGAAGAAGAGG
<i>Adora2b</i>	CGTCCCGCTCAGGTATAAAG	CCAGGAAAGGAGTCAGTCCA
<i>Adora3</i>	TTCTTGTTTGCCTTGTGCTG	AGGGTTCATCATGGAGTTCG
<i>Aif1</i>	CCAGCGTCTGAGGAGCTATG	CGTCTTGAAGGCCTCCAGTT
<i>Itgam</i>	GACTCCGCATTTGCCCTACT	TGCCACAATGAGTGGTACAG
<i>Cx3cr1</i>	TTCTTCTCTTCTGGACGCCT	TGAGGCAGCAGTGGCTAAAC
<i>Nos2</i>	CAGCCCTCAGAGTACAACGAT	CAGCAGGCACACGCAATGAT
<i>Arg1</i>	TAACCTTGGCTTGCTTCGG	GTGGCGCATTACAGTCAC
<i>Cd68</i>	TGTGTGTCTGACCTTGCTGG	AAGGATGGCAGAAGAGTGGC
<i>Gapdh</i>	TGGACCTCATGGCCTACAT	GGATGGAATTGTGAGGGAGA

1.5. Izolacija grube membranske frakcije kičmene moždine

Lumbosakralni delovi kičmene moždine iz najmanje 3 životinje po eksperimentalnoj grupi sakupljeni su za svaku vremensku tačku. Gruba membranska frakcija izolovana je prema modifikovanoj metodi Greja i Vitakera (Gray & Whittaker 1962). Tkivu je određena masa, a zatim je homogenizovano uz pomoć manualnog teflonskog homogenizera na ledu u 10 zapremina pufera za izolaciju (0.32 M saharoza, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4). Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na temperaturi 4 °C i pri brzini 900 × g. Dobijeni supernatant, u kom se nalaze ćelijske membrane i organele, je zatim centrifugiran 40 minuta na temperaturi 4 °C i pri brzini 12000 x g. Dobijeni talog je zatim resuspendovan u 5 mM Tris-HCl puferu pH 7.4.

1.6. Određivanje koncentracije proteina

Nakon izolacije, koncentracija proteina određena je pomoću Micro BCA Protein Assay kompleta (ThermoFisher Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Metoda se zasniva na upotrebi bicinoninske kiseline kao reagensa za detekciju Cu⁺ koji nastaje redukcijom Cu²⁺ od strane proteina u alkalnoj sredini. Reakcija vezivanja dva molekula bicinoninske kiseline za jedan Cu⁺ jon je kolorimetrijska. Dobija se proizvod reakcije ljubičaste boje sa apsorbancom na talasnoj dužini 562 nm koja se linearno povećava sa koncentracijom proteina.

1.7. Western Blot

Uzorci membrana lumbosakralnih delova kičmene moždine pacova razblaženi su do finalne koncentracije 1 mg/ml, a zatim inkubirani 5 minuta na 95°C sa dodatkom 4× Lemli pufera za uzorke (BioRad, Švajcarska). Za detekciju ektonukleotidaza korišćeni su neredukujući uslovi, dok su za detekciju purinskih receptora korišćeni redukujući uslovi, odnosno u rastvor proteina dodato je 5% β -

merkaptetoetanolu. U svaki bunar 7.5% poliakrilamidnog gela naneta je zapremina uzorka koja sadrži jednaku količinu proteina koji su dalje razdvojeni na natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidnoj gel elektroforetskom sistemu (eng. sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Nakon elektroforeze, proteini su prebačeni na poliviniliden fluorid (eng. polyvinylidene fluoride, PVDF) membranu (Immobilion-P transfer membrane, Millipore, Nemačka) u sistemu vlažne komore za transfer. Nespecifično vezivanje je blokirano inkubacijom membrana u 5% albuminu seruma govečeta (BSA) ili 5% Blotto (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u TBST puferu (Tris pufer sa dodatkom deterdženta - 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Tween, pH 7.4) 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim su membrane inkubirane u rastvoru primarnog antitela u TBST preko noći na 4 °C. Sledećeg dana, nakon trostrukog ispiranja u TBST u trajanju od po 10 minuta, membrane su inkubirane sa IgG sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP) na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h. Za vizuelizaciju reakcije antigen - antitelo korišćena je metoda hemiluminescencije koja se zasniva na sposobnosti luminola da, u prisustvu HRP i vodonik peroksida, oksiduje i formira proizvod reakcije u ekscitovanom stanju koji prilikom vraćanja u normalno stanje emituje svetlost. Svetlosni signal ostavlja trajni zapis na rendgenskom filmu (Kodak, SAD). Relativna molekulska masa svake trake određena je metodom relativne distance migracije uz prisustvo proteinskog markera (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoFisher Scientific, SAD). Specifične trake za svako antitelo odabrane su prema očekivanoj molekularnoj težini navedenoj u uputstvu proizvođača antitela. Kvantifikacija signala izvršena je denzitometrijskom metodom u ImageJ softveru i normalizovana prema optičkoj gustini signala β-aktina u istoj traci i prikazana u odnosu na fiziološku kontrolu (čija je vrednost prikazana kao 100% ± standardna greška srednje vrednosti (SEM)). Prikazani rezultati određeni su za n ≥ 3 različita merenja. Specifikacija korišćenih antitela u ovoj metodi data je u Tabelama 8 i 9.

1.8. Priprema tkiva za imunohistohemijska i imunofluorescentna obeležavanja i metodu in situ hibridizacije

Lumbosakralni delovi kičmenih moždina pacova izolovani su na ledu i fiksirani u 4% rastvoru paraformaldehida u fosfatnom puferu 24h na 4 °C, a zatim dehidratirani u rastućim koncentracijama rastvora etanola. Tkiva su zatim ukalupljena u rastvoru baziranom na glikolu i smoli Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura® Finetek, SAD) u izopentanolu na suvom ledu i serijski sečena transverzalno na preseke debljine 20 μm na kriotomu (Leica, Nemačka). Dobijeni preseci su postavljeni na Menzel Glaeser Superfrost mikroskopske pločice (ThermoFisher Scientific, SAD).

1.9. In situ hibridizacija

U metodi *in situ* hibridizacije za kvalitativno određivanje nivoa genske ekspresije korišćeni su zamrznuti transverzalni preseci lumbosakralnih delova kičmene moždine pacova. Inicijalni korak ove metode podrazumeva je digestiju proteina rastvorom proteinaze K u vlažnoj komori u trajanju od 20 minuta pri temperaturi 37 °C. Nakon toga, preseci su ispirani 5 minuta u PBS, a zatim dehidratirani u seriji rastvora etanola rastuće koncentracije u trajanju od 1 minut. Nakon sušenja 15 minuta na vazduhu, preseci su prekriveni puferom za *in situ* hibridizaciju koji sadrži 1 ng/μl oligonukleotidne probe specifične za NTPDaza1/CD39 iRNK prethodno obeležene digoksigeninom (DIG) i inkubirani u vlažnoj komori preko noći u vodenom kupatilu na 42 °C. Kao negativna kontrola korišćeni su preseci inkubirani bez oligonukleotidne probe. Sekvenca oligonukleotidne probe specifične za NTPDaza1/CD39 iRNK je: GCTGGATGCCGGGTCGTCTCACACCAACCTGTACATCTAC. Za obeležavanje oligonukleotidnih proba molekulom digoksigenina korišćen je komplet „DIG Oligonucleotide 3' – End Labeling Kit, 2nd Generation“ (Roche, Švajcarska), a obeležavanje je

izvršeno prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša za obeležavanje oligonukleotidnih proba digoksigeninom inkubirana je na 37 °C tokom 30 min, a zatim je reakcija zaustavljena dodavanjem 2 µl 0.2 M etilen diamin tetra-sirćetne kiseline (EDTA). Sastav ove reakcione smeše nalazi se u Tabeli 5.

Tabela 5. Sastav reakcione smeše jednog uzorka

Hemikalija	Zapremina
Oligonukleotidna proba	100 pmol
UltraPure voda	do 10 µl
Pufer za reakciju, 5× (1M Kalijum-kakodilat, 0.125 M Tris-HCl 1.25 mg/ml BSA, pH 6.6)	4 µl
CoCl ₂ rastvor, 25 mM	4 µl
Digoksigeninom obeleženi dideoksiuridinski nukleotidi, DIG-11-ddUTP, 25 mM	1 µl
Terminalna transferaza, 400 U/µl (60 mM K ₃ PO ₄ , 150 mM KCl, 1 mM 2-merkaptoetanol, 0.5% Triton X-100, 50% glicerol)	1 µl

Sledećeg dana preseci su ispirani u seriji rastvora natrijum - citratnog pufera sa sadržajem soli (eng. saline-sodium citrate, SSC) opadajućih koncentracija: 5×, 1× i 0.2× SSC na 42 °C u trajanju od po 5 minuta, a zatim jednom u 0.2× SSC puferu na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Nakon toga preseci su ispirani u PBS na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Za blokiranje nespecifičnog vezivanja korišćen je pufer sa 0.01% seruma fetusa govečeta (FCS) i 0.01% BSA na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon blokiranja, preseci su inkubirani sa antitelom specifičnim za DIG konjugovanim sa alkalnom fosfatazom (1:200, 011093274910, Roche, Švajcarska) na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata. Preseci su nakon toga ispirani u PBS sa 0.1% Tween-20 u trajanju od 5

Tabela 6. Rastvori korišćeni u metodi *in situ* hibridizacije i njihov sastav.

Naziv	Sastav i proizvođač
Pufer za proteinazu K	5 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 1 mM NaCl
Radni rastvor proteinaze K	15 µg/ml Proteinaza K koncentrovanog rastvora (Invitrogen, SAD) u Proteinaza K puferu
20× SSC	3 M NaCl 0.3 M Na-citrat, pH 7
Denhardt-ov rastvor, 100×	2% Ficoll 2% polivinilpirolidon (Sigma, Švajcarska) 2% BSA (Sigma, Švajcarska)
Pufer za <i>in situ</i> hibridizaciju	50% formamid (Zorka, Šabac) 20% 20×SSC 5% fosfatni pufer 5% Denhardt-ov rastvor, 100× 10 g/ml DNK iz sperme haringe (Sigma, Švajcarska)

minuta. Za vizuelizaciju signala korišćen je supstrat za alkalnu fosfatazu azot-plavo tetrazolijum (NBT) i 5-brom-4-hlor-3'-indolifosfat (BCIP) prema uputstvu proizvođača (Roche, Švajcarska). Rastvor levamizola koncentracije 0.2 µM korišćen je za zaustavljanje reakcije alkalne fosfataze. Nakon vizuelizacije *in situ* hibridizacije i ispiranja, na presecima je rađena metoda imunohistohemijskog obeležavanja antitelom specifičnim za GFAP na način opisan u sledećem poglavlju. Svi rastvori

korišćeni u ovoj metodi napravljeni su u vodi tretiranoj DEPC i sterilisani, a njihov sastav prikazan je u Tabeli 6. Metoda *in situ* hibridizacije sa imunohistohemijskim obeležavanjem ponovljena je najmanje tri puta.

1.10. Imunohistohemijsko obeležavanje

Zamrznuti preseci lumbosakralnih delova kičmene moždine DA pacova debljine 20 µm temperirani su na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim ispirani trostruko u PBS rastvoru u trajanju od po 5 minuta. Blokiranje aktivnosti endogene peroksidaze izvršeno je inkubacijom preseka u 1% rastvoru vodonik peroksida u metanolu. Nakon trostrukog ispiranja u PBS rastvoru u trajanju od po 5 minuta, nespecifično vezivanje blokirano je inkubacijom preseka u 10% normalnog magarećeg seruma u PBS. Preseci su zatim inkubirani preko noći na 4 °C sa rastvorom primarnog antitela. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, usledilo je trostruko ispiranje u PBS rastvoru u trajanju od po 5 minuta, a zatim inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa HRP na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h. Specifična reakcija antigen - antitelo vizuelizovana je pomoću 3, 3' - diaminobenzidin - tetrahlorid (DAB) kompleta za obeležavanje HRP – konjugovanih antitela (Vector Laboratories, SAD). Višak boje uklonjen je ispiranjem u vodi, preseci su dehidratirani u rastvorima etanola rastuće koncentracije i odbojeni u ksilolu, a zatim je na njih montirano pokrovno stakalce uz pomoć DPX medijuma za montiranje (Sigma, Švajcarska). Specifikacije korišćenih primarnih i sekundarnih antitela nalazi se u Tabelama 8 i 9.

1.11. Imunofluorescentno obeležavanje

Zamrznuti preseci lumbosakralnih delova kičmene moždine DA pacova debljine 20 µm temperirani su na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim ispirani u PBS rastvoru tri puta po 5 minuta. Nespecifično vezivanje blokirano je jednočasovnom inkubacijom preseka sa 1% BSA u PBS na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja usledila je inkubacija preseka sa primarnim antitelom na 4 °C preko noći u vlažnoj komori. Preseci su nakon inkubacije sa primarnim antitelom trostruko ispirani u PBS rastvoru u trajanju od po 5 minuta, a zatim inkubirani sa rastvorom sekundarnog antitela obeležnog fluoroforom u PBS, na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h. Potom je nakon trostrukog ispiranja u PBS u trajanju od po 5 minuta u slučaju dvostrukog, odnosno trostrukog imunofluorescentnog obeležavanja, ceo postupak bi bio ponovljen jednom odnosno dva puta počev od blokiranja nespecifičnog vezivanja preko inkubacije sa primarnim antitelom do inkubacije sa odgovarajućim sekundarnim antitelom. Jedra ćelija obeležena su inkubacijom preseka sa 5 µg/ml rastvorom fluorescentne boje Hoechst 33342 u PBS (Life technologies, SAD) na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Preseci su zatim ispirani u PBS rastvoru u cilju smanjenja pozadinskog signala. Kao kontrole bojenja korišćeni su preseci inkubirani sa rastvorom preimunog seruma u PBS iste koncentracije kao i odgovarajuće primarno antitelo, odnosno sa PBS bez primarnog antitela. Pokrovna stakalca su zatim montirana na pločice pomoću Mowiol vodenog medijuma za montiranje (Calbiochem, Nemačka). Specifikacije korišćenih primarnih i sekundarnih antitela nalaze se u Tabelama 8 i 9.

1.12. Kvantifikacija imunofluorescence i analiza kolokalizacije

Fluorescentne mikrografije dobijene su pomoću Zeiss Axiovert fluorescentnog mikroskopa (Zeiss, Nemačka) ili Leica TCS MP5 konfokalnog mikroskopa. Analiza mikrografija dobijenih pomoću Zeiss Axiovert fluorescentnog mikroskopa urađena je u ImageJ softveru, dok je analiza mikrografija dobijenih pomoću konfokalnog mikroskopa urađena pomoću Leica Microsystems LAS AF TCS MP5

Software®. Broj infiltrata po preseku kičmene moždine, kao i broj ćelija po infiltratu određeni su manuelno uz korišćenje „Multipoint” alatke u ImageJ softveru na $n \geq 6$ preseka po kičmenoj moždini za svaku fazu bolesti iz najmanje 3 životinje za dva nezavisna eksperimenta. Intenzitet fluorescence za NTPDaza1/CD39 signal određivan je pomoću “Measure” alatke kao integrisani intenzitet fluorescence na celoj mikrografiji za $n \geq 3$ mikrografije po regionu kičmene moždine za $n \geq 6$ preseka po kičmenoj moždini za svaku eksperimentalnu grupu. Pri računanju ukupnog intenziteta fluorescence oduzimana je vrednost pozadinskog signala. Regioni kičmene moždine označeni su kao: dorzalna siva masa (DSM), dorzalna bela masa (DBM), lateralna bela masa (LBM), ventralna siva masa (VSM) i ventralna bela masa (VBM). Intenzitet fluorescence NTPDaza1/CD39 signala na telima motoneurona određivan je kao intenzitet fluorescence označenog regiona od interesa za $n \geq 3$ ROI po preseku za $n \geq 6$ preseka po kičmenoj moždini za sve eksperimentalne grupe. ROI je određen manuelno oivičavanjem tela motoneurona u ventralnoj sivoj masi kičmene moždine pacova. Sve mikrografije korišćene za analizu intenziteta fluorescence slikane su pod istim uslovima odnosno pod istim vremenom ekspozicije za sve eksperimentalne grupe. Za analizu stepena preklapanja i korelacije dva fluorescentna signala nakon imunofluorescentnog obeležavanja korišćeni su Pirsonov koeficijent korelacije (PKK) i Mandersov koeficijent kolokalizacije (MKK) signala u JACoP softverskom dodatku za ImageJ (Dunn *i sar.* 2011). Vrednosti ovih koeficijenata određivane su nakon softverskog oduzimanja pozadinskog signala i manualnog određivanja praga fluorescence za $n \geq 3$ mikrografije po regionu za $n \geq 6$ preseka po kičmenoj moždini za svaku eksperimentalnu grupu za dva nezavisna eksperimenta. PKK je statistički parametar koji odražava i preklapanje signala – stepen pri kom su intenziteti dva signala za svaki piksel iznad granične vrednosti pozadinskog signala; i njihovu korelaciju za svaki piksel, koja može biti nepostojeća, pozitivna ili negativna. Shodno tome, njegova numerička vrednost može biti od -1 do 1, pri čemu -1 označava negativnu korelaciju, 0 odsustvo korelacije, a 1 pozitivnu korelaciju. MKK je parameter koji određuje stepen preklapanja dva signala, odnosno udeo piksela u kojima su prisutna oba signala u odnosu na ukupan broj piksela u kojima je prisutan jedan od signala. Na taj način dobijaju se dve MKK vrednosti, MKK1 i MKK2. MKK1 predstavlja udeo dvostruko pozitivnih piksela u ukupnom broju piksela pozitivnih na prvi fluorescentni signal, dok MKK2 predstavlja udeo dvostruko pozitivnih piksela u ukupnom broju piksela pozitivnih na drugi fluorescentni signal. Njihove numeričke vrednosti mogu biti od 0, što znači da ne dolazi do preklapanja dva fluorescentna signala, do 1, što znači da je prisutno njihovo potpuno preklapanje. Kvantifikacija preklapanja NTPDaza2 i GFAP, odnosno nestin fluorescentnih signala na presecima lumbosakralnog dela kičmene moždine urađena je deljenjem preseka na 4 kvadranta po principu dorzalne/ventralne i leve/desne simetrije. Za svaki kvadrant odabrana su 2 do 4 polja u okviru kojih je određivan broj ćelijskih nastavaka koji su jednostruko NTPDaza2/GFAP/nestin ili dvostruko NTPDaza2/GFAP i NTPDaza2/nestin obeleženi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost procenta jednostruko ili dvostruko obeleženih nastavaka u odnosu na ukupan broj obeleženih nastavaka (\pm SEM) za $n \geq 6$ preseka kičmene moždine po životinji za $n \geq 3$ životinje po eksperimentalnoj grupi.

1.13. Izolacija limfocita iz poplitealnih limfnih čvorova

Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz ekstremiteta imunizovanih pacova, na ledu, a zatim homogenizovani u sterilnim uslovima kroz najlonsku mrežicu. Ćelije su rastvorene u 5% FCS u sterilnom fosfatnom puferu sa dodatkom soli (PBS) za ćelijsku kulturu (Tabela 7) i centrifugirane 3 minuta pri brzini od $700 \times g$. Dobijeni talozi su resuspendovani u PBS i filtrirani kroz 50 μ m Falcon™ ćelijski filter (ThermoFisher Scientific, SAD). Ukupan broj ćelija određen je uz pomoć hemocitometra. Dobijena ćelijska suspenzija je dalje korišćena za analizu metodom protočne citofluorimetrije.

Tabela 7. Sastav rastvora korišćenih za izolaciju limfocita.

Naziv	Sastav i proizvođač
10× PBS	Dulbecco PBS bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ (PAA Laboratories, Austrija)
1× PBS	900 ml sterilne vode 100 ml sterilnog 10× PBS
FCS	Invitrogen, SAD Inaktiviran u vodenom kupatilu na 56°C tokom 30 min

1.14. Izolacija mononuklearne frakcije ćelija iz kičmene moždine

Izolovani lumbosakralni regioni kičmene moždine su homogenizovani kroz najlonsku mrežicu i resuspendovani u sterilnom PBS. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 3 minuta na 800 x g, a dobijeni talog je resuspendovan u 30% rastvoru Percoll-a (Sigma-Aldrich, SAD). Tako dobijena suspenzija je polako prelivena u tubu sa 70% rastvorom Percoll-a koja je zatim centrifugirana 50 minuta pri brzini 870 × g. Središnji sloj sa ćelijama infiltrata je izdvojen, resuspendovan u PBS i centrifugiran 10 minuta pri brzini 900 × g. Dobijeni talog je resuspendovan u PBS rastvoru i tako dobijene ćelije korišćene su za analizu metodom protočne citofluorimetrije.

1.15. Protočna citofluorimetrija

Nakon izolacije ćelija iz drenirajućih limfnih čvorova odnosno infiltrata kičmene moždine, ćelije su prebrojane u hemocitometru i 10⁶ ćelija svake eksperimentalne grupe je centrifugirano i resuspendovano u PBS sa 10% normalnog seruma pacova i primarnim antitelima za CD4, CD40 i CD45 odnosno NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 u odgovarajućim koncentracijama (Tabela 8) tokom 45 minuta na 4 °C. Ćelije su zatim dva puta kratkotrajno ispirane u PBS, a zatim inkubirane sa rastvorom odgovarajućeg sekundarnog antitela u PBS (Tabela 9), osim u slučaju primarnog antitela za CD45 koje je konjugovano sa fikoeritriinom. Nakon trostrukog ispiranja u PBS rastvoru, urađena je analiza metodom protočne citofluorimetrije na CyFlow® Space Partec aparatu (Partec, Nemačka). Dobijeni podaci analizirani su pomoću PartecFloMax® softvera (Partec, Nemačka). Metoda je ponovljena minimum dva puta iz dva životinjska eksperimenta sa n ≥ 3 uzoraka iz različitih životinja po eksperimentalnoj grupi.

Tabela 8. Spisak upotrebljenih primarnih antitela.

Antitelo	Izvor i tip	Razblaženje	Proizvođač
NTPDaza1/CD39	zamorac, poliklonsko	1:200 (IF) 1:400 (FACS)	ectonucleotidases-ab.com, Kanada #mN1-2C(I4,I5)
GFAP	miš, monoklonsko	1:500	UC Davis/NIH NeuroMab Facility, SAD, #73-240
Iba1	koza, poliklonsko	1:400	Abcam, V. Britanija #ab5076
CD68	miš, monoklonsko	1:100	Abcam, V. Britanija #ab31630
iNOS	zec, poliklonsko	1:200	Abcam, V. Britanija #ab15323,
Arg1	zec, poliklonsko	1:200	Sigma, Švajcarska #AV45673
Glutamin sintetaza	zec, poliklonsko	1:1000	Abcam, V. Britanija

Vimentin	miš, monoklonsko	1:200	#ab49873, Dako, Danska
Cox-2	koza, poliklonsko	1:50	#M0725 Santa Cruz, SAD
C3	koza, poliklonsko	1:500	#sc-1745 ThermoFisher Scientific, SAD
NF-H/SMI32	miš, monoklonsko	1:2000	#PA1-29715 Covance Research Products Inc, SAD
NTPDaza2	zec, poliklonsko	1:2000 (WB) 1:200 (IHC, IF)	ectonucleotidases-ab.com, Kanada
eN/CD73	zec, poliklonsko	1:100 (FC) 1:5000 (WB)	#rN2-6L Cell Signaling Technology, SAD
eN/CD73	zec, poliklonsko	1:100 (FACS)	#13160 ectonucleotidases-ab.com, Kanada
P2Y1	zec, poliklonsko	1:1000 (WB)	#rNu-9L(I4,I5) Alomone Labs, Izrael
P2Y12	zec poliklonsko	1:1000 (WB)	#APR-0009 Sigma, Švajcarska
P2Y13	zec, poliklonsko	1:1000 (WB)	#P4817 Alomone Labs, Izrael
Nestin	miš, monoklonsko	1:100 (IF)	#APR-017 Sigma, Švajcarska
CD4	miš, monoklonsko	1:500 (IF) 1:100 (FACS)	#N5413 Sigma-Aldrich, Švajcarska
CD40	zec, poliklonsko	1:100 (FACS)	#SAB4700733 Abcam, V. Britanija
CD45	miš, monoklonsko kojugovano sa fikoeritriinom	1:10 (FACS)	ab65853 Bio-Rad
MBP	miš, monoklonsko	1:100 (IF)	MCA43PE BioLegend, SAD
NG2	miš, monoklonsko	1:50 (IF)	#801703 Sigma, Švajcarska
O4	miš, monoklonsko	1:100 (IF)	#N8912 Millipore, SAD
β-Aktin	miš, monoklonsko	1:7500 (WB)	#MAB345 Sigma, Švajcarska
			#A5316

Tabela 9. Spisak upotrebljenih sekundarnih antitela.

Tip	Poreklo	Target	Razblaženje	Proizvođač
IgG AlexaFluor 350	magarac	miš	1:250	Invitrogen, SAD #A-10035
IgG AlexaFluor 350	magarac	koza	1:250	Invitrogen, SAD #A-21081
IgG Alexa Fluor 488	magarac	koza	1:250	Invitrogen, SAD #A-11055
IgG Alexa Fluor 488	magarac	zec	1:250	Invitrogen, SAD #A-21206
IgG AlexaFluor 555	koza	zamorac	1:250	Invitrogen, SAD #A-21435
IgG AlexaFluor 555	magarac	zec	1:200 (IF)	Invitrogen, SAD #A-21428
IgG AlexaFluor 555	magarac	miš	1:200 (IF, FACS)	Invitrogen, SAD #A-31570
IgG HRP	magarac	miš	1:250 (IHC)	Santa Cruz, SAD #sc-2314
IgG HRP	magarac	zec	1:5000	Santa Cruz, SAD #sc2305

2. Održavanje Oli-neu ćelijske kulture

Oli-neu je ćelijska linija oligodendrocitnih progenitora miša dobijena iz O2-A ćelija imortalizovana stabilnom transfekcijom t-neu tirozin kinazom (Jung *i sar.* 1995). Uslovi za održavanje kulture podrazumevali su gajenje ćelija u SATO medijumu sa 2% FCS na 37°C, 5% CO₂ u vlažnoj atmosferi. Ćelije su po dostizanju konfluentnosti od 80% deljene u odnosu 1 : 5 na 2 - 3 dana. Prilikom

Tabela 10. Sastav sterilnih rastvora korišćenih u kulturi ćelija.

Hemikalija	Sastav
DMEM	(Life technologies, Invitrogen, SAD) Visok sadržaj glukoze Sa Na-piruvatom
SATO medijum	Receptura za 500 ml medijuma: 485 ml DMEM medijuma 5 ml N2 suplementa (Invitrogen, SAD) 100 µl Biotin (500 µmol/L, Sigma, Švajcarska) 5 ml BSA (100 mg/ml, Sigma, Švajcarska) 5 ml Penicilin/Streptomycin (PAA Laboratories, Austrija) 500 µl N-acetil-cistein (Sigma, Švajcarska)
Poli-D-lizin hidrobromid	(Sigma, Švajcarska) Oblaganje bunarića poli-d-lizin hidrobromidom pre zasejavanja ćelija: Bunarići su obloženi 10 mg/L rastvorom poli-D-lizin hidrobromida u trajanju od 5 minuta, a zatim isprani vodom i sušeni minimum 2 h u laminaru
Tripsin/EDTA	0.1% tripsin 0.008% EDTA u rastvoru PBS (Invitrogen, SAD)

postavke eksperimenta, ćelije su ispirane u PBS, a zatim odvojene od podloge tripsinizacijom. Tripsinizacija je prekinuta dodavanjem Dulbekovog modifikovanog Iglvog medijuma (eng. Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) sa 10% FCS i 1% Penicilin/Streptomycin, a zatim su ćelije centrifugirane na $870\times g$ tokom 5 minuta, resuspendovane u SATO medijumu sa 0.5% FCS i zasejane na ploče sa odgovarajućom veličinom bunarića obloženih rastvorom poli-d-lizin hidrobromida. Poli-D-lizin hidrobromid formira pozitivno naelektrisani jednosloj na polistirenskoj površini, što omogućava bolju adeherentnost, rast i diferencijaciju kod određenih tipova ćelija u uslovima kada u medijumu ima malo ili nimalo seruma. Tako zasejane ćelije inkubirane su 48 h, a zatim tretirane proinflamacijskim faktorima u trajanju od 4 ili 24 h. U eksperimentalnoj postavci korišćeni su sledeći proinflamacijski faktori: LPS (100 ng/ml, Escherichia coli 0111:B4, Invitrogen, SAD), TNF- α (100 ng/ml, Invitrogen, SAD), IFN- γ (100 U/ml, Peprotech, SAD) i ATP (1 mM, Sigma, Švajcarska). Specifikacije medijuma i suplemenata, kao i rastvora za tripsinizaciju korišćenih za rad u kulturi ćelija nalaze se u Tabeli 10.

2.1. Određivanje vijabilnosti ćelija

Za određivanje vijabilnosti Oli-neu ćelija pod dejstvom proinflamacijskih faktora korišćena su dva eseja: Cell Titer Blue (CTB, Promega, SAD) i 3-(4,5'-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT). Za oba eseja zasejano je 150 000 ćelija po bunariću u pločama sa 24 bunarića obloženih poli-d-lizinom. Ćelije su inkubirane 48 h, a zatim je primenjen tretman proinflamacijskim faktorima u trajanju od 24 h.

CTB esej se zasniva na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da pretvaraju rezazurin sa maksimalnom apsorbancom na 605 nm u rezorufin sa maksimalnom apsorbancom na 573 nm. CTB reagens je dodat u eksperimentalni medijum (SATO + 0.5% FCS) u odnosu 1:5, a zatim su ćelije inkubirane u inkubatoru na 37 °C tokom 40 minuta. Medijumi iz različitih eksperimentalnih grupa su prebačeni u ploču sa 96 bunarića u duplikatu i određivana je apsorbanca na 570 nm i 600 nm na ELISA čitaču za mikrotitar ploče, pri čemu je vrednost apsorbanca na 600 nm korišćena kao korektivna vrednost. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

MTT esej se zasniva na sposobnosti živih ćelija da redukuju MTT do formazana uz pomoć mitohondrijskih enzima. Dobijeni formazan se taloži u vidu kristala ljubičaste boje te je reakcija vidljiva golim okom. MTT koncentrovani rastvor napravljen u eksperimentalnom medijumu (5 mg/ml) dodaje se u svaki bunarić tako da finalna koncentracija bude 0.5 mg/ml, a zatim se ćelije inkubiraju u inkubatoru na 37 °C tokom 30 minuta. Kako nisu svi formirani kristali pričvršćeni za dno bunarića, neophodno je odliti medijum u mikrotube i centrifugirati na $2000 \times g$ tokom 3 minuta. Za rastvaranje preostalih kristala u bunarićima korišćen je DMSO, a tako dobijen rastvor je zatim spojen sa odgovarajućim staloženim kristalima u mikrotubama. Iz svake mikrotube preneto je po 80 μ l u triplikatu na ploču sa 96-bunarića, a zatim je na ELISA čitaču očitana apsorbanca na 540 nm i 670 nm, pri čemu je vrednost apsorbanca na 670 nm korišćena kao korektivna vrednost. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu, za čiju je vijabilnost arbitrarno uzeta vrednost 100%.

2.2. Izolacija RNK iz Oli-neu ćelija

Izolacija RNK urađena je standardnom fenol-hloroform metodom za izolaciju korišćenjem PeqGold RNA Pure® prema uputstvu proizvođača. Koncentracija RNK i stepen kontaminacije određeni su prethodno opisanom spektrofotometrijskom metodom, merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm, odnosno, određivanjem odnosa apsorbanci na 260 i 280 nm, kao i 260 i 230 nm. Zapremina uzorka koja sadrži 1 µg RNK uzeta je za reverznu transkripciju, koja je potom urađena prema prethodno opisanom protokolu za reverznu transkripciju RNK izolovane iz kičmene moždine. Tako dobijena nerastvorena cDNK upotrebljena je u metodu lančane reakcije polimeraze (eng. polymerase chain reaction, PCR), dok je cDNK rastvorena u UltraPure vodi u odnosu 1:10 korišćena u metodi lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

2.3. Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR)

Metoda lančane reakcije polimeraze podrazumeva amplifikaciju željene sekvence DNK pomoću termostabilne polimeraze i specifičnog oligonukleotidnog prajmera. Iz pripremljene Master Mix smeše za lančanu reakciju polimeraze čiji je sastav po jednom uzorku prikazan u Tabeli 11, u mikrotube za PCR pipetirano je po 11.75 µl, a zatim je u svaku od mikrotuba dodat po 1 µl uzorka cDNK.

Tabela 11. Sastav smeše reagenasa za PCR po uzorku.

Reagens	Zapremina (µl)
UltraPure voda	9.3
10x PCR pufer	1.25
MgCl ₂	3.8
dNTP, 25 mM	0.25
sense Prajmer	0.25
antisense Prajmer	0.25
Taq Polimeraza	0.08

Nakon kratkotrajnog centrifugiranja tubice su postavljene u Eppendorf™ Mastercycler™ Nexus Thermal Cycler aparat i uključen je sledeći program temperaturnih ciklusa:

95 °C / 3 min => (95 °C /40 sek + AT 40 sek + 72 °C / 45 sek) x Broj ciklusa =>72 °C / 2 min => 4 °C

Standardni broj ciklusa u ovoj metodi je 40 i taj broj ciklusa bio je korišćen pri svim analizama, osim pri reakciji određivanja kontaminacije genomskom DNK, gde je broj ciklusa bio 30.

2.4. Detekcija kontaminacije genomskom DNK metodom PCR

Metoda otkrivanja kontaminacije genomskom DNK pri izolaciji RNK podrazumeva PCR sa datim uzorcima sa posebno dizajniranim prajmerom za neki od referentnih gena, u ovom slučaju HPRT. Prajmer je dizajniran tako da svojom sekvencom komplementarno vezuje kompletnu intronsku i delimične ili kompletne sekvence susednih egzona. Budući da nakon transkripcije dolazi do isecanja intronske sekvence iz iRNK čime ona postaje funkcionalna i spremna za translaciju, nakon reverzne transkripcije i PCR, dobro izolovan uzorak poseduje samo jedan tip amplikona nastao kao posledica amplifikacije cDNK koja sadrži samo egzonske sekvence. Međutim, uzorak koji je prilikom izolacije RNK kontaminiran genomskom DNK, nakon reverzne transkripcije i ove PCR metode, pored pomenutog tipa amplikona sadržiće i amplikon koji sadrži i intronske i egzonske sekvence, dakle

amplikon sa većom dužinom sekvence. Kontaminaciju izolovane RNK genomskom DNK moguće je vizuelizovati agaroznom gel elektroforezom.

2.5. *Određivanje optimalne temperature hibridizacije prajmera*

Optimalna temperatura hibridizacija prajmera određuje se prema prethodno opisanoj metodi lančane reakcije polimeraze, sa modifikovanim protokolom. Master Mix smeša je napravljena na prethodno opisan način za 8 uzoraka, a u nju je dodato 8 µl cDNK iz tkiva za koje je poznato da eksprimira gen od interesa. Nakon razlivanja po 12.75 µl smeše u 8 PCR mikrotuba i njihovog postavljanja u PCR, odabran je program pri kom je ploča u PCR aparatu u kojoj se nalaze tubice sa uzorcima izložena temperaturnom gradijentu 55 – 65 °C, tako da je u svakoj koloni ploče različita temperatura tokom koraka hibridizacije. Program termalnih ciklusa bio je sledeći:

95 °C / 3 min => (95 °C / 40 sek + gradijent 55-65 °C / 40 sek + 72 °C / 40 sec) x 35 ciklusa => 4 °C

Nakon lančane reakcije polimeraze, uzorci amplifikovani na različitim temperaturama razdvojeni su agaroznom gel elektroforezom. Nakon vizuelizacije gela u UV komori, određena je optimalna temperatura hibridizacije prema tome koja je traka najjača, odnosno gde je reakcija polimerizacije imala najveću efikasnost. Sekvence prajmera korišćenih u analizi genske ekspresije, kao i njihove optimalne temperature anihilacije prikazane su u Tabeli 12.

Tabela 12. Sekvence korišćenih prajmera i njihove optimalne temperature anihilacije.

Gen od interesa	Sense sekvenca	Antisense sekvenca	Temperatura anihilacije
<i>18s</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	60
<i>Hprt</i>	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	CACAGGACTAGAACACCTGC	60
<i>Entpd1</i>	AAGGTGAAGAGATTTTGCTCAA	TTTGTCTGGGTCAGTCCCAC	63
<i>Entpd2</i>	TGCGCCTACTCAACCTGAC	CCCAGCCATACTTGATGAAGTT	63
<i>Entpd3</i>	TTGTGAGCATTGTGGTACTTGT	GGCCACTGATACACGTAGACAG	60
<i>Nt5e</i>	GGACATTTGACCTCGTCCAAT	GGGCACTCGACTTGGTG	64

2.6. *Tretman ćelija i metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu*

Oli-neu ćelije zasejane su na ploče sa 6 bunarića obložene poli-d-lizinom sa gustinom od 400.000 ćelija po bunariću, inkubirane u standardnim uslovima 48 h, a zatim im je izolovana RNK ili su prethodno tretirane proinflamacijskim faktorima LPS, TNF- α , IFN- γ i ATP u trajanju od 4 h. Analiza bazalne ekspresije odabranih gena, kao i njene eventualne promene pod dejstvom proinflamacijskih faktora urađena je pomoću metode lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu na način prethodno opisan na ABI Prism 7000 Sequence Detection System aparatu (Applied Biosystems, SAD). Kvalitet lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu proveren je analizom krive topljenja. Ova analiza zasniva se na činjenici da svaki molekul DNK određene dužine i nukleotidnog sastava ima svoju temperaturu pri kojoj dolazi do denaturacije. Kako prilikom denaturacije DNK u ovom sistemu dolazi do naglog povećanja intenziteta izmerene fluorescence, njegovim praćenjem pri rastućim temperaturama može se utvrditi prisustvo jednog ili više tipova amplikona. Ukoliko rezultati krive topljenja ukazuju na jedan skok intenziteta fluorescence odnosno jedan tip amplikona, i dalje je neophodno utvrditi da li je ista tačka topljenja zaista posledica prisustva jednog tipa amplikona ili dva tipa koji imaju istu tačku topljenja. Budući da istu tačku topljenja mogu imati dva amplikona od kojih jedan ima dužu sekvencu sa manjim brojem G i C nukleotida, a drugi kraću sekvencu sa većim brojem

G i C nukleotida, neophodno je produkte lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu razdvojiti gel elektroforezom. Ukoliko se nakon vizuelizacije detektuje jedna traka, smatra se da je produkt reakcije specifičan, što je bio slučaj u ovoj analizi.

2.7. Gel elektroforeza

Uzorci amplifikovani metodom lančane reakcije polimeraze vizuelizuju se pomoću metode agarozne gel elektroforeze. Uzorci su naliveni na 2% agarozni gel u Tris-Borat-EDTA (TBE, Tabela 13) puferu u kom se i vrši elektroforeza. U gel je nakon ključanja dodato 5 µl etidijum-bromida (0.5 µg/ml, Bio-Rad, SAD). Kao marker dužine uzoraka korišćen je Easy Ladder I (Bioline, V. Britanija), a elektroforeza je vršena tokom 40 minuta na 160 V. Uzorci razdvojeni elektroforezom vizuelizovani su pod UV svetlom u GelDoc aparatu (Bio-Rad, SAD).

Tabela 13. Sastav rastvora korišćenih za agaroznu gel elektroforezu.

Naziv	Sastav
TBE pufer	Napravljeno rastvaranjem Tris-Borat-EDTA pufera (5×): 54 g Tris-a 27,5 g borne kiseline 20 ml 0,5 M EDTA Dopunjeno do 1 L dejonizovanom vodom pH 8
2% agarozni gel u TBE puferu	4 g agaroze (AppliChem, Nemačka) 200 ml TBE pufera Zagrevano do ključanja i promešano

2.8. Izolacija ukupnih proteina iz Oli-neu ćelija i Western Blot

Ćelije su zasejane u 100 mm petri šolje obložene poli-d-lizinom sa gustinom od 2×10^6 ćelija po petri šolji. Nakon inkubacije od 48h i tretmana proinlamacijskim faktorima u trajanju od 24h, ćelije su prikupljene špatulicom i centrifugirane na $870 \times g$ tokom 5 minuta. Ukupni proteini su izolovani resuspendovanjem dobijenog taloga u NP - 40 puferu (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1% NP - 40 sa koktelom proteaznih inhibitora). Ćelijski lizati su zatim centrifugirani na $17900 \times g$ na $4^\circ C$ tokom 20 minuta. Supernatanti su prikupljeni i određena je koncentracija proteina prethodno opisanom metodom. Uzorci su dalje korišćeni za Western Blot analizu proteinske ekspresije eN/CD73 na prethodno opisan način. Specifikacije primarnih antitela korišćenih u Western Blot metodi data su u Tabeli 14, a sekundarnih antitela konjugovanih sa peroksidazom rena data su u Tabeli 15.

2.9. Analiza citotoksičnog efekta citofluorimetrijskom metodom uz pomoć aneksin V/propidijum jodid bojenja

Efekat proinlamacijskih faktora na apoptozu i nekrozu Oli-neu ćelija praćen je aneksin V/propidijum jodid bojenjem. Aneksin V se specifično vezuje za fosfatidilserin koji se, tokom procesa rane apoptoze, premešta sa citoplazmatske strane ćelijske membrane na njenu spoljašnju stranu i time obeležava ćelije koje se nalaze u procesu rane apoptoze. Propidijum jodid je agens koji obeležava kasno apoptotične i nekrotične ćelije. Takve ćelije izgubile su integritet ćelijske membrane kroz koju propidijum jodid slobodno prolazi i interkalira u dvostruki lanac nukelinskih kiselina.

Sa gustinom od 200 000 ćelija po bunariću, Oli-neu ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunarića i inkubirane 48 h, nakon čega su tretirane proinlamacijskim faktorima u trajanju od 24 h. Nakon

tretmana, supernatanti ćelija su prikupljeni kako bi u analizu ušle i mrtve ćelije odvojene od podloge. Nakon odvajanja živih ćelija od podloge tripsinizacijom, odgovarajući supernatanti su spojeni sa njima i zajedno centrifugirani na $870\times g$ 5 minuta, a zatim isprani u PBS. Nakon toga, ćelije su inkubirane u 100 μ l pufera za vezivanje aneksina (100 mM HEPES pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) sa 1.5 μ l aneksina V (0.003 μ g/ μ l, Santa Cruz, SAD) konjugovanog sa fluorescein izotiocijanatom fluoroforom (FITC) i 1.5 μ l propidijum jodida (Santa Cruz, SAD) koncentracije 1 mg/ml na sobnoj temperaturi u mraku tokom 15 minuta. Nakon toga, dodato je 200 μ l pufera za vezivanje aneksina kako bi se zaustavila reakcija. Dvostruko pozitivne ćelije, odnosno ćelije obojene i aneksinom V i propidijum jodidom smatrane su nekrotičnim, dok su ćelije obojene samo aneksinom V smatrane apoptotičnim. Analiza je rađena metodom protočne citofluorimetrije na CyFlow® Space Partec aparatu (Partec, Nemačka) na minimum 10 000 ćelija po eksperimentalnoj grupi. Dobijeni podaci analizirani su pomoću PartecFloMax® softvera (Partec, Nemačka) i prikazani kao procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija koji je predstavljen kao 100%.

2.10. Određivanje stepena proliferacije Oli-neu ćelija

U cilju određivanja stepena proliferacije ćelija u bazalnim eksperimentalnim uslovima u različitim vremenskim tačkama, kao i pod dejstvom proinflamacijskih faktora, rađeno je imunofluorescentno obeležavanje Ki67 markerom ćelijske proliferacije.

Oli-neu ćelije su zasejane na pokrovna stakalca obložena poli-D-lizinom sa gustinom od 150 000 ćelija po bunariću na ploči sa 6 bunarića. Ćelije su gajene 48 h nakon čega je primenjen tretman proinflamacijskim faktorima u trajanju od 24 h. Nakon toga, ćelije su trostruko isprane u PBS u trajanju od po 5 min, a zatim fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) na 4°C tokom 20 min. Ćelije su, zatim, opet trostruko isprane u PBS u trajanju od po 5 min. Nespecifično vezivanje blokirano je inkubacijom u PBS sa 4% BSA uz permeabilizaciju sa 0.1% Triton X-100 na sobnoj temperaturi tokom 30 min. Nakon toga, stakalca sa ćelijama su inkubirana na 4°C sa Ki67 primarnim antitelom (Tabela 14) tokom noći. Višak nevezanog antitela je uklonjen trostrukim ispiranjem u PBS u trajanju od po 5 minuta, nakon čega je usledila inkubacija sa odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelom (Tabela 15). Nakon trostrukog ispiranja u PBS u trajanju od po 5 minuta, jedra ćelija su obeležena plavom fluorescentnom bojom 4', 6'-diamidin - 2 - fenilindol (*eng.* 4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta, a zatim je usledilo pet ispiranja u PBS u trajanju od po 3 min. Stakalca sa obojenim ćelijama montirana su na mikroskopske pločice uz pomoć Mowiol vodenog rastvora za montiranje (Sigma, Švajcarska). Kao kontrola bojenja, korišćene su ćelije koje su prošle kroz istovetnu proceduru bez inkubacije sa primarnim antitelom i kod njih nije primećeno prisustvo specifičnog signala. Analiza proliferacije Oli-neu ćelija pod dejstvom proinflamacijskih faktora izvedena je određivanjem procenta Ki67+ jedara u odnosu na ukupan broj jedara obeleženih DAPI bojom za najmanje 20 mikrografija po eksperimentalnoj grupi za $n \geq 3$ ponovljena eksperimenta.

2.11. Analiza morfologije Oli-neu ćelija

Morfologija Oli-neu ćelija analizirana je bojenjem ćelija pomoću fluorescentno obeleženog cikličnog peptida faloidina. Faloidin je toksin poreklom iz gljive vrste *Amanita phalloides* koji se specifično vezuje za filamentozni aktina (F-aktin) citoskeleta. Zasejano je 150 000 ćelija po bunariću na poli-D-lizinom obložena pokrovna stakalca, inkubirane su 48 h, a zatim tretirane proinflamacijskim faktorima 24 h. Nakon ispiranja u PBS, ćelije su fiksirane u 4% PFA na 4 °C tokom 20 minuta, a zatim isprane u PBS tri puta po 5 minuta, nakon čega su inkubirane sa faloidin bojom na sobnoj temperaturi

tokom 30 minuta. (1:50, Alexa Fluor 555 Phalloidin, Invitrogen, SAD). Čelije su trostruko isprane u PBS rastvoru, a zatim su jedra ćelija obojena inkubacijom sa Hoechst 33342 bojom (5 µg/ml, Life Technologies, Invitrogen, SAD) na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta, nakon čega je usledilo ispiranje u PBS pet puta po 3 min i montiranje stakalaca na mikroskopsku pločicu Mowiol vodenim rastvorom za montiranje. Mikrografije su napravljene pomoću Zeiss Axiovert mikroskopa (Zeiss, Nemačka). Veličina ćelija kao i broj nastavaka u svim eksperimentalnim grupama određeni su pomoću Zeiss Axiovision softvera.

2.12. Imunofluorescentno obeležavanje Oli-neu ćelija

Oli-neu ćelije zasejane su na pokrovna stakalca obložena poli-d-lizinom sa gustom od 150 000 ćelija po bunariću na ploči sa 6 bunarića. Čelije su gajene u eksperimentalnim uslovima koji podrazumevaju SATO medijum sa 0.5% FCS 48 h, a zatim su tretirane proinflamacijskim faktorima u trajanju od 24 h. Nakon toga, ćelije su trostruko isprane u PBS u trajanju od po 5 min, a zatim fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) na 4 °C tokom 20 min. Čelije su, zatim, opet trostruko isprane u PBS u trajanju od po 5 minuta. Korak blokiranja nespecifičnog vezivanja podrazumevao je inkubaciju u PBS sa 4% BSA na sobnoj temperaturi tokom 30 min. Nakon toga, stakalca sa ćelijama su inkubirana na 4 °C sa eN/CD73 primarnim antitelom (Tabela 14) tokom noći. Višak nevezanog antitela je uklonjen trostrukim ispiranjem u PBS u trajanju od po 5 minuta, nakon čega je usledila inkubacija sa odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelom (Tabela 15). Nakon trostrukog ispiranja u PBS u trajanju od po 5 minuta, jedra ćelija obeležena su DAPI bojom na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta, a zatim je usledilo pet ispiranja u PBS u trajanju od po 3 minuta. Stakalca sa obojenim ćelijama montirana su na mikroskopske pločice uz pomoć Mowiol vodenog rastvora za montiranje. Kao kontrola bojenja, korišćene su ćelije koje su prošle kroz istovetnu proceduru bez inkubacije sa primarnim antitelom i kod njih nije primećeno prisutvo specifičnog signala. Sva fluorescentna bojenja analizirana su i mikrografije su napravljene pomoću Zeiss Axiovert mikroskopa (Zeiss, Nemačka).

Tabela 14. Spisak primarnih antitela korišćenih za obeležavanje Oli-neu ćelija i Western blot ćelijskih proteina.

Antitelo	Izvor i tip	Razblaženje	Proizvođač
β-actin	miš, monoklonsko	1:100000 WB	Sigma, Švajcarska #A5316
eN/CD73	zec, monoklonsko	1:1500 WB	Cell Signaling, SAD #13160
eN/CD73	zec, poliklonsko	1:500, IF	ectonucleotidases-ab.com #rNu-8L
Ki67	zec, poliklonsko	1:200, IF	Abcam, V. Britanija #ab15580

Tabela 15. Spisak sekundarnih antitela korišćenih za obeležavanje Oli-neu ćelija ćelija i Western blot ćelijskih proteina

Tip	Poreklo	Target	Razblaženje	Proizvođač
IgG HRP	magarac	miš	1:5000, WB	Santa Cruz, SAD #sc2314
IgG HRP	magarac	zec	1:5000, WB	Santa Cruz, SAD #sc2305
IgG AlexaFluor 488	magarac	zec	1:400, IF	Invitrogen, SAD #A21206

2.13. Izolacija membranske frakcije Oli-neu ćelija

Ćelije su zasejane u 100-mm petri šolje obložene poli-D-lizinom sa gustom od 2×10^6 ćelija po petri šolji. Nakon inkubacije od 48h i tretmana proinlamijskim faktorima u trajanju od 24 h ćelijske membrane su izolovane prema metodi (Yurlova *i sar.* 2011). Ćelije su isprane u PBS jednom, pokupljene sterilnom plastičnom špatulom za ćelije i centrifugirane na $870 \times g$ tokom 5 minuta. Talog je resuspendovan u hipotoničnom puferu (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$ sa koktelom proteaznih inhibitora), nakon čega su ćelije homogenizirane mehaničkim provlačenjem kroz 27G iglu na ledu. Jedra ćelija su staložena centrifugiranjem na $300 \times g$ na $4^\circ C$ tokom 5 minuta, a zatim je supernatant ultracentrifugiran na $100\,000 \times g$ na $4^\circ C$ tokom 30 minuta. Talog sa čistom membranskom frakcijom je zatim resuspendovan u hipotoničnom puferu. Nakon određivanja koncentracije proteina prethodno opisanom metodom, uzorci su korišćeni za analizu ektonukleotidaznih aktivnosti.

2.14. Određivanje AMP – hidrolizujuće aktivnosti u membranskoj frakciji Oli-neu ćelija

Nakon izolacije čiste membranske frakcije Oli-neu ćelija, zapremina uzorka koja sadrži 5 μg proteina dodata je u reakcionu smešu koja sadrži 10 mM $MgCl_2$ i 100 mM Tris/HCl pH 7.4 u finalnoj zapremini od 200 μl i inkubirana na $37^\circ C$ 5 min. Enzimska reakcija započeta je dodavanjem AMP u smešu u finalnoj koncentraciji od 250 μM . Reakciona smeša je inkubirana na $37^\circ C$ tokom 30 min, nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem 3M perhlorne kiseline (PCA) i prebacivanjem reakcione smeše na led. Za određivanje koncentracije neorganskog fosfata nastalog enzimskom hidrolizom AMP korišćen je Malachite Green protokol (Baykov *i sar.* 1988). Prema ovom protokolu, u zapremini reakcije od 80 μl dodato je 20 μl radnog rastvora Malachite Green reagensa koji sadrži 0.1% Malachite green supstance u 20% H_2SO_4 , 7.5% amonijum molibdata i 11% Tween 20 deterdženta u odnosu 10 : 2.5 : 0.2. Za standardnu krivu korišćeni su rastvori rastuće koncentracije KH_2PO_4 . Pored toga, prisutna je i blank proba za računanje neenzimske hidrolize supstrata. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini 620 nm, a od dobijene vrednosti oduzeta je vrednost apsorbance blank probe. Na osnovu standardne krive, određena je aktivnost eN/CD73 koja se izražava kao srednja vrednost aktivnosti u nmol neorganskog fosfora po mg proteina po minutu reakcije \pm SEM.

3. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati analizirani su prvobitno na homogenost u okviru eksperimentalnih grupa Levene testom za analizu varijanse u IBM SPSS Statistics 20® softveru (IBM, SAD). U slučajevima kada su rezultati za dati eksperiment imali jednake varijanse, njihova statistička analiza izvršena je pomoću Analize varijanse sa jednim faktorom (ANOVA) uz Dunnett ili Tukey *post hoc* test. U slučaju različitih varijansi, rezultati su statistički analizirani Kruskal – Wallis testom uz Dunn *post hoc* test. Kompletana analiza podataka i njihovo grafičko predstavljanje urađeni su pomoću softvera GraphPad Prism 5 i 7 Software® (GraphPad Software, SAD). Dobijeni eksperimentalni rezultati predstavljeni su kao Srednja vrednost merenja (*eng.* Mean) \pm SEM. Vrednost $p \leq 0.5$ označavala je statistički značajan rezultat.

IV REZULTATI

1. Ekspresija komponenti purinskog signalnog sistema tokom EAE

1.1. EAE- tok i karakterizacija bolesti

Eksperimentalne životinje imunizovane su i posmatrane svakodnevno do 30. dana posle imunizacije (dpi) na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Incidenca bolesti koja je akutnog monofaznog toka bila je 100%, a klinički simptomi koje su životinje razvile ocenjivani su prethodno opisanom skalom od 0 do 5.

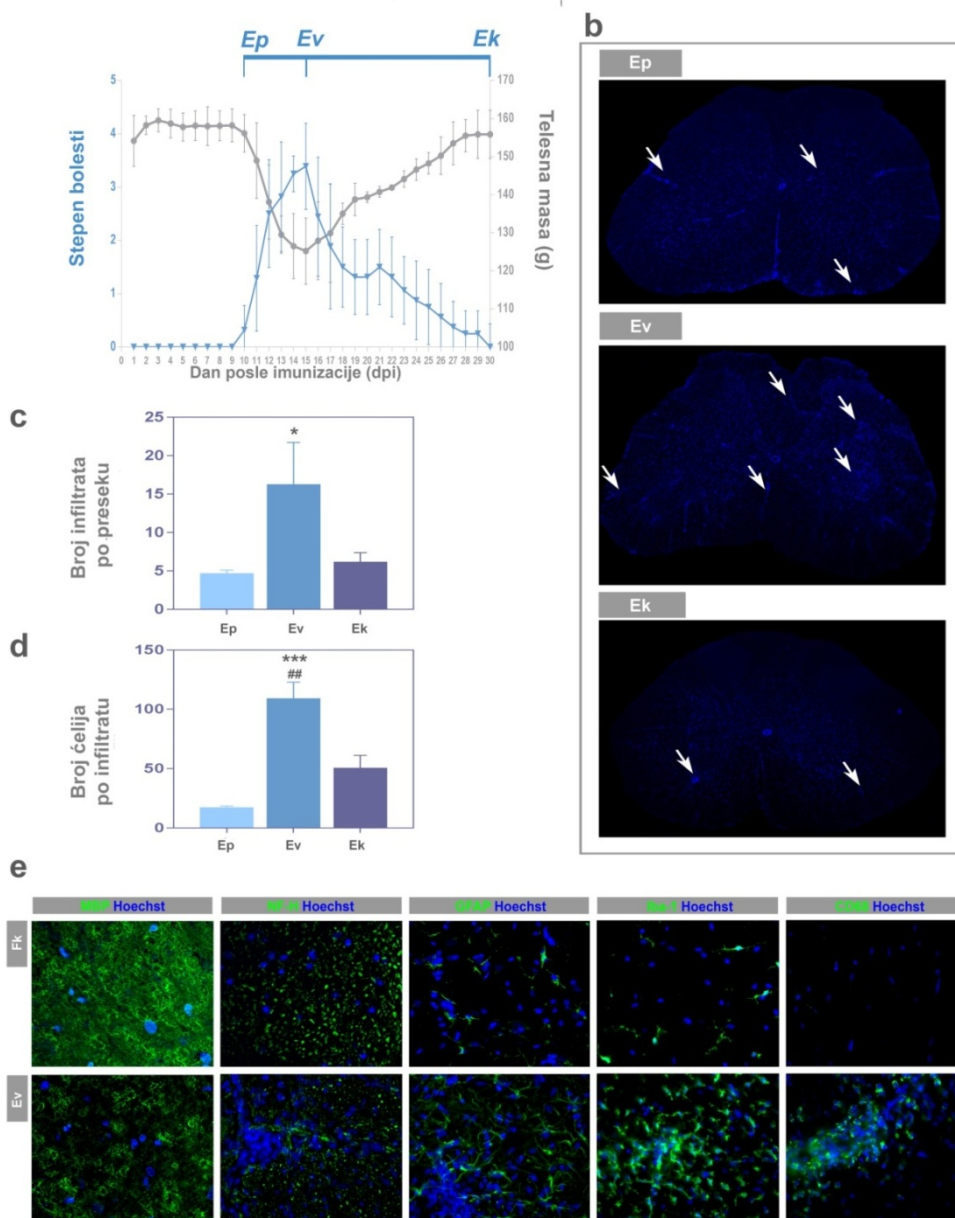
Prvi simptomi bolesti kod životinja pojavili su se 9. dana, a deo životinja koje su razvile atoniju repa (ocena 1) bile su žrtvovane u ovoj početnoj fazi bolesti 10. dana (Ep). Oko 15. dana posle imunizacije, po dostizanju maksimuma simptoma (ocena 3 - 4), na vrhuncu bolesti žrtvovana je grupa životinja (Ev). Na kraju bolesti, po dostizanju potpunog oporavka 30. dana nakon imunizacije, žrtvovana je i poslednja grupa životinja (Ek)(Slika 1a).

Početak i tok EAE spregnuti su sa progresivnom infiltracijom ćelija imunskog sistema u kičmenu moždinu. U cilju karakterizacije modela određen je prosečan broj infiltrata (Slika 1b,c), kao i prosečan broj ćelija po infiltratu po preseku lumbosakralnog dela kičmene moždine tokom EAE (Slika 1d). Na početku bolesti broj infiltrata bio je najniži (4.6 ± 0.4), na vrhuncu maksimalan (16.2 ± 5.4), nakon čega se na kraju bolesti smanjio na nivo zabeležen na početku bolesti (6.2 ± 1.2). Broj ćelija po infiltratu, slično kao i u pogledu broja infiltrata u Ep bio je najniži (17.4 ± 1.2), u Ev maksimalan (109.3 ± 13.6) i u Ek smanjen na nivo s početka bolesti (50.7 ± 10.4).

Dodatna karakterizacija u pogledu demijelinizacije, neurodegeneracije i glioze izvedena je uz pomoć imunofluorescentnog obeležavanja specifičnim ćelijskim markerima. (Slika 1e). Obeležavanje antitelom za mijelin bazni protein (*eng.* Myelin basic protein, MBP) pokazalo je da je demijelinizacija najizraženija u Ev. Imunofluorescentno obeležavanje teške subjedinične neurofilamenta (*eng.* neurofilament – heavy chain, NF-H) pokazalo je da na vrhuncu EAE pored demijelinizacije dolazi i do neurodegeneracije. Obeležavanje antitelom specifičnim za GFAP marker astrocita pokazalo je da u Ev dolazi do zadebljavanja i skraćivanja nastavaka i hipertrofije ćelijskog tela astrocita, što ukazuje na reaktivnu astrogliozu (Slika 1e). Obeležavanje antitelom na Iba1, marker mikroglije/makrofaga pokazuje porast broja ovih ćelija tokom EAE, koji je posebno izražen u Ev, u zonama infiltrata. Pored toga, tokom EAE, posebno u Ev na Iba1⁺ ćelijama uočavaju se i morfološke promene u smislu zadebljavanja i skraćivanja nastavaka do potpunog povlačenja, što ukazuje na njihovu aktivaciju (Slika 1e). Očekivano, primena antitela na CD68 kao marker aktivirane mikroglije/makrofaga pokazala je odsustvo ovih ćelija u fiziološkoj kontroli (Fk), dok tokom EAE njihov broj raste, posebno u Ev kada se u najvećoj meri uočavaju u zonama infiltrata (Slika 1e).

a Akutni monofazni EAE

Homogenat kičmene moždine (50% w/v) + CFA (0.5 mg/ml *M. tuberculosis*)



Slika 1. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola, toka i histopatoloških karakteristika bolesti. (a) Životinje imunizovane potkožnom injekcijom encefalitogene emulzije razbolele su se uz incidencu od 100%. Životinjama su svakodnevno određivani neurološki simptomi i telesna masa. Žrtvovane su 10., 15. i 30. dpi, što odgovara vremenskim tačkama označenim kao Ep, Ev i Ek. (b) Reprezentativne mikrofografije lumbosakralnog regiona kičmene moždine. Strelicama su označeni masivniji infiltrati. (c) Broj infiltrata i (d) broj ćelija po infiltratu po preseku kičmene moždine u različitim vremenskim tačkama bolesti. Na graficima su predstavljene srednje vrednosti (\pm SEM) određene sa najmanje 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi iz 2 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti: * $p < 0.05$ u odnosu na Ep (c) i *** $p < 0.0001$ u odnosu na Ep, ## $p < 0.01$ u odnosu na Ek. (d) Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test. (e) Reprezentativne mikrofografije dobijene obeležavanjem na MBP (zelena fluorescenca), NF-H (zelena fluorescenca), GFAP (zelena fluorescenca), Iba1 i CD68 (zelena fluorescenca) prikazuju karakteristične histopatološke promene u kičmenoj moždini u Ev u odnosu na Fk. Jedra ćelija obojena su Hoechst bojom (plava fluorescenca).

1.2. Genska ekspresija komponenti purinskog signalnog sistema

Budući da je ranije pokazana promena genske ekspresije nekih od komponenti purinskog signalnog sistema u patologiji MS/EAE, dalja karakterizacija EAE modela podrazumevala je analizu genske ekspresije pre svega glavnih ektonukleotidaza CNS, kao i purinskih receptora. U Tabeli 1 prikazana je ekspresija odabranih receptora i ektonukleotidaza na nivou iRNK u kičmenoj moždini DA pacova tokom EAE izražena u procentima u odnosu na nivo ekspresije gena od interesa u Fk (koji je izražen kao 100%). Ekspresija NTPDaza1/CD39 bila je značajno povećana na početku (182.5 ± 16.4) i vrhuncu EAE (343.4 ± 30.0), dok se po oporavku vraća na fiziološki nivo (107.6 ± 10.9). Ovo povećanje ekspresije bilo je praćeno značajnim smanjenjem ekspresije druge dominantne ektonukleotidaze NTPDaza2 na početku (39.5 ± 4.1) i na vrhuncu bolesti (28.4 ± 2.9), nakon čega se i njena ekspresija vraća na fiziološki nivo (90.8 ± 10.1). Najslabije ekspimirana ektonukleotidaza u CNS NTPDaza3 imala je značajno smanjenu ekspresiju u sve tri posmatrane vremenske tačke u odnosu na Fk. Konačno, u Ev i Ek povišena je i ekspresija eN/CD73 (Tabela 1) koji katalizuje završni korak kaskadne vanćelijske hidrolize ATP produkujući adenzin. Zajedno, dobijene promene ekspresije glavnih ektonukleotidaza ukazuju na njihov moguć doprinos razrešenju neuroinflamacije putem smanjenja nivoa ATP i istovremenog povećanja nivoa adenozina u vanćelijskoj tečnosti CNS.

Tabela 1. Ekspresija komponenti purinskog signalnog sistema na genskom nivou u KM tokom EAE. Vrednosti u tabeli predstavljaju % vrednosti kontrole koja je izražena kao 100% i izražene su kao srednja vrednost grupe (\pm SEM). Metoda je urađena za $n \geq 5$ uzoraka po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.05$. ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnet *post hoc* test.

	Gen od interesa/GAPDH-iRNK (% kontrole)		
	Ep	Ev	Ek
<i>Entpd1</i>	$182.5 \pm 16.4^*$	$343.4 \pm 30.0^{***}$	107.6 ± 10.9
<i>Entpd2</i>	$39.5 \pm 4.1^{***}$	$28.4 \pm 2.9^{***}$	90.8 ± 10.1
<i>Entpd3</i>	$30.0 \pm 3.9^{***}$	$21.0 \pm 1.4^{***}$	$64.0 \pm 9.2^*$
<i>Nt5e</i>	109.4 ± 1.7	132.6 ± 11.0	$173.7 \pm 19.36^*$
<i>P2rx1</i>	$40.1 \pm 17.5^*$	78.5 ± 22.6	78.1 ± 32.9
<i>P2rx2</i>	66.8 ± 1.7	$32.5 \pm 0.5^*$	96.8 ± 21.1
<i>P2rx3</i>	$31.3 \pm 7.1^*$	$11.8 \pm 0.6^*$	74.6 ± 16.0
<i>P2rx4</i>	$36.5 \pm 26.9^*$	105.4 ± 9.8	161.0 ± 17.3
<i>P2rx5</i>	75.1 ± 19.0	$22.5 \pm 15.1^*$	99.5 ± 26.1
<i>P2rx7</i>	$69.7 \pm 14.6^*$	72.4 ± 11.6	182.9 ± 36.2
<i>P2ry1</i>	$66.3 \pm 10.9^*$	$54.3 \pm 5.5^{**}$	129.4 ± 10.0
<i>P2ry12</i>	$46.7 \pm 0.5^*$	$412.3 \pm 44.8^{***}$	$453.1 \pm 80.4^*$
<i>P2ry13</i>	121.8 ± 21.3	$342 \pm 13.6^{**}$	$385.4 \pm 53.7^{**}$
<i>Adora1</i>	$65.6 \pm 9.7^*$	$40.3 \pm 4.2^*$	98.9 ± 14.2
<i>Adora2a</i>	197.6 ± 93.7	125.0 ± 3.0	138.0 ± 15.3
<i>Adora2b</i>	$55.1 \pm 11.8^*$	$68.5 \pm 27.0^*$	134.3 ± 45.7
<i>Adora3</i>	$366.4 \pm 40.0^*$	$329.5 \pm 11.5^*$	$299.2 \pm 8.1^*$

Genska ekspresija svih P2X purinskih receptora smanjuje se tokom EAE u odnosu na Fk, s tim da je za P2X₁ i P2X₃ značajno smanjena u Ep, dok je za P2X₂, P2X₃ i P2X₅ smanjena u Ev. Ekspresija P2X₄ i P2X₇ pokazuje sličan trend promena u smislu smanjenja u Ep i porasta na kraju bolesti. Kada su u pitanju ADP-zavisni P2Y purinski receptori, ekspresija P2Y₁ receptora smanjena je na početku i na

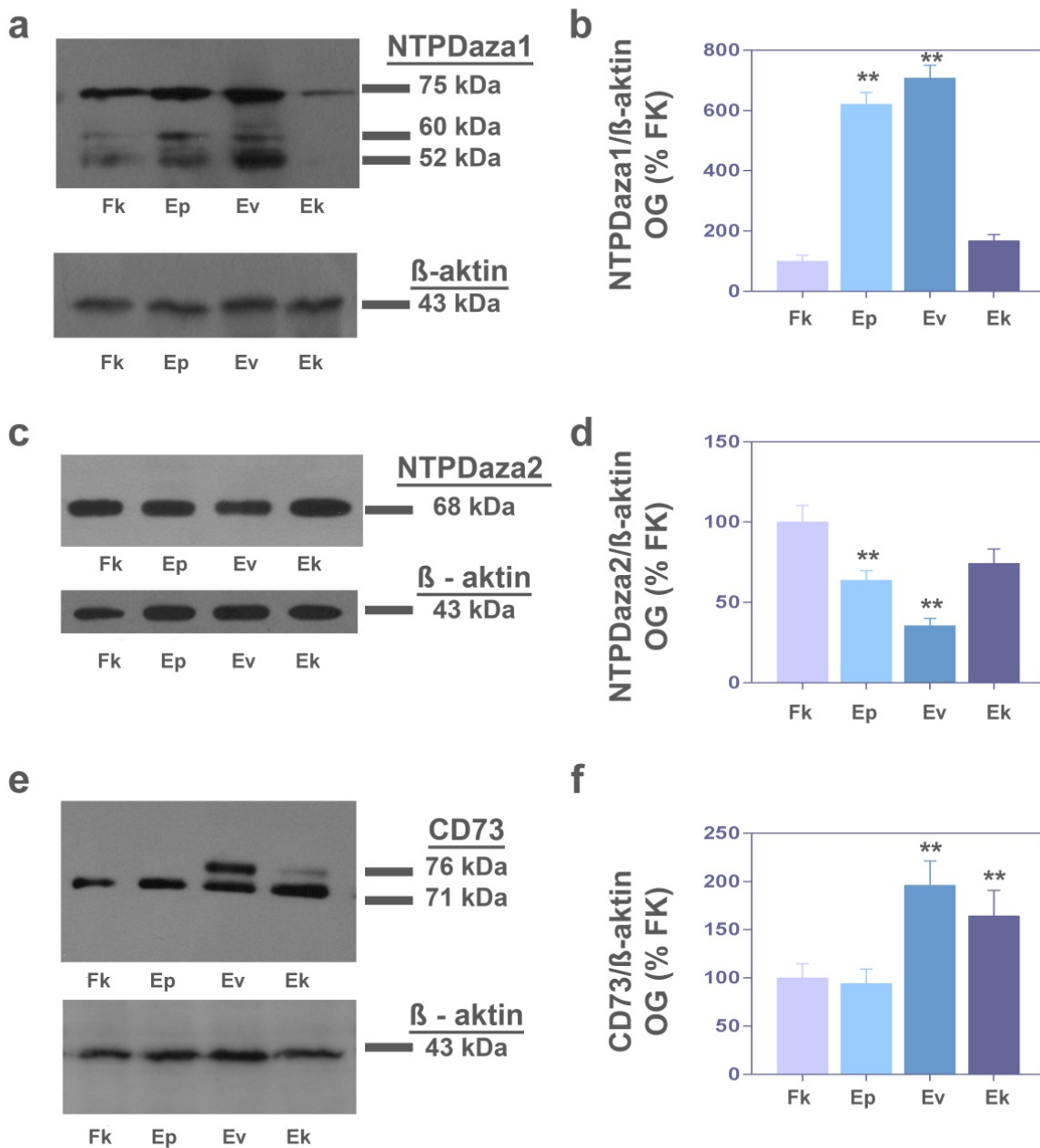
vrhuncu simptoma, dok ekspresija P2Y₁₂ iRNK pokazuje dvofazne promene u smislu početnog smanjenja u Ep i porasta na vrhuncu i kraju bolesti. Pored P2Y₁₂ i genska ekspresija P2Y₁₃ receptora značajno je povećana u istim vremenskim tačkama.. Kao i u slučaju P2, genska ekspresija purinskih receptora P1 porodice menja se tokom EAE, u pravcu smanjenja za A₁ i A_{2b} (u Ep i Ev), odnosno porasta za A₃ u svim fazama. Promene za A_{2a} receptor nisu statistički značajne, iako pokazuju trend porasta na početku bolesti. Zajedno, dobijeni rezultati ukazuju da tokom EAE dolazi do fazno-specifičnih promena svih glavnih komponenti purinskog signalnog sistema u kičmenoj moždini pacova.

1.3. Proteinska ekspresija NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73

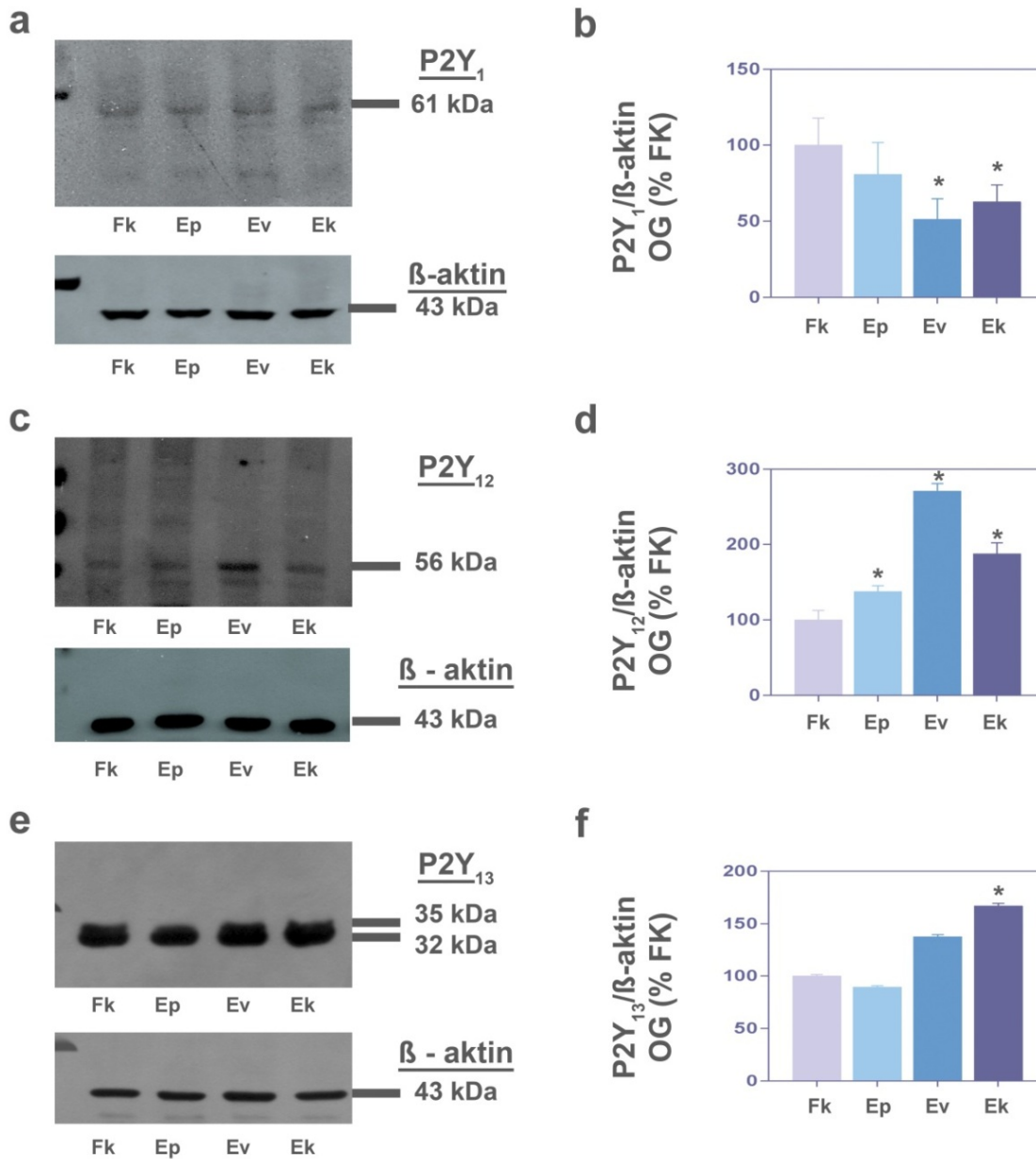
Budući da je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pokazana promena ekspresije glavnih ektonukleotidaza u CNS tokom EAE na genskom nivou, dalja analiza podrazumevala je potvrdu ovog fenomena i na proteinskom nivou. Analiza nivoa proteinske ekspresije NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 Western Blot metodom prikazana je na Slici 2. Reprerzentativni radiografski filmovi dobijeni su vizuelizacijom hemiluminiscencentnog signala za NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 (Slika 2a, c i e), kao i signala za β – aktin na odgovarajućim membranama. S obzirom na to da NTPDaza1/CD39 u zavisnosti od stepena glikozilacije može imati različite molekulske težine, a u skladu sa osobinama korišćenog antitela, sve tri trake u koloni prikazane na Slici 2a pripadaju NTPDaza1/CD39 enzimu i zajedno su kvantifikovane. Na Slici 2e, uočeni porast ekspresije eN/CD73 u Ev i Ek povezan je sa pojavom dodatne trake nešto veće molekulske težine u odnosu na traku od približno 70 kDa koja se konstitutivno eksprimira i prisutna je u svim vremenskim tačkama. Rezultati dobijeni denzitometrijskom analizom imunoblota pokazuju da su promene proteinske ekspresije sve tri analizirane ektonukleotidaze (Slika 2b, d i f) u skladu sa uočenim promenama na nivou iRNK. Naime, ekspresija NTPDaza1/CD39 (Slika 2b) i eN/CD73(Slika 2f) bila je povećana tokom EAE (u Ep i Ev, odnosno u Ev i Ek), dok je kod NTPDaza2 (Slika 2d) došlo do smanjenja (u Ep i Ev).

1.4. Proteinska ekspresija purinskih receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃

Prikazani rezultati pokazali su da je u EAE modelu ekspresija ektonukleotidaza izmenjena i na genskom i na proteinskom nivou. Porast ekspresije NTPDaza1/CD39 uz istovremeno smanjenje ekspresije NTPDaza2 ukazuju pojačanu degradaciju ATP i ADP uz smanjenu akumulaciju ADP, što ukazuje na moguće smanjenje nivoa ADP u vanćelijskoj tečnosti tokom EAE. Budući da je analiza genske ekspresije pokazala fazno-specifične promene ADP-zavisnih receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃, dalje su ispitane promene ekspresije pomenutih receptora i na proteinskom nivou. Denzitometrijska analiza dobijenih traka (Slika 3a i c) pokazala je da proteinska ekspresija P2Y₁ značajno opada u Ev i Ek (Slika 3b), dok za P2Y₁₂ raste u svim vremenskim tačkama (Slika 3d). Kvantifikacija obe specifične proteinske trake vidljive na na Slici 3e pokazala je trend povećanja P2Y₁₃ u Ev i značajan porast na kraju bolesti (Slika 3f). U tom smislu, promene proteinske ekspresije su, kao i za ektonukleotidaze, bile u skladu sa promenama na nivou iRNK (Tabela 1) i dodatno potvrdile modulaciju na nivou purinskog signalnog sistema tokom EAE.



Slika 2. Ekspresija NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 na proteinskom nivou tokom EAE. Sa leve strane prikazani su reprezentativni radiografski filmovi dobijeni hemiluminiscentnom vizuelizacijom traka koje odgovaraju enzimima NTPDaza1/CD39 (a), NTPDaza2 (c), eN/CD73 (e) i endogenoj kontroli (β – aktin) sa istih membrana, dok su na desnoj strani (b, d, f) prikazani rezultati dobijeni njihovom kvantifikacijom. Intenzitet svake vizuelizovane trake za protein od interesa određen je denzitometrijski i izražen u odnosu na optičku gustinu (OG) trake za β -aktin u istoj koloni. Vrednosti dobijene za kontrolnu grupu predstavljene su na grafiku kao 100% (\pm SEM), a vrednosti za ostale eksperimentalne grupe predstavljene su kao % u odnosu na kontrolu. Denzitometrijska analiza je urađena iz najmanje 4 imunoblota, iz 2 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti: ** $p < 0.01$, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnet *post hoc* test.

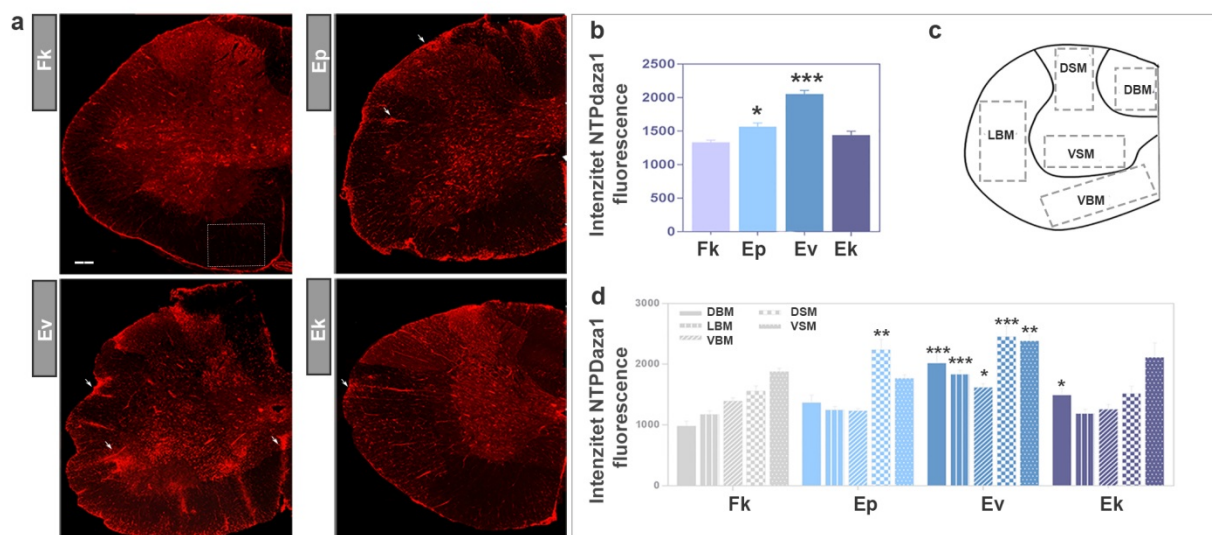


Slika 3. Ekspresija ADP receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃ na proteinskom nivou tokom EAE. Reprezentativni radiografski filmovi sa leve strane prikazuju trake koje odgovaraju receptorima P2Y₁ (a), P2Y₁₂ (c) i P2Y₁₃ (e). Sa desne strane prikazane su vrednosti relativne ekspresije P2Y₁ (b), P2Y₁₂ (d) i P2Y₁₃ (f) u kičmenoj moždini tokom EAE dobijene kvantifikacijom proteinskih traka sa odgovarajućih imunoblotova. Po urađenoj denzitometrijskoj analizi, intenzitet svake trake za protein od interesa izražen je u odnosu na optičku gustinu (OG) trake za β-aktin u istoj koloni. Vrednosti dobijene za kontrolnu grupu predstavljene su na grafiku kao 100% (± SEM), a vrednosti za ostale eksperimentalne grupe predstavljene su kao % u odnosu na kontrolu. Denzitometrijska analiza je urađena iz najmanje 3 ponavljanja iz 2 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti: *p < 0.05 i **p < 0.001, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnet *post hoc* test.

1.5. NTPDaza1/CD39

1.5.1. Promene tkivne ekspresije NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini

S obzirom na to da su prethodno prikazani rezultati pokazali da tokom EAE dolazi do promena ekspresije NTPDaza1/CD39 na genskom i proteinskom nivou, u daljoj analizi ispitana je tkivnu i ćelijsku distribuciju ove ektonukleotidaze. Ekspresija NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini vizuelizovana je metodom specifičnog imunofluorescentnog obeležavanja, a reprezentativne panoramske mikrografije za Fk i sve vremenske tačke EAE dobijene ovom metodom prikazane su na Slici 4a. Na kontrolnim presecima najjači NTPDaza1/CD39 fluorescentni signal primećen je na pijačnoj površini, brojnim ramifikovanim ćelijama u sivoj i beloj masi i izduženim fibroznim elementima u beloj masi. NTPDaza1/CD39 uočena je takođe na endotelu krvnih sudova, kao i endodimskim ćelijama centralnog kanala kičmene moždine.



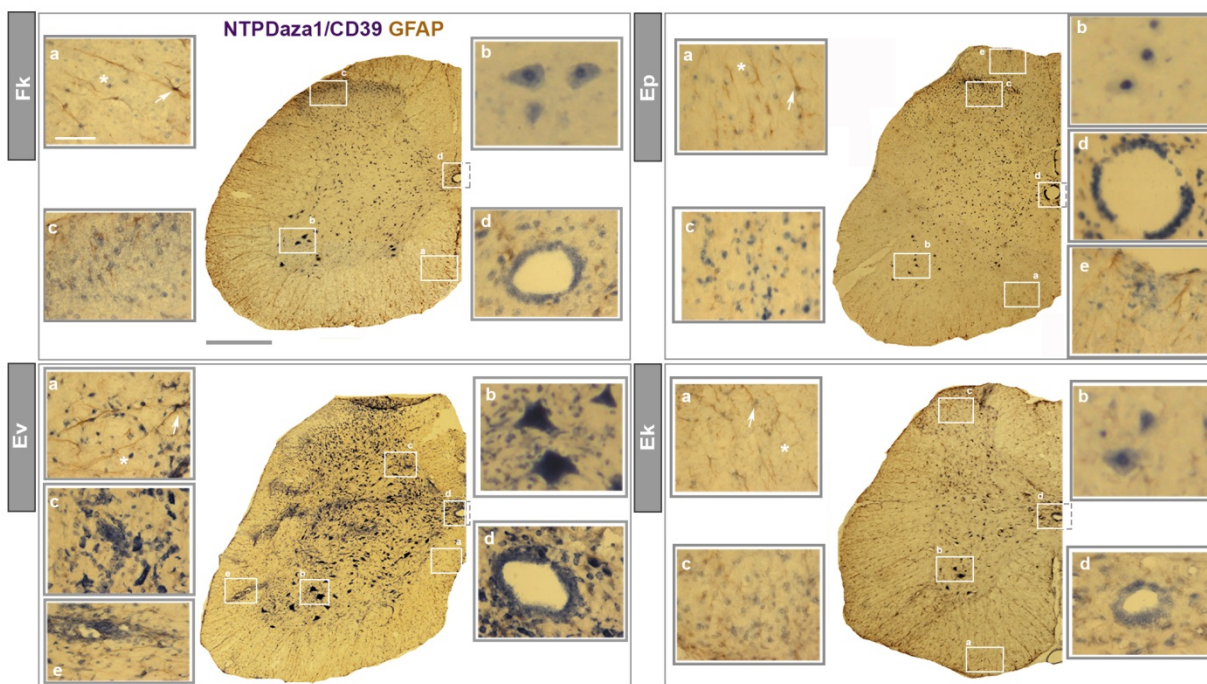
Slika 4. Lokalizacija i intenzitet NTPDaza1/CD39 imunofluorescence tokom EAE. (a) NTPDaza1/CD39 imunofluorescencija u kičmenoj moždini u kontrolnim životinjama i tokom EAE. Strelicama je obeležena pozicija masivnijih infiltrata. Skala veličine: 200 μ m. (b) Intenzitet NTPDaza1/CD39 imunofluorescence prikazan u arbitrarnim jedinicama (AJ) na celim presecima u Fk i tokom EAE. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti u AJ (\pm SEM) za najmanje 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za dva nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ u odnosu na kontrolu., ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test. (c) Shema regiona kičmene moždine za koje je urađena kvantitativna analiza NTPDaza1/CD39 imunofluorescence (DBM – dorzalna bela masa, LBM – lateralna bela masa, VBM – ventralna bela masa, DSM – dorzalna siva masa i VSM – ventralna siva masa). (d) NTPDaza1/CD39 imunofluorescencija u kičmenoj moždini u kontrolnim životinjama i tokom EAE u analiziranim regionima. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti u AJ (\pm SEM) za najmanje 4 mikrografije po regionu za najmanje 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti na grafiku: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ i *** $p < 0.0001$ u odnosu na kontrolu, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.

U Ep i Ev uočava se pojačan intenzitet imunofluorescentnog signala što je povezano sa pojavom velikog broja ćelijskih infiltrata, ali i brojnih ovoidnih ćelija i u beloj i u sivoj masi koje pokazuju NTPDaza1/CD39 imunoreaktivnost. U Ek, NTPDaza1/CD39 dominantno je prisutna na fibroznim elementima u beloj masi nalik fibroznim astrocitima. Intenzitet ukupne fluorescence (Slika 4b) značajno je povećan u Ep (1566 ± 55.47) i Ev (2050 ± 59.19) u odnosu na Fk (1331 ± 35.46). Kvantifikacijom su obuhvaćeni regioni kičmene moždine: DBM – dorzalna bela masa, LBM – lateralna

bela masa, VBM – ventralna bela masa, DSM – dorzalna siva masa i VSM – ventralna siva masa (Slika 4c). U skladu sa lokalizacijom uočenih infiltrata, NTPDaza1/CD39 imunofluorescenca pokazuje značajan porast intenziteta u dorzalnoj sivoj masi na početku, svim regionima na vrhuncu i dorzalnoj beloj masi na kraju bolesti (Slika 4d).

1.5.2. Čelijska ekspresija NTPDaza1/CD39 iRNK

Kako je imunofluorescentno obeležavanje pokazalo prisustvo NTPDaza1 na fibrozim elementima nalik astrocitima u beloj masi kičmene moždine, kombinacijom metode *in situ* hibridizacije oligonukleotidnom probom specifičnom za NTPDaza1/CD39 iRNK i imunohistohemijskog obeležavanja antitelom specifičnim za marker astrocita GFAP ispitana je ekspresija ove ektonukleotidaze na astrocitima. Dobijeni rezultati su pokazali da se iRNK za NTPDaza1/CD39 eksprimira u fibrozim astrocitima u Fk, kao i tokom EAE (Slika 5). To je jasno uočljivo na mikrografijama većeg uveličanja (a) na kojima su strelicama označeni GFAP⁺ elementi koji ekspimiraju iRNK za NTPDaza1/CD39. Na istim mikrografijama (a) osim kod GFAP⁺, ekspresija NTPDaza1/CD39 iRNK uočava se i kod GFAP⁻ ćelija koje su u Fk, a nešto manje u Ep i Ek ravnomerno raspoređene u tkivu, dok su u Ev grupisane u zonama infiltrata i koje najverovatnije predstavljaju mikroglijske ćelije (obeležene zvezdicama). Pored toga, NTPDaza1/CD39 iRNK lokalizovana je i u velikim α - motoneuronima u ventralnim rogovima sive mase (b), u kojima ekspresija raste na vrhuncu EAE. Pored toga, ekspresija iRNK za NTPDaza1/CD39 uočava se i u ćelijama dorzalnih rogova sive mase kičmene moždine (c) i ependimskim ćelijama (d). Porast ekspresije NTPDaza1/CD39 iRNK na vrhuncu bolesti povezan je sa pojavom brojnih perivaskularnih infiltrata u kojima se snažno eksprimira (e).



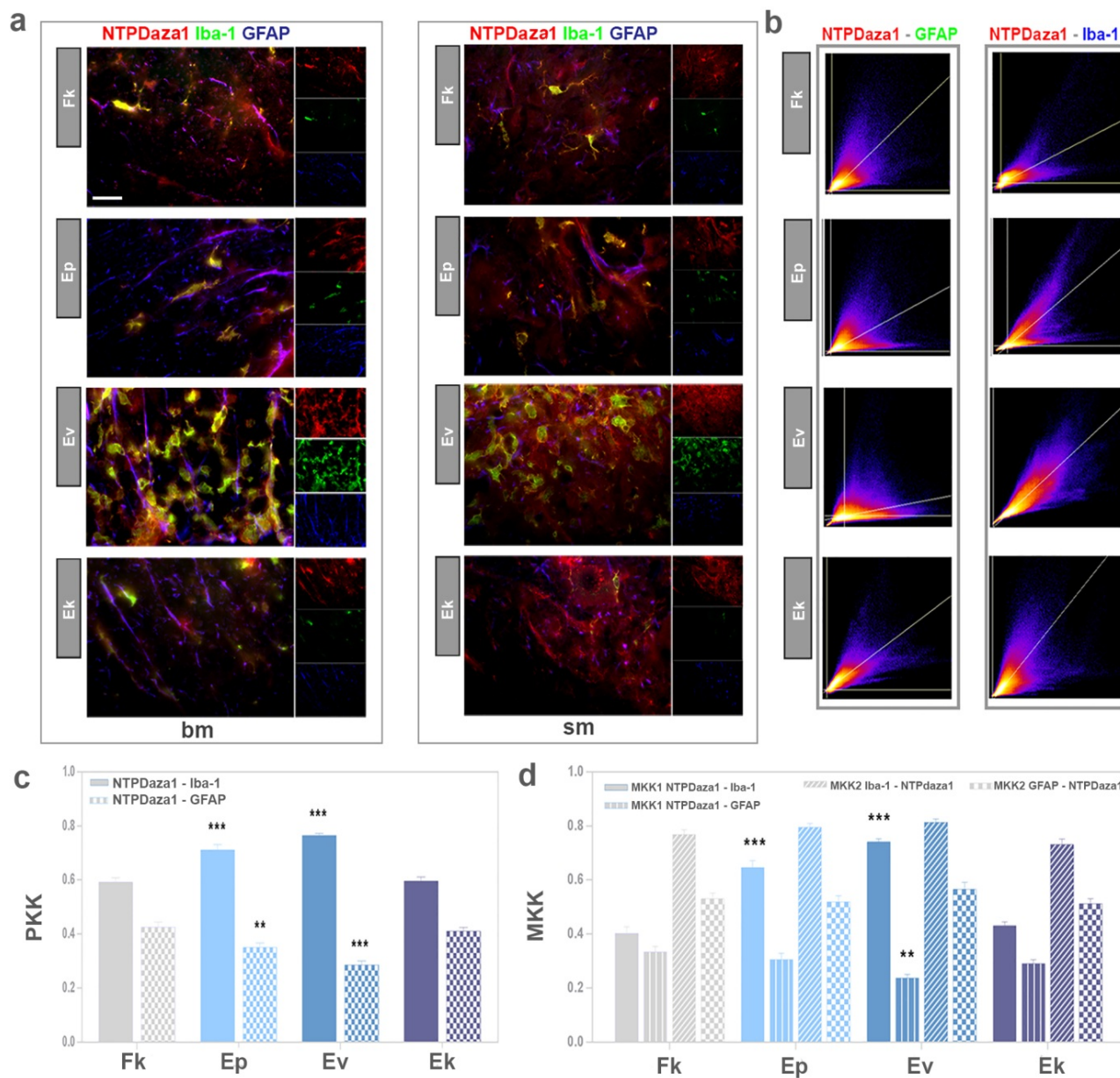
Slika 5. NTPdaza1/CD39 iRNK *in situ* hibridizacija. Vizuelizacija NTPDaza1/CD39 iRNK metodom *in situ* hibridizacije (pomoću DIG obeleženog oligonukleotida i anti-DIG antitela) kombinovane sa HRP imunohistohemijskim obeležavanjem astrocita na GFAP. Mikrografije malog uvećanja prikazuju lokalizaciju NTPDaza1/CD39 iRNK na presecima kičmene

moždine u fiziološkoj kontroli i tokom EAE. Skala veličine: 500 μm . Mikrografije velikog uvećanja načinjene su u regionima oivičenim belim pravougaonicima prikazanim na mikrografijama malog uvećanja. NTPDaza1/CD39 iRNK prisutna je u ćelijama nalik mikrogliji (obeleženo zvezdicom) i GFAP⁺ astrocitima (obeleženi strelicom) u beloj masi (a), velikim motoneuronima u ventralnim rogovima sive mase (b), neuronima u dorzalnoj sivoj masi (c), ependimskim ćelijama (d), kao i perivaskularnim infiltratima i vaskularnim endotelnim ćelijama (e). Skala veličine: 50 μm (a).

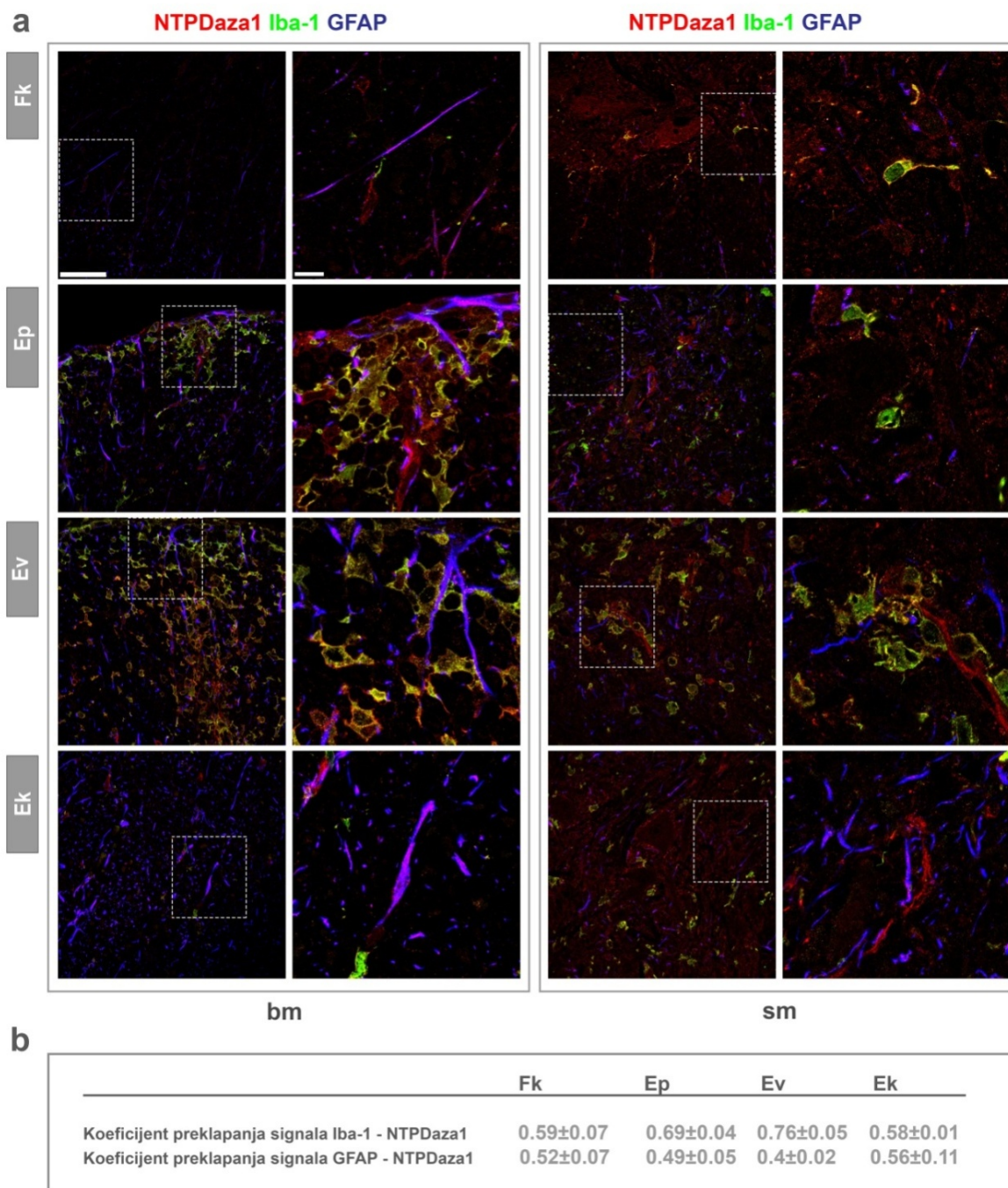
1.5.3. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na mikrogliji/makrofagima i astrocitima

Kako je ekspresija NTPDaza1/CD39 povezana sa mikroglijom/makrofagima, a u ovom istraživanju je pokazana i na astrocitima, isipitan je doprinos ovih ćelija uočenom porastu proteinske ekspresije ektonukleotidaze u kičmenoj moždini tokom EAE. Doprinos mikroglije/makrofaga i astrocita određen je uz pomoć trostrukog imunofluorescentnog obeležavanja NTPDaza1/CD39, Iba1 kao konstitutivnog markera mikroglije/makrofaga i GFAP kao markera astrocita (Slika 6). Reprezentativne kompozitne mikrografije bele i sive mase kičmene moždine sa pojedinačnim kanalima prikazane su na Slici 6a. U Fk, NTPDaza1/CD39 se uočava na izrazito ramifikovanim Iba1⁺ ćelijama koje predstavljaju mirujuću mikrogliju. U Ep broj NTPDaza1⁺Iba1⁺ ćelija raste, a ćelije pokazuju manji stepen ramifikacije, sa nešto kraćim i debljim nastavcima. U Ev dolazi do izraženog porasta NTPDaza1⁺Iba1⁺ ćelija kako u u perivaskularnim i subprijalnim infiltratima, tako i u parenhimu. NTPDaza1⁺ mikroglija/makrofagi poprimaju ameboidnu formu, što ukazuje na njihovu aktivaciju. Na kraju bolesti, broj NTPDaza1⁺Iba1⁺ ćelija vraća se približno na fiziološki nivo, a ćelijski nastavci postaju tanji i izdužuju se što ukazuje na deaktivaciju mikroglije. Pored mikroglije/makrofaga, u skladu sa rezultatima dobijenim metodom *in situ* hibridizacije NTPDaza1/CD39 imunofluorescentni signal uočen je i na GFAP⁺ astrocitima. prevashodno u beloj masi. Na Slici 6b prikazani su reprezentativni dijagrami distribucije fluorescentnog signala za NTPDaza1/CD39 i Iba1, odnosno NTPDaza1 i GFAP tokom EAE koji jasno ukazuju na preklapanje NTPDaza1 i Iba1 imunofluorescence, najizraženije u Ev. Stepem kolokalizacije NTPDaza1/CD39 i Iba1 u presecima kičmene moždine određen je izračunavanjem vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije (PKK) i Mandersovog koeficijenta kolokalizacije (MKK). PKK vrednosti NTPDaza1/CD39 i Iba1, odnosno GFAP fluorescentnih signala (Slika 6c) ukazuju da je kolokalizacija izražena za NTPDaza1/Iba1, dok je relativno slaba za NTPDaza1/GFAP imunofluorescencu. Pored toga, koeficijent korelacije dodatno raste u Ep (0.71 ± 0.02) i Ev (0.76 ± 0.01) u odnosu na Fk (0.59 ± 0.02) za NTPDaza1/Iba1 imunofluorescencu, dok se za NTPDaza1/GFAP fluorescencu smanjuje u Ep (0.35 ± 0.016) i Ev (0.28 ± 0.01) u odnosu na Fk (0.43 ± 0.02). Vrednosti MKK1 za NTPDaza1/Iba1 fluorescencu (Slika 6d) pokazuju da frakcija NTPDaza1/CD39 imunofluorescence kolokalizovane sa Iba1 fluorescentnim signalom značajno raste u Ep (0.64 ± 0.03) i Ev (0.74 ± 0.01) u odnosu na Fk (0.40 ± 0.02), što je u vezi sa porastom broja NTPDaza1⁺ mikroglije/makrofaga ali i porastom ćelijske ekspresije enzima tokom EAE. Nasuprot tome, MKK1 vrednosti za NTPDaza1⁺GFAP⁺ imunofluorescencu (Slika 6d) smanjene su u Ev (0.24 ± 0.01) u odnosu na Fk (0.33 ± 0.02), što ukazuje da tokom EAE ne dolazi ni do porasta broja NTPDaza1⁺ astrocita niti porasta ekspresije NTPDaze1 na ovim ćelijama. MKK2 vrednosti, takođe prikazane na ovoj slici, koje predstavljaju frakciju Iba1, odnosno GFAP imunofluorescentnog signala kolokalizovanog sa NTPDaza1/CD39 imunofluorescencom, ne pokazuju značajne promene tokom EAE u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat ukazuje da je ekspresija NTPDaza1/CD39 na ova dva tipa ćelija relativno stabilna, pri čemu više vrednosti MKK2 za NTPDaza1⁺Iba1⁺ fluorescencu ukazuju na veću zastupljenost NTPDaza1/CD39 na mikrogliji/makrofagima u odnosu na astrocite.

Opisani rezultati kvantifikacije kolokalizacije NTPDaza1 sa Iba1, odnosno GFAP imunofluorescentnim signalom potvrđeni su i analizom trostrukog NTPDaza1/Iba1/GFAP



Slika 6. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na astrocitima i mikrogliji/makrofagima u beloj i sivoj masi KM tokom EAE. (a) Reprezentativne mikrografije bele (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno bojenje – NTPDaza1 (crvena fluorescencija), Iba1 (zelena fluorescencija) i GFAP (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m. (b) Dijagrami distribucije fluorescencije NTPDaza1/GFAP i NTPDaza1/ Iba1 u kontroli i tokom EAE. PKK (c) i MKK (d) vrednosti (\pm SEM) dobijene su analizom kolokalizacije na mikrografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrografije po preseku za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: *** $p < 0.0001$ i ** $p < 0.01$. Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.



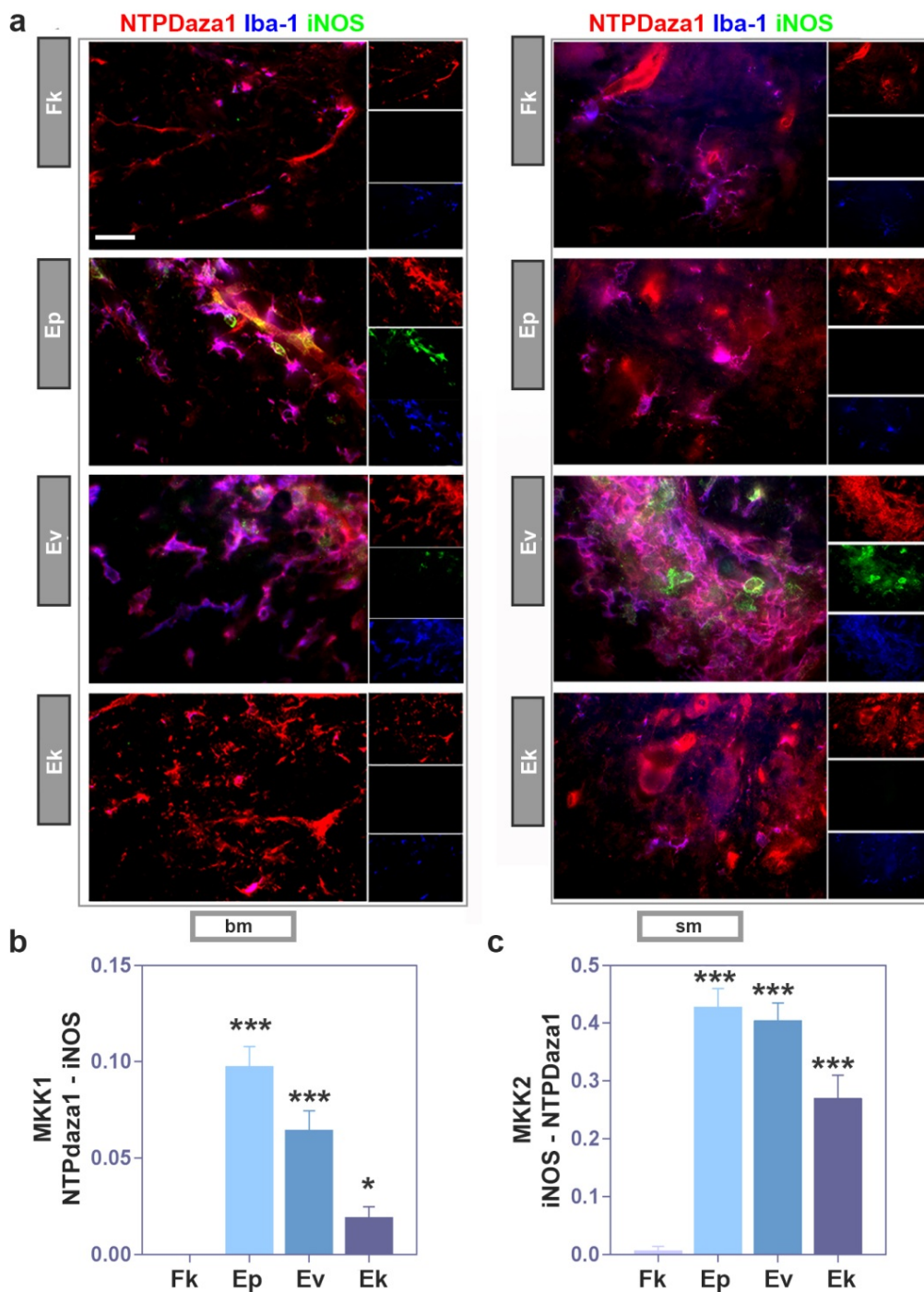
Slika 7. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na astrocitima i mikrogliji/makrofagima u beloj i sivoj masi KM tokom EAE vizuelizovana i analizirana konfokalnim mikroskopom. (a) Reprezentativne mikrografije bele (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno obeležavanje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), Iba1 (zelena fluorescencija) i GFAP (plava fluorescencija). Skala veličine mikrografija malog uvećanja: 50 μ m. Mikrografije velikog uvećanja načinjene su u regionima oivičenim belim pravougaonicima prikazanim na mikrografijama malog uvećanja. Skala veličine mikrografija velikog uvećanja: 10 μ m. (b) Koeficijenti preklapanja pojedinačnih fluorescentnih kanala NTPDaza1 i Iba1, kao i NTPDaza1 i GFAP prikazani su u tabeli kao srednja vrednost (\pm SEM).

imunofluorescentnog obeležavanja konfokalnom mikroskopijom. Na reprezentativnim mikrografijama bele i sive mase kičmene moždine u Fk i tokom EAE (Slika 7a) vidljivo je da Iba1⁺ ćelije snažno ekspimiraju NTPDaza1/CD39, dok je koekspresija GFAP i ovog enzima manje izražena, posebno u sivoj masi. Ovakva zapažanja potvrđena su i rezultatima preliminarne analize stepena preklapanja NTPDaza1/Iba1, odnosno NTPDaza1/GFAP imunofluorescentnog signala (Slika 7b) koji su pokazali porast stepena preklapanja NTPDaza1/Iba1 u Ep i Ev, uz istovremeno smanjenje preklapanja na nivou NTPDaza1/GFAP imunofluorescence.

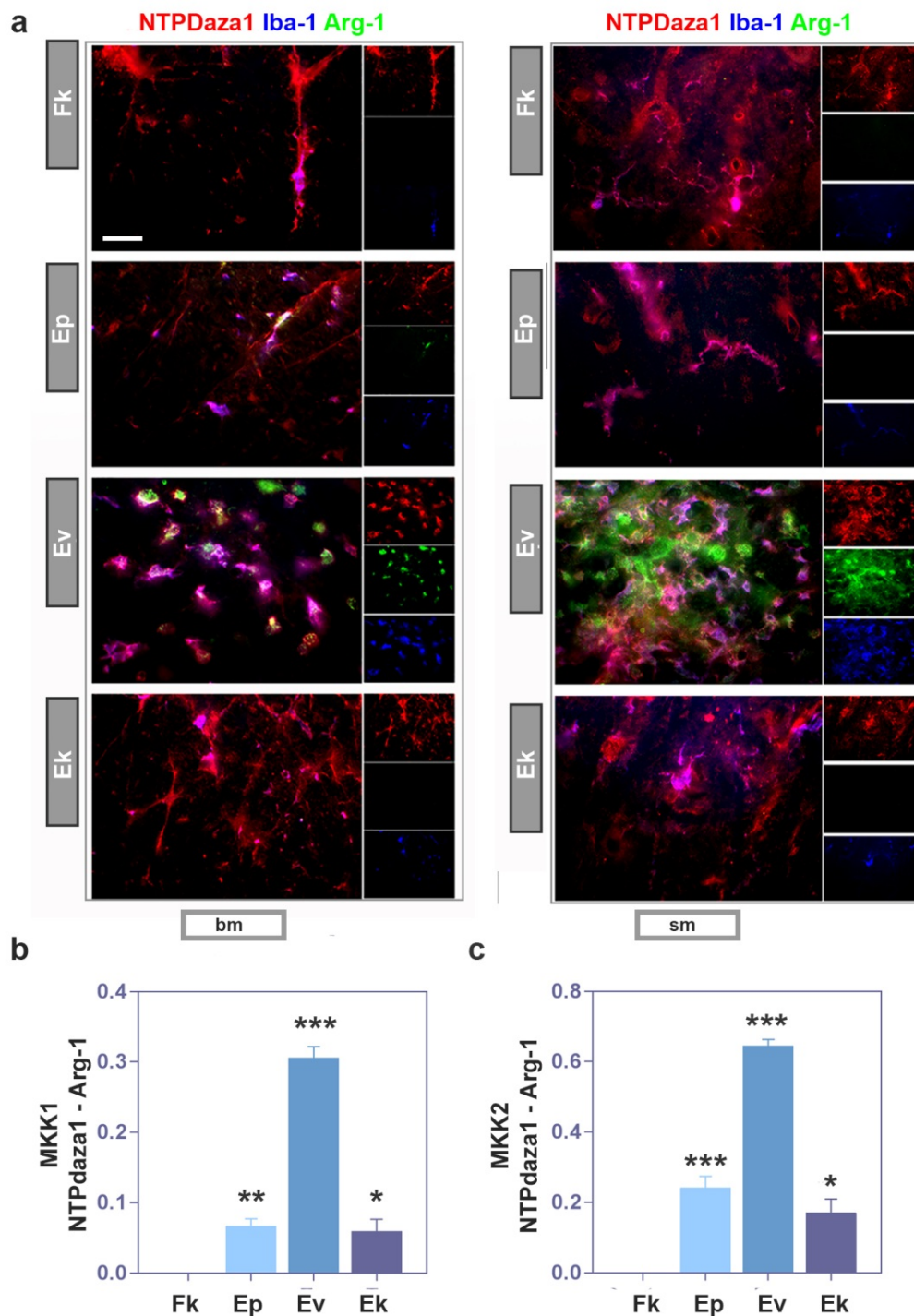
1.5.4. Karakterizacija inflamacijskog fenotipa NTPDaza1⁺ mikroglije/makrofaga

Kvantitativna analiza trojnog NTPDaza1/GFAP/Iba1 imunofluorescentnog obeležavanja pokazala je da su za povećanje ekspresije enzima NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini DA pacova tokom EAE najzaslužnije ćelije mikroglije i makrofaga. Kako u razrešenju akutnog procesa neuroinflamacije značajnu ulogu ima promena aktivacionog stanja mikroglije/makrofaga, dalji eksperimenti imali su za cilj da se okarakteriše inflamacijski tip NTPDaza1⁺ mikroglije/makrofaga tokom EAE. U tom smislu, primenjeno je obeležavanje najčešće korišćenih markera proinflamacijskog M1 fenotipa i antiinflamacijskog M2 fenotipa – inducibilna azot-oksida sintaza (iNOS), odnosno arginaza 1 (Arg1). Na reprezentativnim mikrografijama trostrukog NTPDaza1/Iba1/iNOS imunofluorescentnog bojenja prikazanim na Slici 8a na početku bolesti uočava se pojava manjeg broja iNOS imunoreaktivnih ćelija u beloj masi i ujedno maksimalna kolokalizacija Iba1 i iNOS signala. U istoj vremenskoj tački, uočava se i dominantno preklapanje NTPDaza1 i iNOS imunofluorescentnog signala, što je u skladu sa pokazanim porastom kolokalizacije NTPDaza1/Iba1 signala, kao i Iba1/iNOS u Ep. Saglasno uočenom, vrednosti MKK1 (Slika 8b) pokazuju da relativno mala frakcija NTPDaza1/CD39 signala - približno 10% (0.1 ± 0.01) kolokalizuje sa iNOS i da je ta kolokalizacija najveća na početku bolesti, dok daljim tokom bolesti opada. S druge strane, vrednosti MKK2 prikazane na Slici 8c pak pokazuju da čak 40% iNOS imunofluorescence kolokalizuje sa NTPDaza1/CD39 signalom u Ep (0.42 ± 0.03) i Ev (0.40 ± 0.03), a smanjuje se gotovo dvostruko u Ek (0.23 ± 0.04), što je u skladu sa uočenom pojavom iNOS signala pretežno na mikrogliji/makrofagima

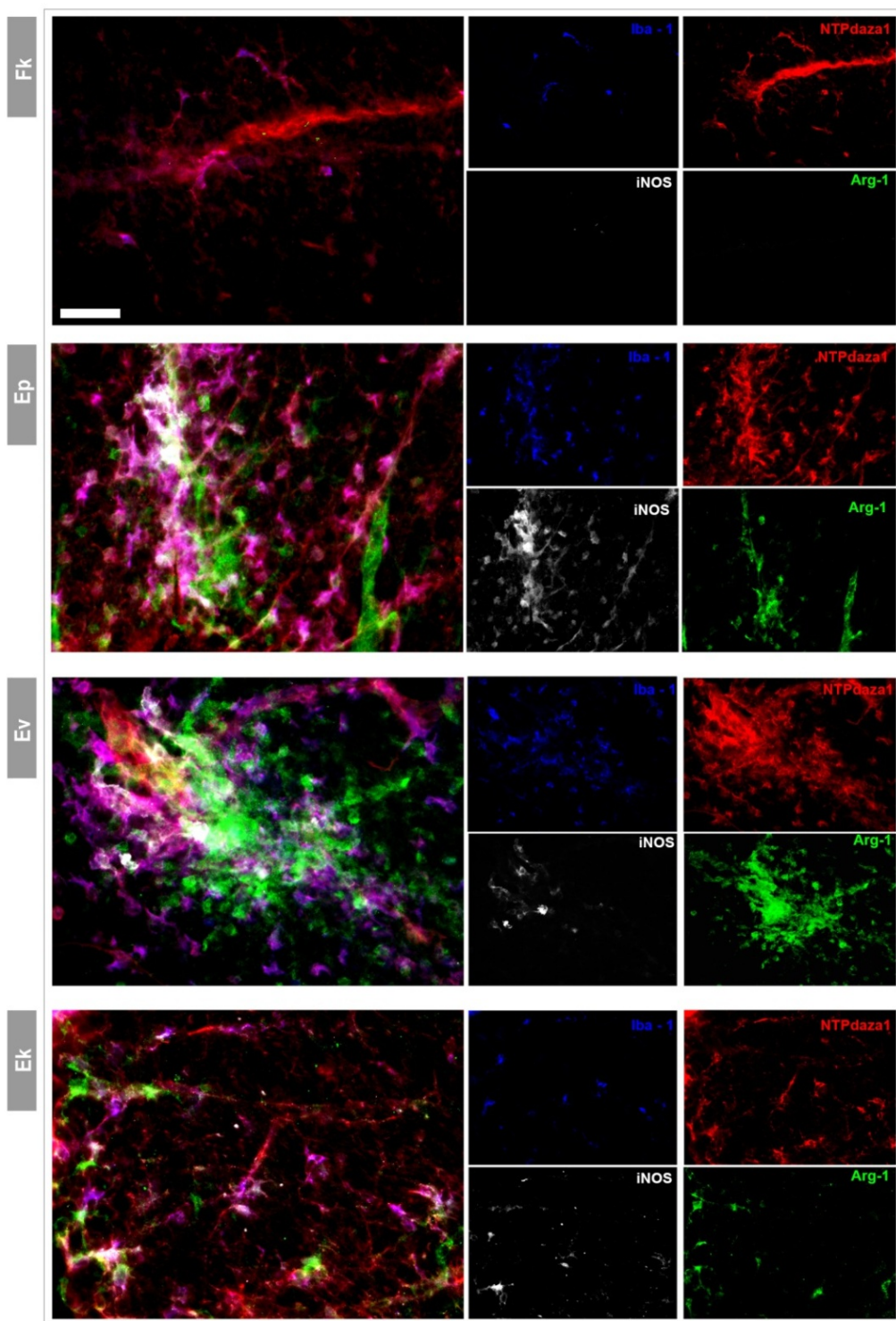
Na Slici 9a prikazano je trostruko NTPDaza1/Iba1/Arg1 imunofluorescentno bojenje u beloj i sivoj masi kičmene moždine u kontroli i tokom EAE. Arg1 imunofluorescentni signal odsutan je u kontroli, a prvi put se pojavljuje u Ep, dok je najjači u Ev gde se u najvećoj meri eksprimira na NTPDaza1⁺ aktiviranoj mikrogliji/makrofagima. Vrednosti MKK1 koja predstavlja frakciju NTPDaza1/CD39 signala koji kolokalizuje sa Arg1 prikazane na Slici 9b potvrdila su prethodna zapažanja i pokazale najviši nivo kolokalizacije NTPDaza1 i Arg1 signala na vrhuncu EAE od približno 30% (0.3 ± 0.02) i znatno manji u Ep (0.07 ± 0.01) i Ek (0.06 ± 0.02). Pored toga, vrednosti MKK2 (Slika 9c) koje predstavljaju udeo Arg1 koji kolokalizuje sa NTPDaza1 u Ev iznosile su približno 70% (0.65 ± 0.02), a znatno manje u Ep i Ek (0.25 ± 0.03 , odnosno 0.17 ± 0.03), u skladu sa uočenom dominantnom pojavom Arg1 na aktiviranoj mikrogliji/makrofagima. S obzirom da mikroglija/makrofagi *in vivo* prilikom aktivacije mogu da poprime neki od prelaznih fenotipova između dva ekstrema – M1 i M2, naredni cilj bio je ispitivanje da li se i u kom procentu ćelija iNOS i Arg1 ekspimiraju odvojeno tokom EAE, a u kojoj meri su zastupljene prelazne forme aktiviranog fenotipa koje ekspimiraju oba markera. Kako su antitela za oba analizirana markera dobijena iz istog izvora, imunofluorescentno obeležavanje koje bi podrazumevalo njihovu kombinaciju nije bilo izvodljivo, te je primenjena alternativna metoda preklapanja. Preklopljene su mikrografije istih regiona kičmene moždine dobijene na uzastopnim presecima trostrukim NTPDaza1/Iba1/iNOS i pojedinačnim Arg1 imunofluorescentnim obeležavanjem.



Slika 8. Kolokalizacija NTPDaza1/CD39, Iba1 i iNOS. (a) Reprezentativne mikrografije bele mase (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno obeležavanje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), iNOS (zelena fluorescencija) i Iba1 (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m. MKK (b, c) vrednosti (\pm SEM) dobijene su analizom kolokalizacije na mikrografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrografije po regionu za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: *** $p < 0.0001$ i * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.



Slika 9. Kolokalizacija NTPDaza1/CD39, Iba1 i Arg1. (a) Reprezentativne mikrografije bele mase (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno bojenje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescenca), Arg1 (zelena fluorescenca) i Iba1 (plava fluorescenca). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m. MKK vrednosti (\pm SEM) (b, c) dobijene su analizom kolokalizacije na mikrografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrografije po regionu za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.



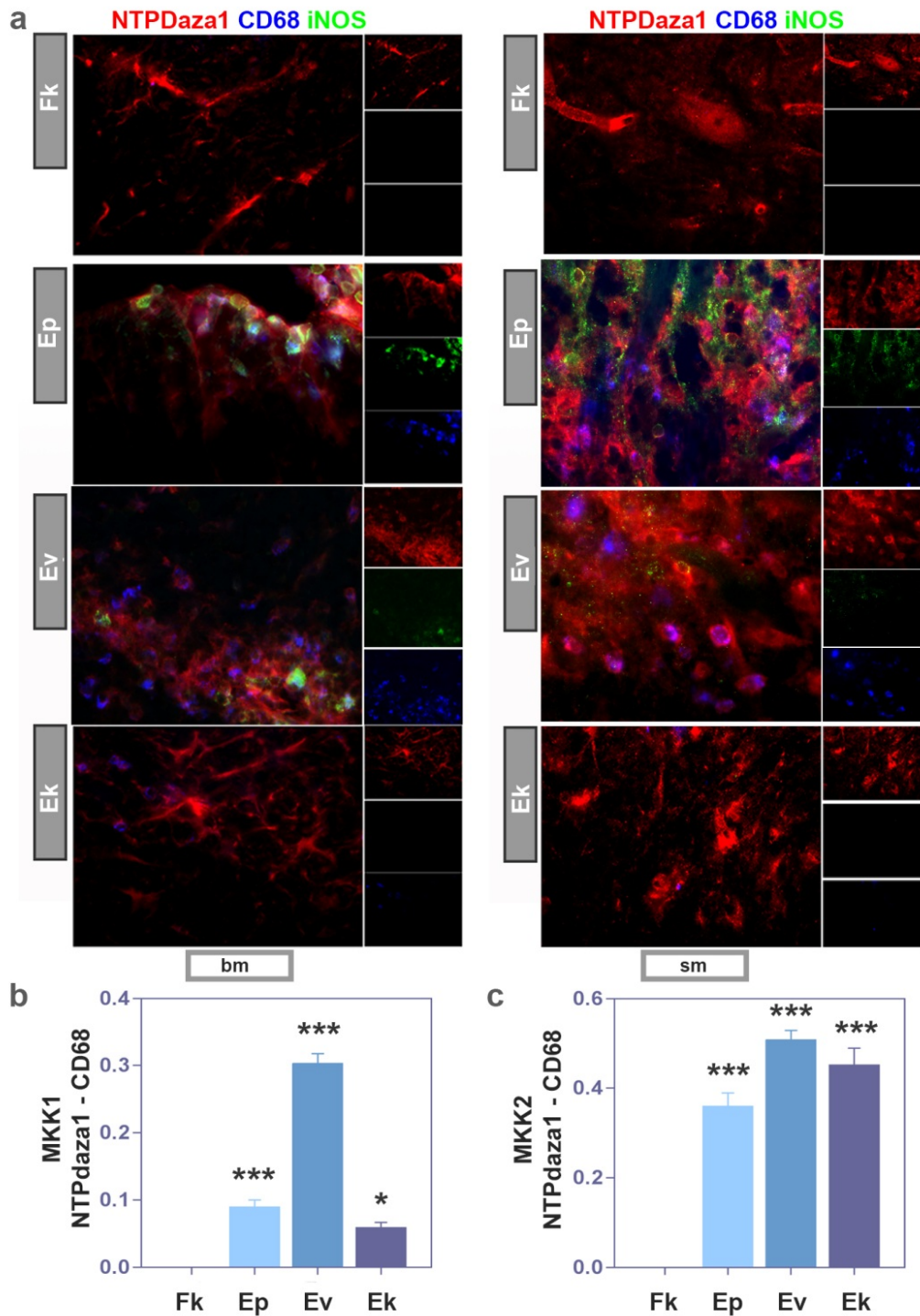
Slika 10. Funkcionalnost aktivirane mikroglije/makrofaga. Reprezentativne mikrografije prikazuju imunofluorescentno bojenje NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescenca), Iba1 (plava fluorescenca), iNOS (bela fluorescenca) preklapljeno sa Arg1 imunofluorescentnim bojenjem uzastopnih preseka kičmene moždine slikane u istim regionima (zelena fluorescenca). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m.

Reprezentative mikrografije dobijene ovom metodom prikazane na Slici 10 pokazuju da u Ep gotovo polovina NTPDaza1⁺Iba1⁺ ćelija eksprimira i iNOS i Arg1. Ovaj rezultat govori u prilog tome da *in vivo* veliki deo aktivirane mikroglije/makrofaga pripada mešovitom fenotipu. Ostale ćelije ekspimiraju pojedinačne markere, sa nešto većom zastupljenošću iNOS⁺ ćelija. U Ev se izrazito smanjuje broj dvostruko pozitivnih iNOS⁺Arg1⁺ ćelija u korist iNOS⁻Arg1⁺ ćelija, što ukazuje da u korišćenom EAE modelu na vrhuncu bolesti prevladava antiinflamacijski fenotip mikroglije/makrofaga koji je nalik M2 fenotipu. Preciznija kvantitativna analiza koja bi podrazumevala određivanje broja ćelija koje ekspimiraju specifičan marker nije bila moguća zbog velike gustine i preklapanja Iba1⁺ ćelija na mestima infiltrata.

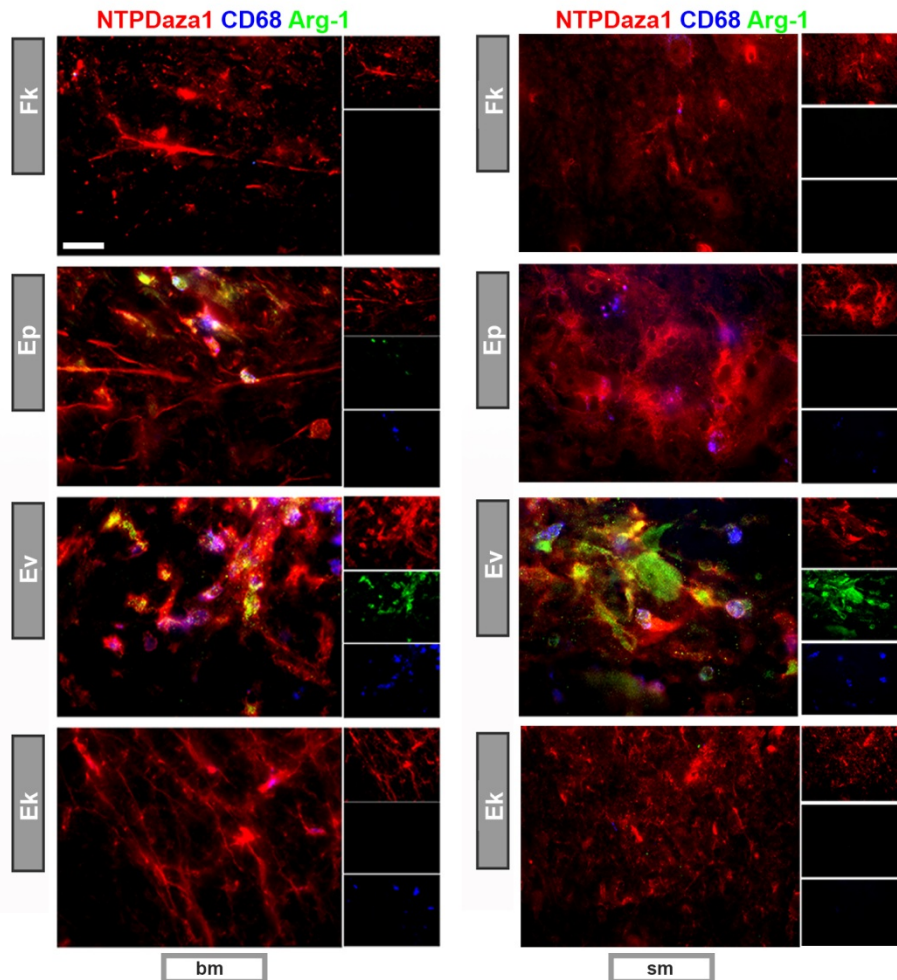
1.5.5. Karakterizacija inflamacijskog fenotipa NTPDaza1⁺ aktivirane mikroglije/makrofaga

Dalje, usledila je detaljnija analiza inflamacijskog fenotipa NTPDaza1⁺ aktivirane mikroglije/makrofaga pri čemu je kao marker aktiviranih ćelija korišćen protein CD68. Aktivacioni status NTPDaza1⁺ aktivirane mikroglije/makrofaga određen je trostrukim imunofluorescentnim obeležavanjem antitelima specifičnim za NTPDaza1/CD39, CD68 i iNOS (Slika 11), odnosno Arg1 (Slika 12). Na Slici 11a prikazane su reprezentativne mikrografije trostrukog NTPDaza1/CD68/iNOS imunofluorescentnog obeležavanja u beloj i sivoj masi kičmene moždine u kontroli i tokom EAE. Očekivano, na kontrolnim presecima ne uočava se prisustvo CD68⁺ ćelija. Na početku bolesti CD68⁺ ćelije loptastog oblika su na presecima vidljive unutar infiltrata, uglavnom u subpijalnim i perivaskularnim regionima, a većim delom koeksprimiraju iNOS. U Ev broj CD68⁺ ćelija raste, pretežno unutar infiltrata ali i u parenhimu, pri čemu veoma retko koeksprimiraju iNOS. Konačno, tokom završne faze bolesti na presecima se samo sporadično uočavaju pojedinačne CD68⁺ ćelije, bez koekspresije iNOS. Vrednosti MKK1 za NTPDaza1/CD68 imunofluorescencu (Slika 11b) pokazuju da u Ev frakcija NTPDaza1 imunofluorescentnog signala koja kolokalizuje sa CD68 dostiže najviši nivo i iznosi približno 30% (0.3 ± 0.01) za razliku od Ep (0.09 ± 0.01) i Ek (0.06 ± 0.01). S druge strane, MKK2 vrednosti (Slika 11c) pokazuju da približno 50% CD68 signala kolokalizuje sa NTPDaza1/CD39 tokom EAE. Na Slici 12 prikazane su reprezentativne mikrografije trostrukog obeležavanja antitelima specifičnim za NTPDaza1/CD39, CD68 i Arg1 bele i sive mase kičmene moždine u kontroli i tokom EAE. U skladu sa očekivanim, na kontrolnim presecima nemani CD68⁺ niti Arg1⁺ ćelija. Na početku EAE uočava se mali broj dvostruko pozitivnih CD68⁺Arg1⁺ ćelija, dok je na vrhuncu bolesti prisutan maksimalni broj ovih ćelija. Dodatno, većina CD68⁺Arg1⁺ ćelija koeksprimira i NTPDaza1/CD39, što zajedno sa prethodno prikazanim rezultatima kvantifikacije (MKK2, Slika 11c) prema kojima približno 50% CD68 fluorescence kolokalizuje sa NTPDaza1, ukazuje da na vrhuncu bolesti značajan deo CD68⁺ ćelija predstavljaju dvostruko pozitivni NTPDaza1⁺CD68⁺ aktivirani monociti/makrofagi i mikroglija fenotipa nalik M2.

Budući da je zbog manje brojnosti, za razliku od Iba1⁺ ćelija u zonama infiltrata bilo moguće prebrojati CD68⁺ ćelije, u daljoj analizi određen je njihov broj, broj trostruko pozitivnih NTPDaza1⁺CD68⁺iNOS⁺ odnosno NTPDaza1⁺CD68⁺Arg1⁺ ćelija, kao i broj četverostruko pozitivnih NTPDaza1⁺CD68⁺iNOS⁺Arg1⁺ ćelija. Na Slici 13a prikazane su reprezentativne preklapljenе mikrografije trostruke NTPDaza1/CD68/iNOS imunofluorescence sa Arg1 signalom uzastopnih preseka kičmene moždine u beloj masi tokom EAE. U skladu sa mikroskopskim zapažanjima, kvantifikacija mikrografija pokazala je da je broj CD68⁺ ćelija po preseku (Slika 13b) značajno povećan u Ev u odnosu na Ep. Procenat NTPDaza1⁺CD68⁺iNOS⁺ u odnosu na ukupan broj CD68⁺ ćelija (Slika 13c) najviši je u Ep i iznosi približno 50% (51.3 ± 7.8) dok je u Ev smanjen na zanemarljiv nivo (1.4 ± 1.4). Nasuprot tome, procenat NTPDaza1⁺CD68⁺Arg1⁺ ćelija u odnosu na ukupan broj



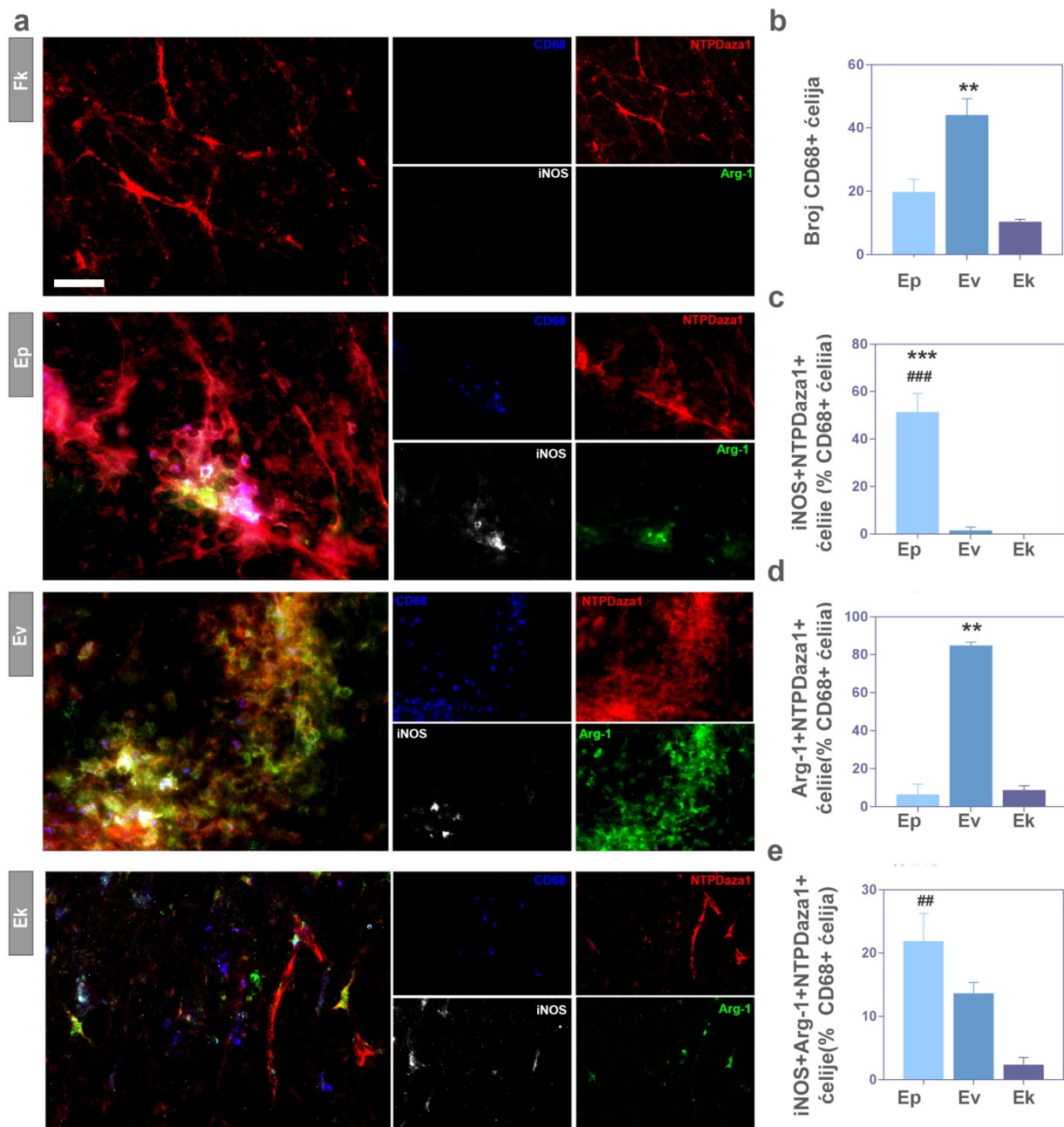
Slika 11. Kolokalizacija NTPDaza1/CD39, CD68 i iNOS. (a) Reprezentativne mikrografije bele (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno obeležavanje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), iNOS (zelena fluorescencija) i CD68 (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m. MKK vrednosti (\pm SEM) (b, c) dobijene su analizom kolokalizacije na mikrografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrografije po regionu za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: *** $p < 0.0001$ i * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.



Slika 12. Kolokalizacija NTPDaza1/CD39, CD68 i Arg1. (a) Reprerzentativne mikrografije bele mase (bm) i sive mase (sm) kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno bojenje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), Arg1 (zeleni fluorescencija) i CD68 (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m.

CD68⁺ ćelija (Slika 13d) najviši je u Ev (84.91 \pm 1.81) dok je u Ep (6.39 \pm 5.45) i Ek (8.60 \pm 2.41) gotovo zanemarljiv. Dodatno, uočen je i određen broj četverostruko pozitivnih NTPDaza1⁺CD68⁺iNOS⁺Arg1⁺ ćelija koje ukazuju na prisustvo mešovito fenotipa nalik M1/M2. Najveći procenat ovih ćelija (Slika 13e) uočen je na početku bolesti (21.86 \pm 4.4) dok se na vrhuncu taj procenat blago smanjio (13.64 \pm 1.72), a na kraju dostigao zanemarljivo male vrednosti (2.33 \pm 1.17) u odnosu na početak bolesti.

Sumarno, u Ep približno 50% CD68⁺ ćelija su iNOS⁺. Od tog broja nešto manje od polovine koeksprimira Arg1⁺ i predstavlja mešoviti fenotip nalik M1/M2. Dobijeni rezultati dodatno potvrđuju dominantno prisustvo fenotipa nalik M1 na početku bolesti u populaciji NTPDaza1⁺ fagocitujućih aktiviranih makrofaga i mikroglije. Nasuprot tome, na vrhuncu bolesti najveći deo CD68⁺ ćelija (84.91%) čine Arg1⁺ ćelije, među kojima manje od petine koeksprimira iNOS. Ovaj rezultat potvrđuje dominantno prisustvo fenotipa nalik M2 u populaciji NTPDaza1⁺ fagocitujućih makrofaga i mikroglije na vrhuncu EAE.



Slika 13. Funkcionalnost aktivirane mikroglije/makrofaga. (a) Reprezentativne mikrofografije prikazuju imunofluorescentno bojenje NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), CD68 (plava fluorescencija), iNOS (bela fluorescencija) preklopljeno sa Arg1 imunofluorescentnim bojenjem uzastopnih preseka kičmene moždine slikane u istim regionima (zelena fluorescencija). Skala veličine za sve mikrofografije: 20 μ m. Na graficima su prikazane kvantifikacije ukupnog broja CD68⁺ ćelija (b), udeo iNOS⁺NTPDaza1⁺ ćelija (% ukupnog broja CD68⁺ ćelija), udeo Arg1⁺NTPDaza1⁺ ćelija (% ukupnog broja CD68⁺ ćelija), kao i udeo iNOS⁺Arg1⁺NTPDaza1⁺ ćelija (% ukupnog broja CD68⁺ ćelija). Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrofografije po regionu za 6 preseka po životinji za 3 životinje za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: (b) **p<0.01 između Ev i Ek, (c) ***p<0.001 između Ep i Ev i ###p<0.001 između Ep i Ek, (d) **p<0.01 između Ep i Ev i (e) ##p<0.01 između Ep i Ek, Kruskal - Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.

1.5.6. Funkcionalno stanje mikroglije i makrofaga

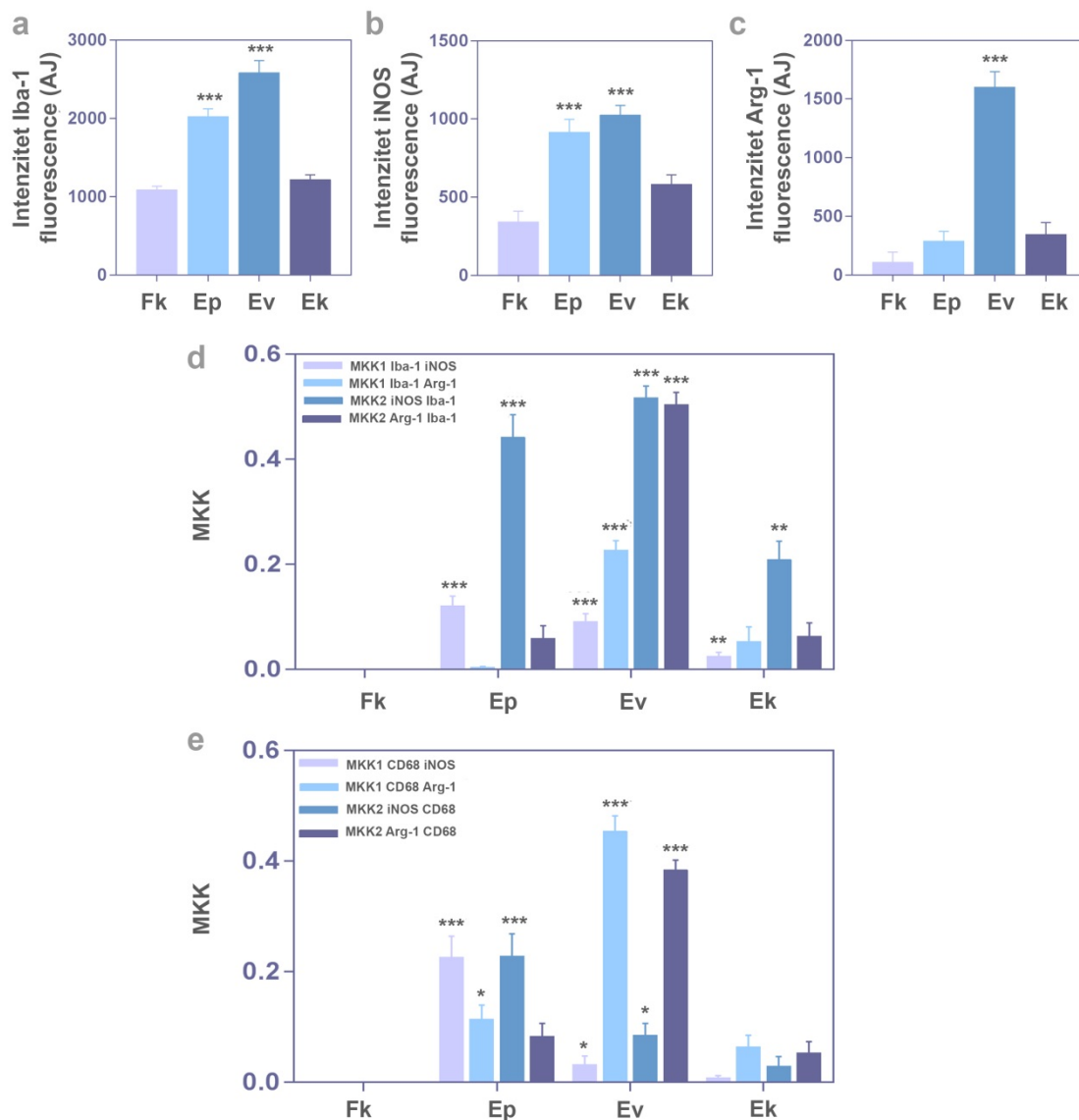
U cilju procene inflamacijskog statusa tkiva u kičmenoj moždini tokom EAE analiziran je profil ekspresije iRNK metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu za određene gene koji su povezani sa imunskim odgovorom i funkcionalnim stanjem mikroglije/makrofaga (Tabela 2). Ekspresija gena koji nose genetičku informaciju za proteine Iba1 (*Aif1*), CD68 (*Cd68*) fraktalkin (*Cx3cr1*) pokazala je najveći porast u Ev, dok je u slučaju gena za inducibilnu sintazu azot-monoksida (*Nos2*) najveći porast zabeležen u Ep. Ekspresija gena za arginazu1 (*Arg1*) i CD11b (*Itgam*) u jednakoj meri je povišena u Ep i Ev u odnosu na Fk.

Tabela 2. Ekspresija gena sa poznatom ulogom u neuroinflamaciji tokom EAE. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost stepena promene u odnosu na Fk (\pm SEM). Nivoi statističke značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolu, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.

Gen od interesa	Gen od interesa/GAPDH-iRNK (stepen promene u odnosu na Fk)		
	Ep	Ev	Ek
<i>Aif1</i>	5.2 \pm 0.5**	14.5 \pm 0.5***	4.5 \pm 0.4*
<i>Nos2</i>	12 079 \pm 2590***	1370 \pm 389***	99 \pm 39
<i>Arg1</i>	8.5 \pm 0.7***	6.5 \pm 1.7***	1.5 \pm 0.2
<i>Cd68</i>	29.0 \pm 5.4***	67.2 \pm 3.8***	16.7 \pm 2.4*
<i>Itgam</i>	11.3 \pm 1.2***	11.0 \pm 0.6***	3.9 \pm 0.3
<i>Cx3cr1</i>	1.2 \pm 0.2	4.1 \pm 0.8**	3.1 \pm 0.3*

U skladu sa rezultatima genske ekspresije, ukupna Iba1 imunofluorescenca (Slika 14a) određena kvantifikacijom sa mikrofografija dobijenih trostrukim obeležavanjem Iba1/NTPDaza1 i iNOS, odnosno Arg1 (Slike 8 i 9) porasla je približno dva puta na početku (2027 \pm 96.29) i nešto više na vrhuncu bolesti (2583 \pm 155.3) u odnosu na fiziološku kontrolu (1089 \pm 44.84). Takođe u skladu sa promenama genske ekspresije, vrednosti dobijene kvantifikacijom iNOS⁺ imunofluorescence (Slika 14b) sa mikrofografija dobijenih trostrukim obeležavanjem NTPDaza1/iNOS i Iba1, odnosno CD68 (Slike 8 i 11) pokazuju značajan porast u Ep (915.4 \pm 82.49) i Ev (1025 \pm 62.25) u odnosu na Fk (342.6 \pm 67.89). S druge strane, iako je na nivou iRNK ekspresija Arg1 pojačana i u Ep i Ev, Arg1 imunofluorescenca na trostruko obeleženim NTPDaza1/Arg1 i Iba1, odnosno CD68 mikrofografijama (Slike 8 i 12) pokazuje značajan porast samo u Ev (1603 \pm 130.5) u odnosu na Fk (109.5 \pm 86.4) (Slika 14c). Kada je u pitanju Iba1/iNOS dvostruko imunofluorescentno obeležavanje prikazano na slici 8a, frakcija Iba1 fluorescence kolokalizovane sa iNOS (MKK1, Slika 14d) najveća je na početku bolesti i iznosi približno 12% (MKK1 = 0.12 \pm 0.02), potom opada na vrhuncu (MKK1 = 0.09 \pm 0.02) i dostiže zanemarljive vrednosti na kraju bolesti (MKK1 = 0.02 \pm 0.01). Nasuprot tome, MKK1 vrednosti dobijene analizom mikrofografija dvostrukog Iba1/Arg1 obeležavanja prikazanih na Slici 9a dostižu najviši nivo u Ev (0.23 \pm 0.02) što znači da približno 23% Iba1 imunofluorescentnog sinala kolokalizuje sa Arg1 na vrhuncu bolesti. Ujedno, ove vrednosti su približno tri puta veće u odnosu na vrednosti MKK1 za dobijene za Iba1/iNOS kolokalizaciju u istoj vremenskoj tački (Slika 14d). MKK2 vrednosti koje predstavljaju udeo iNOS imunofluorescentnog signala koji kolokalizuje sa Iba1 (Slika 14d) značajno su povišene u sve tri faze bolesti, što ukazuje da se ekspresija iNOS tokom EAE u najvećoj meri javlja na mikrogliji/makrofagima. U slučaju Arg1, MKK2 vrednosti povišene su samo u

Ev i pokazuju da je na vrhuncu približno 50% Arg1 imunofluorescence povezano sa mikroglijom/makofagima. Kada je u pitanju CD68/iNOS dvostruko imunofluorescentno obeležavanje prikazano na Slikama 11a i 12a, MKK1 vrednosti dostižu najviši nivo u Ep (0.23 ± 0.04). Ove vrednosti ukazuju da približno četvrtina CD68 imunoreaktivnosti kolokalizuje sa iNOS na početku bolesti (Slika 14e). U skladu sa tim, u istoj vremenskoj tački značajno su povišene i MKK2 vrednosti.



Slika 14. Karakterizacija aktivirane mikroglije i makrofaga tokom EAE. Intenzitet fluorescence određen je za Iba1 (a), iNOS (b) i Arg1 (c) imunofluorescentno bojenje lumbosakralnih preseka kičmene moždine životinja kontrolne grupe i tokom EAE. Na graficima su predstavljene srednje vrednosti intenziteta fluorescence (\pm SEM). (d, e) MKK srednje vrednosti (\pm SEM) dobijene su analizom kolokalizacije na mikrofografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti (a-e) su dobijene analizom najmanje 4 mikrofografije po preseku za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test. Nivo statističke značajnosti: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.05$.

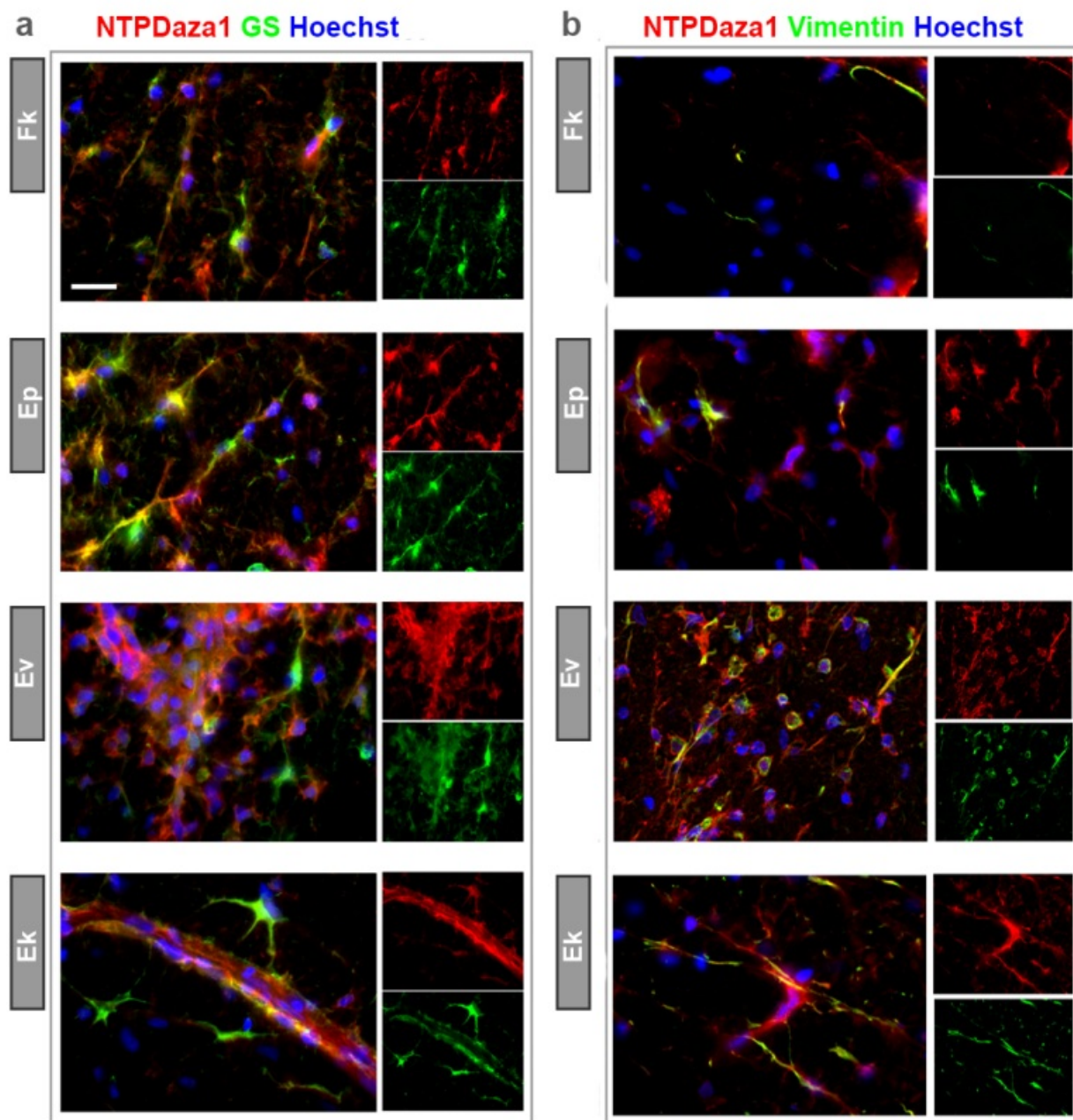
Međutim, za dvostruko CD68/Arg1 obeležavanje, MKK1 vrednosti su značajno povišene u Ep (0.11 ± 0.03), a najizrazitiji porast uočen je u Ev (0.45 ± 0.03). To znači da na vrhuncu bolesti gotovo polovina CD68 imunofluorescentnog signala kolokalizuje sa Arg1, što je gotovo deset puta više u odnosu na iNOS u istoj vremenskoj tački. Ujedno, na vrhuncu bolesti značajno su povišene i MKK2 vrednosti (0.38 ± 0.02) koje ukazuju da približno 40% Arg1 imunofluorescence kolokalizuje sa CD68. U celosti, ovi rezultati ukazuju na dominaciju fenotipa nalik M1 na početku, odnosno dominaciju fenotipa nalik M2 na vrhuncu bolesti u ukupnoj, kao i u populaciji aktivirane mikroglije/makrofaga.

1.5.7. Heterogenost NTPDaza1⁺ astrocita

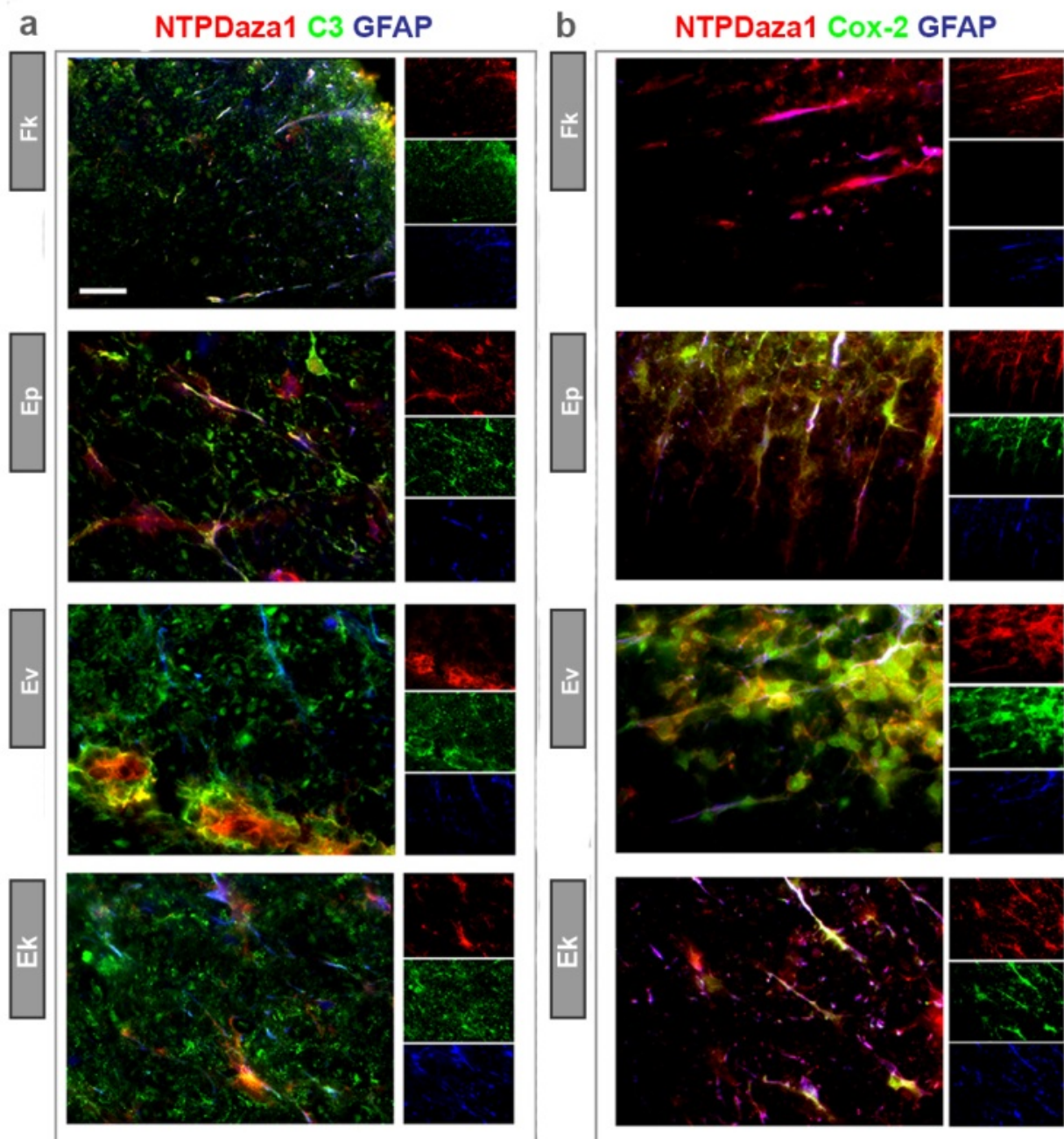
Budući da su prethodno opisani rezultati pokazali da se NTPDaza1/CD39 eksprimira i na genskom i na proteinskom nivou u astrocitima, u daljoj analizi praćena je ekspresija ovog enzima kod različitih kategorija ovih ćelija. Na Slici 15 prikazane su reprezentativne mikrografije dvostrukog imunofluorescentnog obeležavanja antitelima specifičnim za NTPDaza1/CD39 i glutamin sintetazu (GS) kao opšti marker astrocita (Sika 15a), odnosno za vimentin kao marker nezrelih ili aktiviranih astrocita (Slika 15b). Mikrografije su načinjene u beloj masi kičmene moždine, budući da je kolokalizacija NTPDaza1/CD39 i astrocita u najvećoj meri uočena u ovoj strukturi. U svim vremenskim tačkama EAE NTPDaza1/CD39 imunofluorescentni signal pokazivao je gotovo potpuno preklapanje sa GS i vimentinom, posebno izraženo u beloj masi. Tokom EAE, posebno na kraju bolesti, na GS⁺ astrocitima uočava se skraćivanje i zadebljavanje nastavaka, kao i hipertrofija ćelijskog tela koja ukazuje na proces astroglioze. Uprkos izraženoj GS imunoreaktivnosti na astrocitima u Ek uočenoj na mikrografijama, rezultati Western Blot analize pokazali su da nema promena u proteinskoj ekspresiji GS tokom EAE (Prilog 1).

Iz literature je poznato da aktivacioni fenotip mikroglije moduliše aktivaciju astrocita, usmeravajući je u pravcu neurotoksičnog (A1) ili protektivnog (A2) fenotipa. Rezultati ove disertacije pokazali su da dolazi do prelaska mikroglije/makrofaga iz pretežno proinflamacijskog na početku u pretežno antiinflamacijski fenotip na vrhuncu EAE. Stoga je predmet dalje analize bio ispitivanje aktivacionog statusa astrocita tokom EAE, kao i eventualnih promena ekspresije NTPDaza1/CD39 povezanih sa aktivacijom. S tim ciljem urađeno je trostruko imunofluorescentno obeležavanje antitelima specifičnim za NTPDaza1/CD39, GFAP i protein komplementa C3 kao marker neurotoksičnog A1 fenotipa, odnosno Cox-2 kao marker neuroprotektivnog A2 fenotipa (Slika 16). Sa mikrografija je uočljiv porast C3 imunofluorescence (Slika 16a) tokom EAE, što je povezano sa porastom broja infiltrata koji pokazuju snažnu C3 imunoreaktivnost. Međutim, u pogledu ekspresije C3 na GFAP⁺ astrocitima, kolokalizacija ova dva proteina retko se uočava. Kada je u pitanju drugi korišćeni marker - Cox-2, na reprezentativnim mikrografijama (Slika 16b) Cox-2 fluorescentni signal odsutan je u Fk, dok se tokom EAE snažan signal pojavljuje na astrocitima (posebno u beloj masi), kao i na brojnim NTPDaza1⁺ ćelijama ovoidne forme posebno u zonama infiltrata, što ukazuje na izraženu ekspresiju ovog enzima na aktiviranoj mikrogliji/makrofagima. Mikroskopska zapažanja potvrđena su vrednostima PKK dobijenim kvantitativnom analizom ovih mikrografija koje pokazuju visoku korelaciju NTPDaza1/CD39 i Cox-2 imunofluorescence, kao i nešto manju korelaciju GFAP i Cox-2 u svim vremenskim tačkama bolesti, u oba slučaja značajno veću u odnosu na Fk (Slika 17a). PKK vrednosti za korelaciju GFAP i Cox-2 najveće su na kraju bolesti (0.46 ± 0.02), što ukazuje na snažnu ekspresiju Cox-2 na aktiviranim astrocitima. U skladu sa prethodnom analizom, dobijene vrednosti MKK1 (Slika 17b) pokazuju da je frakcija NTPDaza1⁺ signala kolokalizovana sa Cox-2 tokom EAE relativno velika i iznosi približno 50% u Ep (0.53 ± 0.02) i Ev (0.5 ± 0.03), a čak 60% u Ek (0.61 ± 0.03). Pored toga, vrednosti MKK2 za ova dva signala iznose približno 70% u sve tri vremenske tačke,

što ukazuje da tokom bolesti visok udeo Cox-2 signala kolokalizuje sa NTPDaza1/CD39. MKK1 vrednosti za GFAP i Cox-2 pokazuju da frakcija GFAP imunofluorescence kolokalizovana sa Cox-2



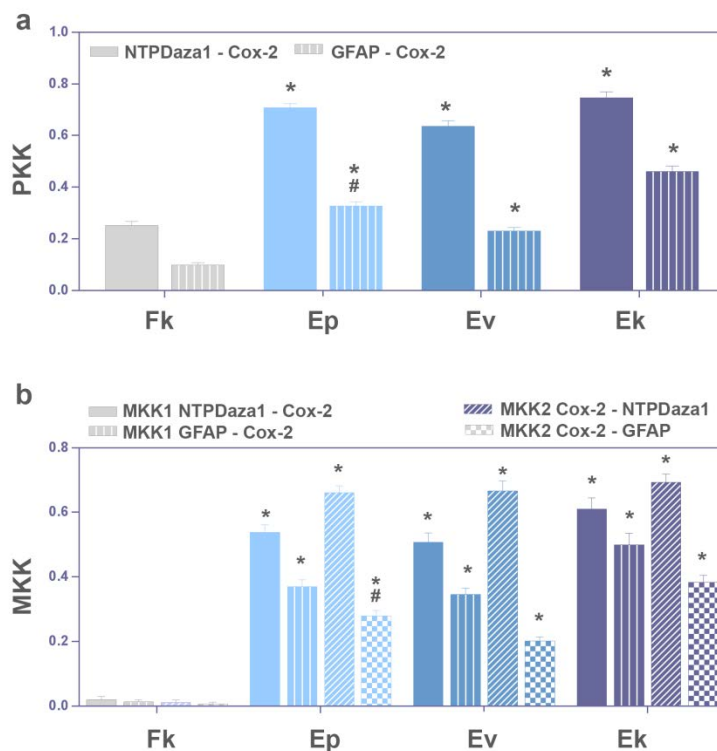
Slika 15. Heterogenost NTPDaza1+ astrocita. Reprezentativne mikrografije prikazuju dvostruko imunofluorescentno obeležavanje antitelima za NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescenca) i glutamin sintetazu – GS (zelena fluorescenca), (a), odnosno vimentin (zelena fluorescenca), (b). Čelijska jedra obojena su Hoechst bojom. Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m.



Slika 16. Heterogenost NTPDaza1+ astrocita. Reprezentativne mikrografije prikazuju trostruko imunofluorescentno obeležavanje za NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescenca), GFAP (plava fluorescenca) i C3 protein sistema komplementa (zelena fluorescenca) (a), odnosno Cox-2 (zelena fluorescenca) (b) i. Skala veličine za sve mikrografije: 20 μm .

raste tokom EAE, dostižući najviši nivo na kraju bolesti (~ 35% u Ep i Ev, ~ 50% u Ek). S druge strane, MKK2 vrednosti pokazuju da se frakcija Cox-2 signala kolokalizovana sa GFAP delimično smanjuje u Ev (~30% u Ep, a ~20% u Ev), što je najverovatnije u vezi sa pojavom velikog broja infiltrata koji snažno ekspimiraju Cox-2. Na kraju bolesti, MKK2 dostiže najveću vrednost (~40%), u skladu sa uočenim porastom ekspresije na astrocitima.

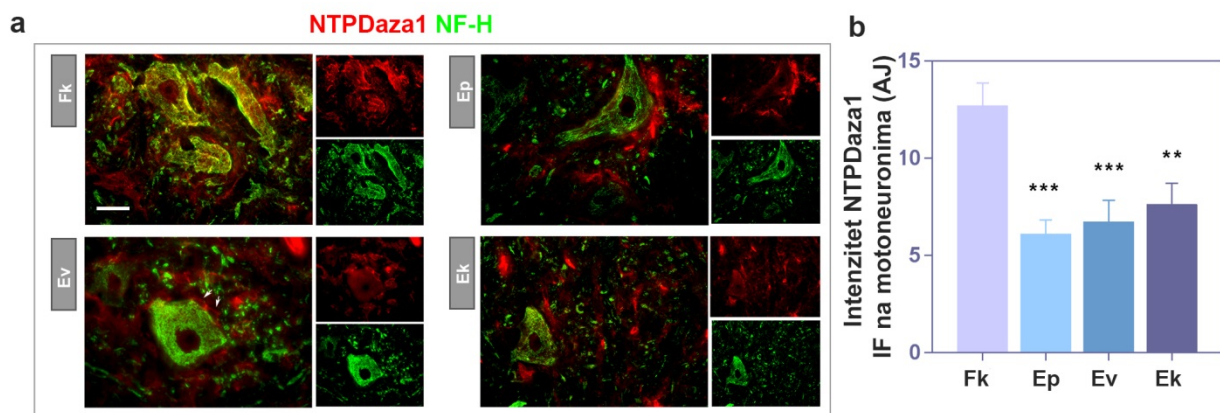
Izražena ekspresija Cox-2, kao i retka pojava C3 imunoreaktivnosti na astrocitima tokom EAE ukazuju na relativno slab inflamacijski potencijal tkiva, kao i na veću zastupljenost neuroprotektivnog fenotipa astrocita u EAE modelu korišćenom u ekperimentima u okviru ove disertacije.



Slika 17. Kvantifikacija kolokalizacije NTPDaza1/CD39, Cox-2 i GFAP imunofluorescence tokom EAE. PKK (a) i MKK (b) vrednosti (\pm SEM) dobijene su analizom korelacije i kolokalizacije signala na mikrografijama sa preklopljenim kanalima označenim na graficima. Vrednosti su dobijene analizom najmanje 4 mikrografije po regionu za 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: * $p < 0.0001$ u odnosu na Fk i # $p < 0.05$ Ep u odnosu na Ek, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.

1.5.8. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na neuronima

Budući da je metodom *in situ* hibridizacije pokazana ekspresija NTPDaza1/CD39 iRNK na subpopulaciji velikih α - motoneurona u ventralnom rogu kičmene moždine pacova, dalja analiza podrazumevala je određivanje nivoa proteinske ekspresije NTPDaza1/CD39 na ovim ćelijama. S tim ciljem, urađeno je dvostruko imunofluorescentno obeležavanje antitelima specifičnim za NTPDaza1/CD39 i tešku subjedinicu neurofilamenta (NF-H) koji obeležava tela i deblje aksone nervnih ćelija (Slika 18a). Kvantifikacija NTPDaza1/CD39 fluorescentnog signala na telu motoneurona (Slika 18b) pokazala je da za razliku od iRNK, dolazi do značajnog pada NTPDaza1/CD39 imunofluorescence tokom EAE, posebno izraženog na početku i vrhuncu bolesti. U ovim vremenskim tačkama, u neposrednoj blizini tela motoneurona uočavaju se ovoidne ćelije snažne NTPDaza1⁺ imunoreaktivnosti, koje podsećaju na aktiviranu mikrogliju/makrofage.



Slika 18. Ekspresija NTPDaza1/CD39 na motoneuronima kičmene moždine tokom EAE. (a) Reprezentativne mikrografije prikazuju dvostruko imunofluorescentno obeležavanje ventralnog roga kičmene moždine specifično za NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija) i tešku subjedinicu neurofilamenta (NF-H, zelena fluorescencija). Strelice ukazuju na ćelije nalik mikrogliji u bliskom kontaktu sa velikim ćelijskim telima motoneurona. Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m. (b) Intenzitet NTPDaza1/CD39 fluorescencije prikazan u arbitrarnim jedinicama (AJ) na motoneuronima u Fk i tokom EAE. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti u AJ (\pm SEM) za najmanje 3 neurona po preseku za najmanje 6 preseka po životinji za 3 životinje po eksperimentalnoj grupi za dva nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ i *** $p < 0.0001$, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test.

1.6. NTPDaza2

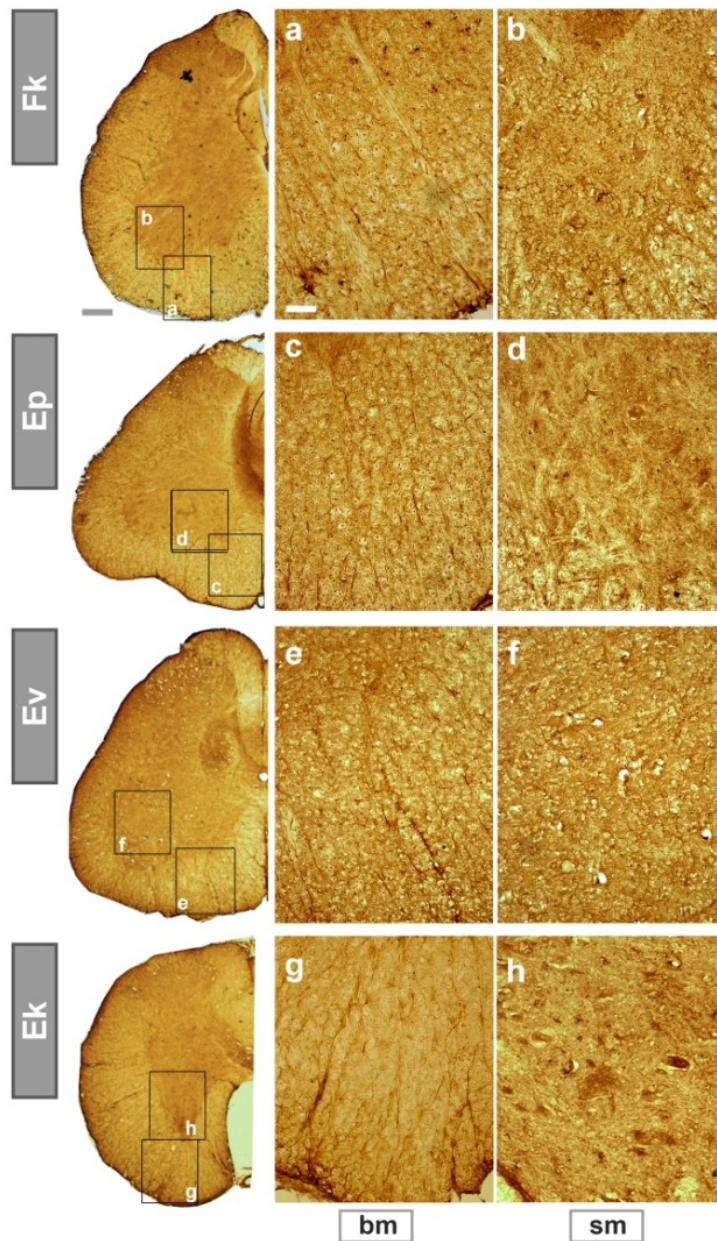
1.6.1. Lokalizacija NTPDaza2 imunohistohemijskog signala

Kako je analiza ekspresije NTPDaza2 pokazala da tokom EAE kod ove ektonukleotidaze dolazi do promena i na genskom i na proteinskom nivou, u daljoj analizi ispitana je njena tkivna lokalizacija i ćelijska distribucija. Na Slici 19 prikazano je imunohistohemijsko obeležavanje antitelom specifičnim za NTPDaza2 u beloj i sivoj masi kičmene moždine u kontroli i tokom EAE. U skladu sa rezultatima analize genske (Tabela 1) i proteinske ekspresije (Slika 2), na ovim mikrografijama uočava se najjači intenzitet NTPDaza2 signala u kontrolnim presecima, dok se u Ep i Ev jačina signala smanjuje. Na kraju bolesti nivo NTPDaza2 signala približan je onom u Fk. Promene nivoa NTPDaza2 signala jasno se uočavaju na mikrografijama malog uvećanja preseka iz kontrole i tokom bolesti, na Slici 19. U pogledu ćelijskih elemenata koji su specifično obeleženi na NTPDaza2, na mikrografijama velikog uvećanja prikazanim na Slikama 19a, c, e i g u beloj masi kičmene moždine se jasno uočavaju fibrozni elementi koji nalikuju fibroznim astroцитima. Za razliku od toga, NTPDaza2 imunoreaktivnost u sivoj masi je slaba i nespecifična (Slike 19b, d, f i h).

1.6.2. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima astrocita

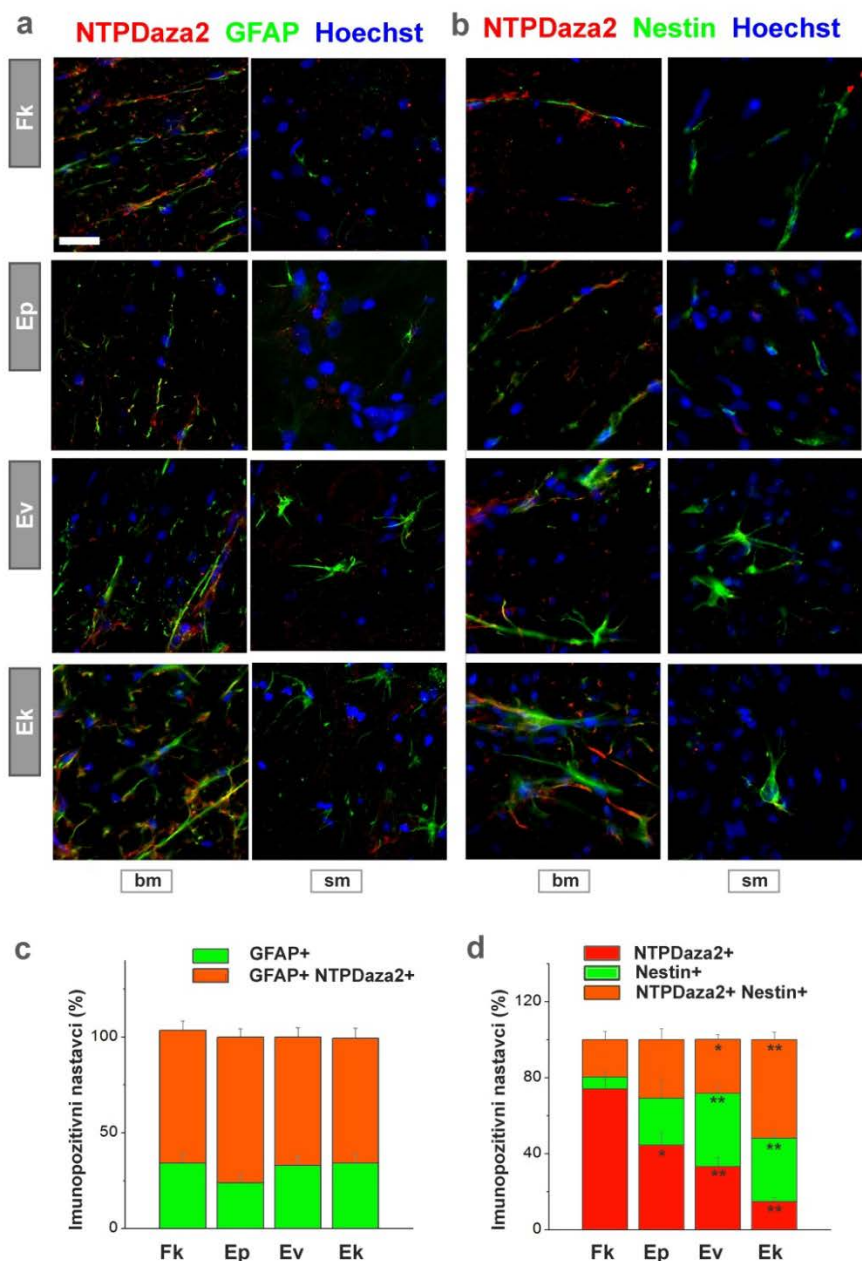
Budući da je na prethodno prikazanim mikrografijama NTPDaza2 imunoreaktivnost uočena u beloj masi kičmene moždine na fibroznim elementima nalik astroцитima, dalje je ispitana ekspresija NTPDaza2 na astroцитima uz pomoć antitela specifičnih za markere ovih ćelija. Ova analiza urađena je dvostrukim imunofluorescentnim obeležavanjem antitelima specifičnim za NTPDaza2 i GFAP, pan-astroцитni marker, kao i za nestin - marker neuronskih progenitora, ali i aktiviranih astrocita. Reprezentativne mikrografije bele i sive mase kičmene moždine na kontrolnim presecima i tokom EAE prikazane su na Slici 20a. Na kontrolnim presecima, NTPDaza2 fluorescentni signal uočava se isključivo u beloj masi, na većini GFAP⁺ nastavaka astrocita. Tokom bolesti, GFAP imunoreaktivnost raste zajedno sa hipertrofijom tela astrocita i skraćivanjem i zadebljavanjem njihovih nastavaka što

ukazuje na proces astroglioze, uz istovremeno smanjenje NTPDaza2 fluorescentnog signala u beloj masi. S druge strane, kvantifikacija broja GFAP⁺ nastavaka, kao i dvostruko obeleženih GFAP⁺NTPDaza2⁺ nastavaka prikazana na Slici 20c pokazuje da broj dvostruko obeleženih nastavaka ostaje isti tokom celokupnog toka bolesti, što ukazuje da do promene nivoa ekspresije NTPDaza2 dolazi na istim ćelijama.



Slika 19. Imunohistohemijaska lokalizacija NTPDaza2 u KM tokom EAE. Mikrografije malog uvećanja prikazuju lokalizaciju NTPDaza2 enzima na presecima kičmene moždine u Fk i tokom EAE. Skala veličine: 200 μ m. Mikrografije velikog uvećanja načinjene su u regionima oivičenim crnim pravougaonicima na mikrografijama malog uvećanja u beloj (a, c, e, g) i sivoj masi (b, d, f, h). Skala veličine 20 μ m (a).

Tokom neuroinflamacije, astrociti podležu značajnim morfološkim i funkcionalnim promenama i počinju da eksprimiraju brojne molekule, uključujući i intermedijarni filament nestin. Stoga je u daljoj analizi ispitana heterogenost NTPDaza2⁺ astrocita u pogledu ekspresije nestina tokom EAE.



Slika 20. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima astrocita. Reprezentativne mikrografije prikazuju kolokalizaciju NTPDaza2⁺ (crvena fluorescencija) sa GFAP⁺ (zelena fluorescencija) (a), odnosno sa nestin⁺ (zelena fluorescencija) (b) ćelijskim elementima u beloj (bm) i sivoj masi (sm) KM u FK i tokom EAE. Jedra ćelija obojena su Hoechst bojom (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μm. Kvantifikacija GFAP⁺ (zeleni stubići) i GFAP⁺NTPDaza2⁺ (narandžasti stubići) (c), odnosno NTPDaza2⁺ (crveni stubići), Nestin⁺ (zeleni stubići) i NTPDaza2⁺Nestin⁺ (narandžasti stubići) ćelijskih nastavaka (d). Na grafiku su prikazane srednje vrednosti procenta (%) u odnosu na ukupan broj obeleženih nastavaka (± SEM) dobijene za najmanje 6 preseka za 3 životinje za svaku eksperimentalnu grupu. Nivoi statističke značajnosti: *p < 0.05 i **p < 0.001, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test.

Reprezentativne mikrografije dvostrukog NTPDaza2/nestin imunofluorescentnog obeležavanja prikazane su na Slici 20b. U kontrolnim uslovima, nestin imunofluorescentni signal se retko se uočava na fibroznim elementima i delimično se preklapa sa GFAP fluorescentnim signalom (rezultati nisu prikazani). Tokom EAE, na mikrografijama je vidljiv porast intenziteta nestin⁺ fluorescentnog signala. U beloj masi uočava se porast broja nestin⁺ nastavaka, kao i broja dvostruko obeleženih NTPDaza2⁺nestin⁺ nastavaka. U sivoj masi, nestin⁺ imunofluorescenca uočava se u ćelijama ovalnog oblika, kao i vretenastog sa višestrukim radijalno orijentisanim nastavcima koje ne ekspimiraju NTPDaza2. Kvantifikacija broja nastavaka obeleženih na NTPDaza2, nestin ili oba u kontrolnim presecima i tokom EAE prikazana je na Slici 20d. U kontrolnim presecima, u beloj masi je uočeno približno 70% NTPDaza2⁺ nastavaka, 5% nestin⁺ nastavaka i 20% dvostruko obeleženih NTPDaza2⁺nestin⁺ nastavaka. U Ev, procenat nastavaka koji pokazuju samo nestin⁺ imunoreaktivnost iznosio je približno 40%, a dvostruko obeleženih NTPDaza2⁺nestin⁺ 30%. U završnoj fazi bolesti, približno 15% fibroznih elemenata u beloj masi pokazivalo je NTPDaza2⁺ imunoreaktivnost, dok su preostali nastavci bili ili NTPDaza2⁺nestin⁺ ili nestin⁺.

1.6.3. Kolokalizacija NTPDaza2 enzima sa markerima mikroglije/makrofaga

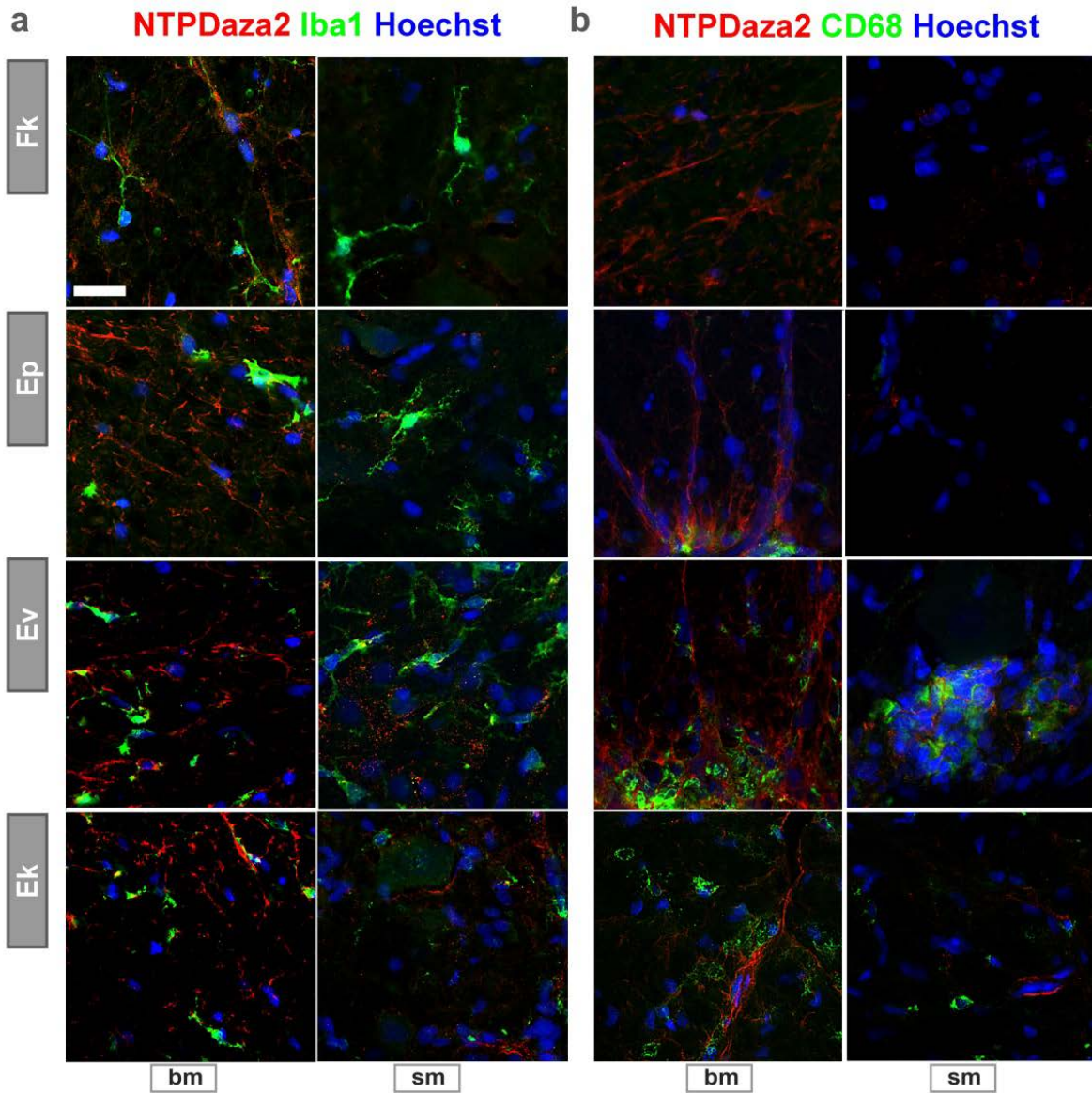
S obzirom na značaj mikroglije/makrofaga u neuroinflamaciji tokom EAE, u daljoj analizi ispitana je ekspresija NTPDaza2 na ovim ćelijama uz pomoć specifičnih markera - Iba1 i CD68. Dvostruko NTPDaza2/Iba1 (Slika 21a), kao i NTPDaza2/CD68 imunofluorescentno obeležavanje (Slika 21b) pokazalo je odsustvo kolokalizacije NTPDaza2 sa oba markera mikroglije/makrofaga i u fiziološkim uslovima i tokom bolesti. Ovi rezultati jasno ukazuju da se NTPDaza2 ne ekspimirira ni na mirujućoj ni na aktiviranoj mikrogliji. Međutim, CD68 signal je često uočen u neposrednoj blizini NTPDaza2⁺ nastavaka, posebno na vrhuncu simptoma.

1.6.4. Kolokalizacija NTPDaza2 enzima sa CD4 markerom limfocita

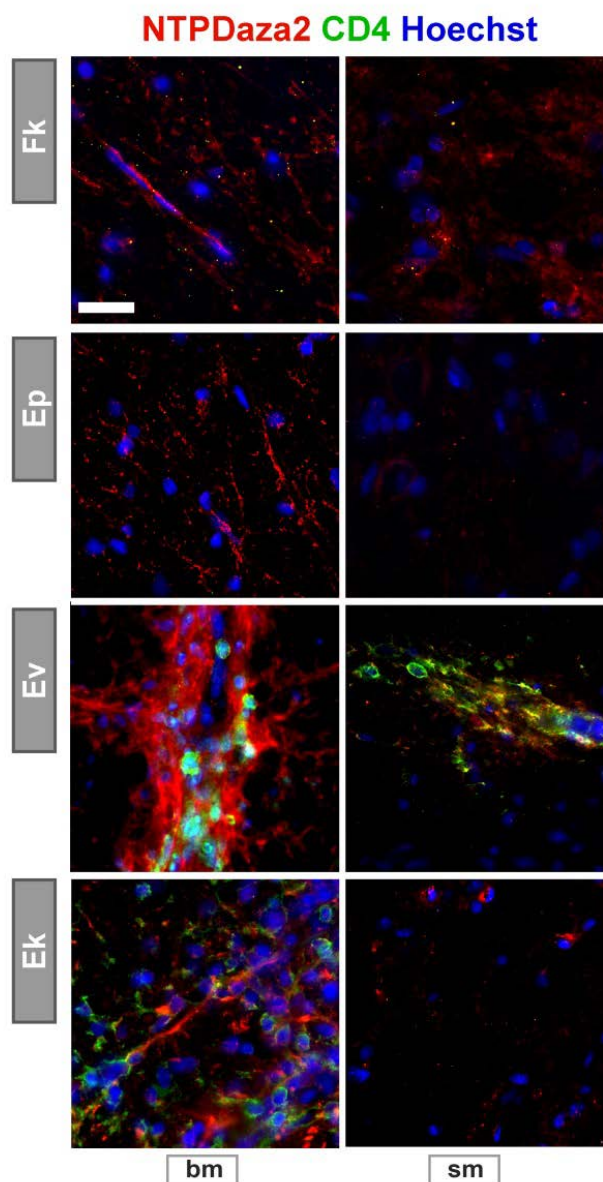
Kako literaturni podaci pokazuju da ključnu ulogu u pokretanju i razvoju EAE igraju CD4⁺ T-limfociti čiju aktivnost moduliše purinska signalizacija, dalje je ispitana koekspresija CD4 markera T-limfocita sa NTPDaza2 tokom EAE (Slika 22). Kolokalizacija NTPDaza2 i CD4 fluorescentnog signala nije uočena ni u parenhimu, niti na nivou infiltrata tokom EAE. Međutim, u Ev NTPDaza2⁺ nastavci često se uočavaju u neposrednoj blizini CD4⁺ ćelijskih infiltrata.

1.6.5. Kolokalizacija NTPDaza2 sa markerima drugih ćelija CNS

U pogledu kolokalizacije sa markerima različitih stadijuma zrelosti oligodendrocita, nije uočena koekspresija NTPDaza2 i markera oligodendrocitnih progenitorskih ćelija (NG2), premijelinizujućih oligodendrocita (O4), kao ni zrelih oligodendrocita, odnosno mijelina (MBP) (rezultati nisu prikazani). Takođe, dvostruko imunofluorescentno obeležavanje pokazalo je odsustvo kolokalizacije NTPDaza2 i markera neurona (NF-H) (rezultati nisu prikazani), što ukazuje da u kičmenoj moždini NTPDaza2 nije ekspimirana ni u fiziološkim uslovima niti tokom EAE ni na jednom od pomenutih tipova ćelija.



Slika 21. Kolokalizacija NTPDaza2 enzima sa markerima mikroglije i makrofaga dvostrukim imunofluorescentnim obeležavanjem u KM tokom EAE. Reprezentativne mikrografije prikazuju odsustvo kolokalizacije NTPDaza2 (crvena fluorescenca) i markera mikroglije/makrofaga Iba1 (zelena fluorescenca) (a), odnosno markera aktivirane mikroglije/makrofaga CD68 (zelena fluorescenca) (b) u beloj (bm) i sivoj masi (sm) KM u kontroli i tokom EAE. Jedra ćelija obojena su Hoechst bojom (plava fluorescenca).. Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m.

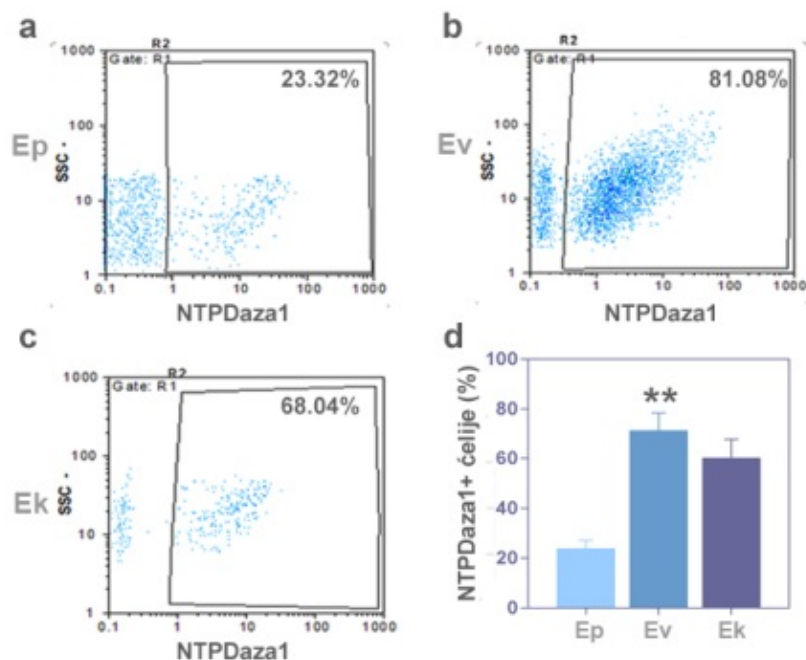


Slika 22. Kolokalizacija NTPDaza2 sa CD4⁺ limfocitima u KM tokom EAE. Reprezentativne mikrografije prikazuju infiltrirane CD4⁺ i CD4⁻ ćelije tokom EAE. CD4⁺ ćelije (zeleno fluorescenca) koje su prisutne u Ev su okružene NTPDaza2⁺ elementima dok kolokalizacija nije uočena. Jedra ćelija obojena su Hoechst bojom (plava fluorescenca). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μm.

1.7. Ekspresija ektonukleotidaza na ćelijama mononuklearnih infiltrata

1.7.1. NTPDaza1/CD39 na ćelijama mononuklearnih infiltrata

Imajući u vidu značajnu ulogu infiltriranih ćelija iz krvi u patogenezi EAE, kao i njihovu prethodno pokazanu ekspresiju NTPDaza1/CD39, doprinos mononuklearnih ćelijskih infiltrata uočenom porastu ekspresije NTPDaza1/CD39 tokom EAE procenjen je uz pomoć metode protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dijagrami distribucije NTPDaza1⁺ ćelija tokom EAE prikazani su na slikama 23a - c.

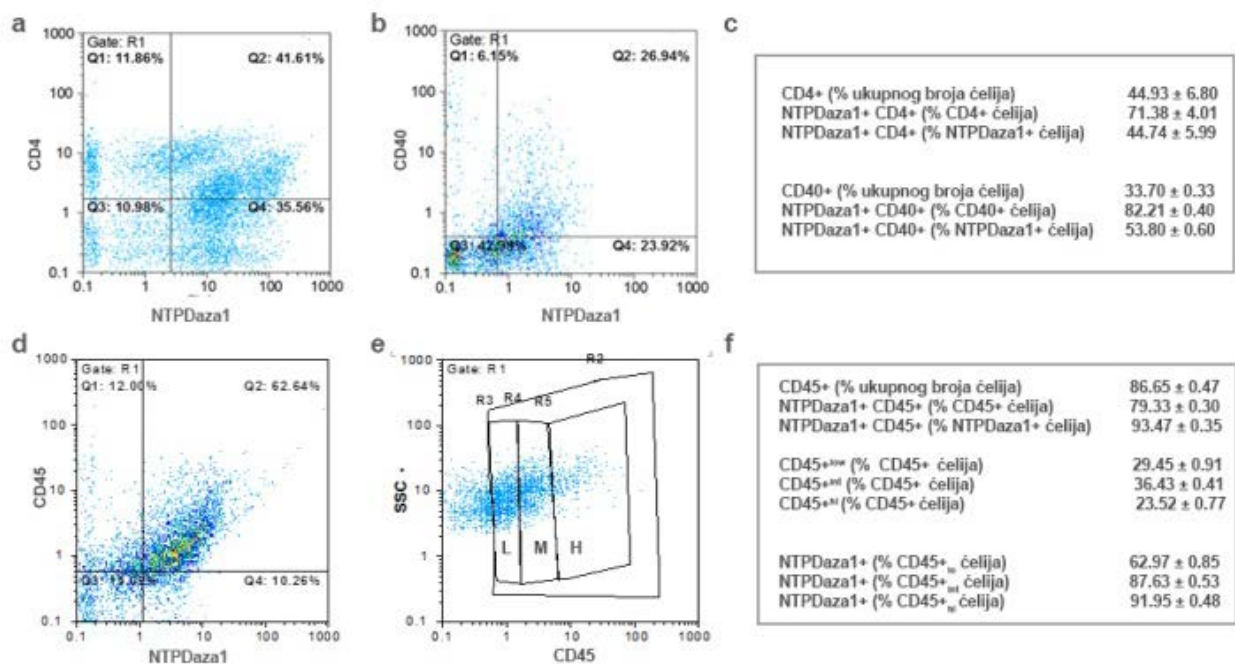


Slika 23. Udeo NTPDaza1⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima izolovanim iz KM tokom EAE. Reprezentativni dijagrami distribucije NTPDaza1⁺ ćelija među mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine u Ep (a), Ev (b) i Ek (d) dobijeni uz pomoć metode protočne citofluorimetrije. Populacija NTPDaza1⁺ ćelija (x-osa) izdvojena je na osnovu parametra ćelijske granularnosti (eng. Side scatter, SSC) prikazanog na y-osi. (d) Grafik predstavlja udeo NTPDaza1⁺ ćelija u mononuklearnim ćelijama infiltrata (%). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti (\pm SEM) dobijene iz 3 životinje po eksperimentalnoj grupi iz 2 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti: ** $p < 0.01$ u odnosu na Ep, Kruskal-Wallis analiza statističke značajnosti uz Dunn *post hoc* test.

Udeo NTPDaza1⁺ ćelija u ukupnoj frakciji izolovanih mononuklearnih ćelija (Slika 23d) najmanji je na početku bolesti, kada nešto više od 20% izolovanih ćelija ekspresira ovaj enzim, dok na vrhuncu bolesti dostiže maksimum sa približno 70% ćelija. Na kraju bolesti, udeo NTPDaza1⁺ niži je u odnosu na vrhunac, ali i dalje visok u poređenju sa Ev i iznosi približno 60%.

1.7.2. Karakterizacija NTPDaza1⁺ ćelija infiltrata na vrhuncu EAE

Dalja analiza podrazumevala je karakterizaciju NTPDaza1⁺ ćelija u okviru izolovane mononuklearne frakcije na vrhuncu bolesti metodom protočne citofluorimetrije uz primenu specifičnih ćelijskih markera imunskih ćelija CD4, CD40 i CD45, a dobijeni reprezentativni dijagrami predstavljeni su na Slici 24a, b i d. U tabeli na Slici 24c prikazan je udeo CD4⁺ (44.93 ± 6.80 %) u ukupnom broju infiltriranih mononuklearnih ćelija, od kojih 71.38 ± 4.01 % ekspresira NTPDaza1. Doprinos NTPDaza1⁺CD4⁺ ukupnom broju NTPDaza1⁺ mononuklearnih ćelija iznosi približno 45%. Budući da CD40 kostimulacioni receptor predstavlja marker aktivirane mikroglije/makrofaga, analiziran je doprinos CD40⁺ ćelija ekspresiji NTPDaza1/CD39 u mononuklearnoj frakciji. Rezultati analize (Slika 24c) pokazuju da CD40⁺ ćelije čine približno trećinu mononuklearne frakcije, od čega približno 80% ekspresira NTPDaza1/CD39. te je udeo ovih ćelija u ukupnom broju NTPDaza1⁺ nešto viši od 50%. Dodatno, kako je ranije pokazano da najveći deo mononuklearne frakcije na vrhuncu EAE čine ćelije hematopoetskog porekla koje su CD45⁺, ispitan je doprinos CD45⁺ ćelija u ekspresiji NTPDaza1/CD39 u Ev.

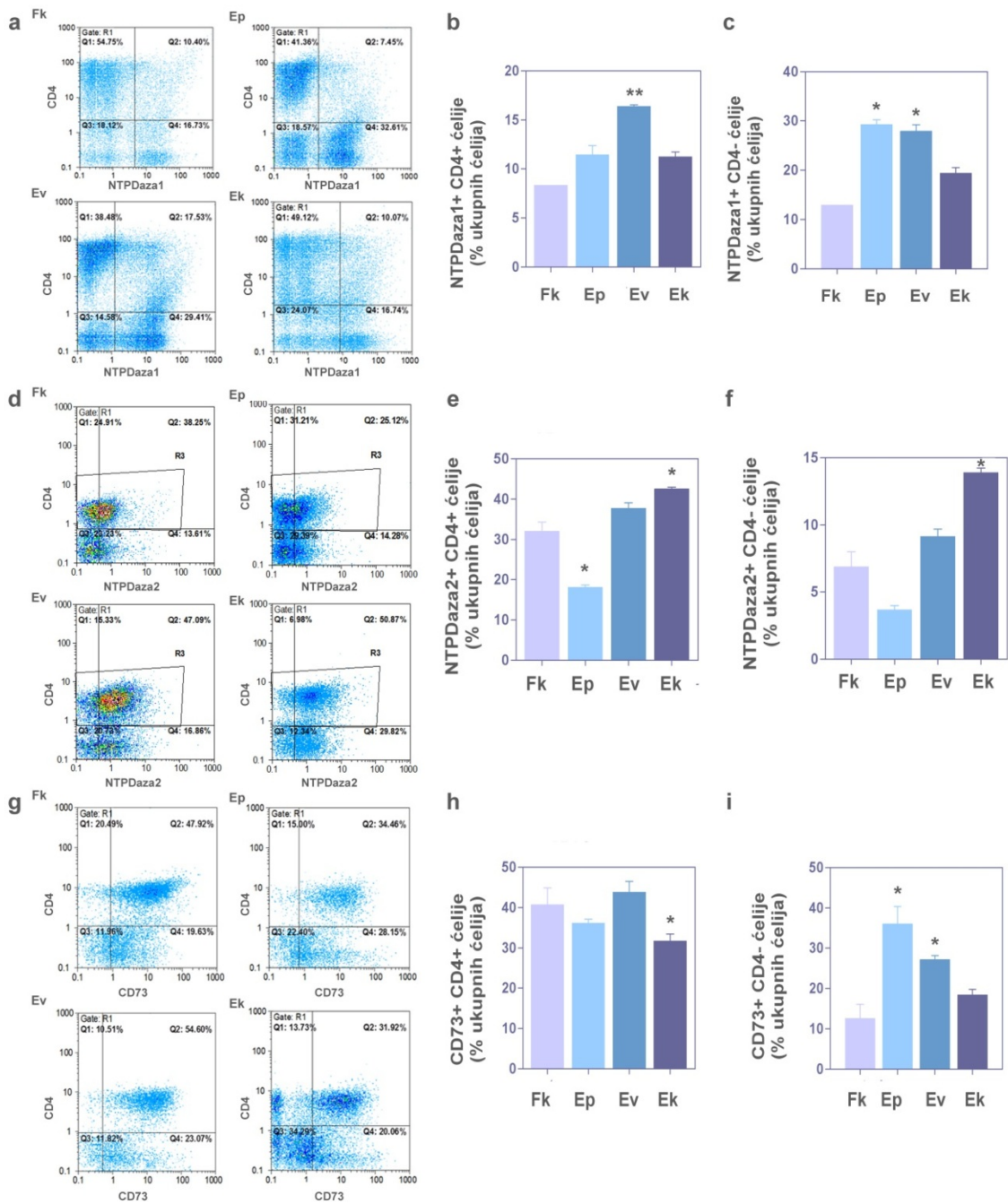


Slika 24. Karakterizacija NTPDaza1⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima tokom EAE metodom protočne citofluorimetrije. (a) Reprerentativni dijagram distribucije NTPDaza1⁺ i CD4⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima. (b) Reprerentativni dijagram distribucije NTPDaza1⁺ i CD40⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima. (c) Tabela prikazuje rezultate protočne citofluorimetrije za udeo NTPDaza1⁺, CD4⁺ i CD40⁺ u vidu srednjih vrednosti (± SEM) za 10 životinja. (d) Reprerentativni dijagram distribucije NTPDaza1⁺ i CD45⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima dobijen metodom protočne citofluorimetrije. (e) Reprerentativni dijagram distribucije CD45⁺ ćelija u mononuklearnim infiltratima sa prikazanim granicama za CD45^{low} (R3), CD45^{int} (R4) i CD45^{hi} (R5). (f) Tabela prikazuje rezultate protočne citofluorimetrije za udeo NTPDaza1⁺ u ukupnoj i zasebnim populacijama CD45⁺ ćelija u vidu srednjih vrednosti (± SEM) za 10 životinja.

Rezultati analize predstavljeni u tabeli na Slici 24f ukazuju da je, u skladu sa literaturom, udeo CD45⁺ ćelija u ukupnom broju infiltriranih ćelija približno 86%, od čega približno 80% čine NTPDaza1⁺CD45⁺ ćelije. Udeo NTPDaza1⁺CD45⁺ ćelija u ukupnom broju NTPDaza1⁺ ćelija je izrazito visok, približno 94%. Dodatna informacija o tipu ćelija koje koeksprimiraju CD45 i NTPDaza1/CD39 dobijena je postavljanjem granica koje razdvajaju ćelije sa niskom (CD45^{low}), srednjom (CD45^{int}) i visokom ekspresijom CD45 (CD45^{hi}) a reprerentativni dijagram korišćen u ovoj analizi prikazan je na Slici 24e. Rezultati ove analize (Slika 24f) pokazali su da približno 29% CD45⁺ ćelija pokazuje nisku ekspresiju CD45 (što ukazuje na mirujuću mikrogliju), 36% srednju (najverovatnije aktivirana mikroglija), a 23% ćelija ima visoku ekspresiju ovog markera (što ukazuje na makrofage, dendritske ćelije ili limfocite). Udeo NTPDaza1⁺ ćelija najniži je u CD45^{low} populaciji ćelija i iznosi približno 63%, dok je u CD45^{int} približno 87, a u CD45^{hi} približno 92%, što ukazuje da je udeo NTPDaza1⁺ ćelija na vrhuncu neuroinflamacije najviši u populaciji koju čine aktivirana mikroglija, makrofagi, dendritske ćelije i limfociti.

1.8. Ekspresija ektonukleotidaza u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora

Drenirajući limfni čvorovi smatraju se mestom početne prezentacije antigena i aktivacije naivnih CD4⁺ T-limfocita čiju aktivnost dodatno modulišu ATP, ADP i adozin.



Slika 25. Udeo NTPDaza1⁺, NTPDaza2⁺ i CD73⁺ ćelija u poplitealnim limfnim čvorovima tokom EAE na CD4⁺ i CD4⁻ ćelijama. Reprezentativni dijagrami distribucije dobijeni metodom protočne citofluorimetrije za udeo NTPDaza1 (a), NTPDaza2 (d) i CD73 (g) u CD4⁺ i CD4⁻ ćeljskoj populaciji u poplitealnim limfnim čvorovima u kontroli i tokom EAE. Udeo NTPDaza1⁺ ćelija prikazan je u populaciji CD4⁺ (b) i CD4⁻ (c) ćelija u vidu srednjih vrednosti (\pm SEM) iz 2 nezavisna eksperimenta. Udeo NTPDaza2⁺ ćelija prikazan je u populaciji CD4⁺ (e) i CD4⁻ (f) ćelija u vidu srednjih vrednosti (\pm SEM) iz 2 nezavisna eksperimenta. CD73⁺ ćelija prikazan je u populaciji CD4⁺ (e) i CD4⁻ (f) ćelija u vidu srednjih vrednosti (\pm SEM) iz 2 nezavisna eksperimenta. Nivoi statističke značajnosti: * $p < 0.05$ i ** $p < 0.001$, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test.

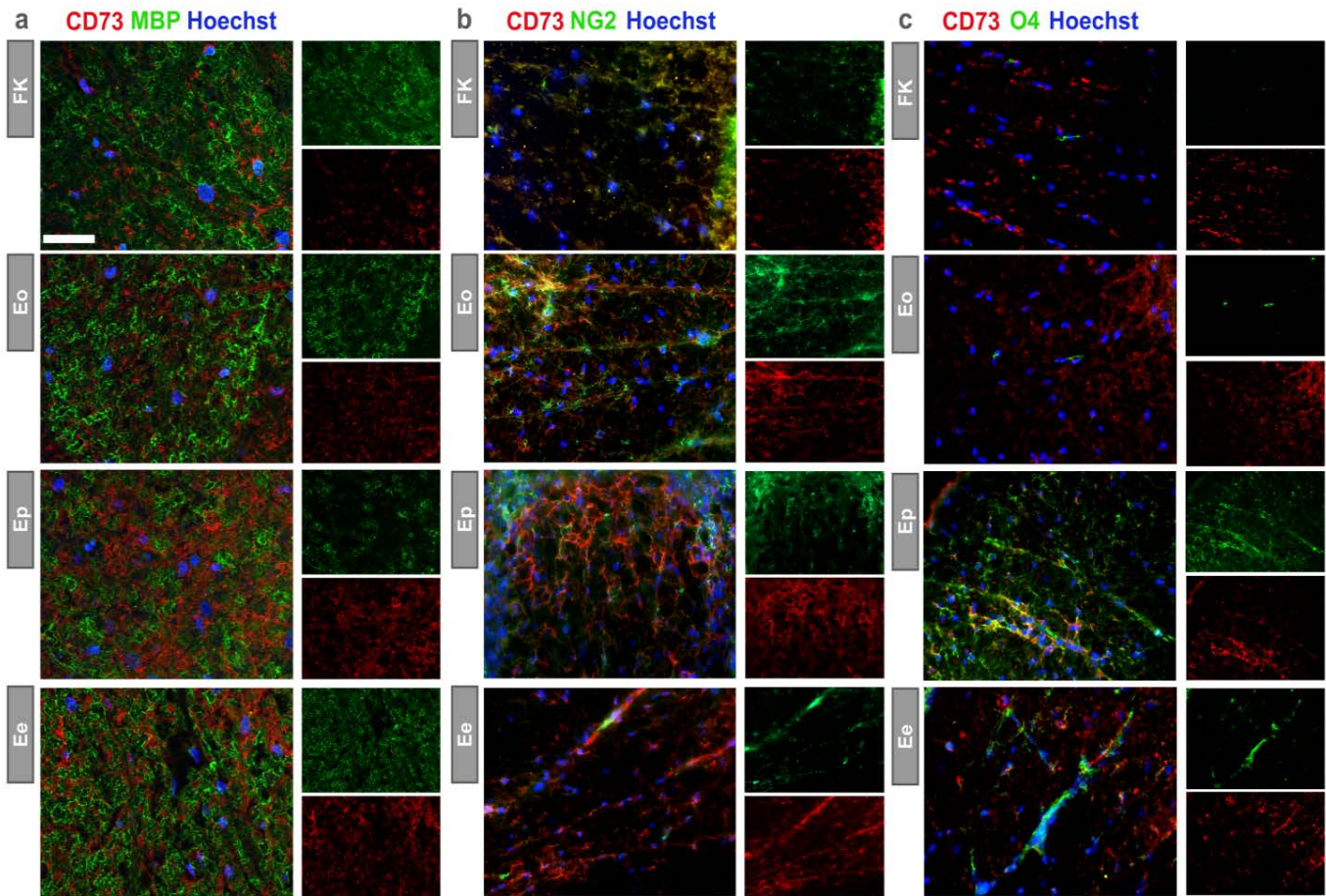
Imajući to u vidu, analizirana je ekspresija NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 na CD4⁺ i CD4⁻ ćelijskoj populaciji poplitealnih limfnih čvorova u fiziološkoj kontroli i tokom EAE. Reprezentativni dijagrami distribucije ćelija imunofluorescentno obeleženih na CD4 i jednu od tri ektonukleotidaze - NTPDaza1/CD39 (Slika 25a), NTPDaza2 (Slika 25d), odnosno eN/CD73 (Slika 25g), dobijeni su metodom protočne citofluorimetrije u kontroli i tokom EAE. U limfnim čvorovima kontrolnih životinja nalazi se približno 62% CD4⁺ T-limfocita, a među njima je manje od 10% NTPDaza1⁺ (Slika 25b), ali više od 30% NTPDaza2⁺ (Slika 25e) i ~40% CD73⁺ (Slika 25h). Na vrhuncu bolesti uočava se značajan porast NTPDaza1⁺CD4⁺ ćelija (preko 20%), što ukazuje na moguću povećanu zastupljenost Treg ćelija u ovoj populaciji. U pogledu zastupljenosti NTPDaza2⁺ ćelija u CD4⁺ populaciji tokom EAE (Slika 25e), na početku bolesti se uočava dvostruko smanjenje udela ovih ćelija u toj populaciji (~15%), povratak na vrednost sličnu kontrolnoj na vrhuncu, a zatim na kraju EAE značajan porast udela ovih ćelija u odnosu na kontrolu (~40%). U pogledu udela CD73⁺ ćelija u CD4⁺ populaciji (Slika 25h) uočava se značajan pad na ~30% na kraju bolesti u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, populacija CD4⁻ ćelija izolovanih iz limfnih čvorova kontrolnih životinja, sadrži preko 10% NTPDaza1⁺ ćelija (Slika 25c), a znatno manji udeo NTPDaza2⁺ (~5%) (Slika 25f) i CD73⁺ (~10%) ćelija u odnosu na CD4⁺ populaciju (Slika 25i). Međutim, u slučaju NTPDaza1⁺CD4⁻ ćelija uočava se značajan porast udela ovih ćelija u ukupnoj CD4⁻ populaciji u Ep (~30%) i Ev (~30%). U pogledu udela NTPDaza2⁺ ćelija u CD4⁻ populaciji ćelija prikazanog na Slici 25f uočava se sličan trend kao u CD4⁺ populaciji ćelija, ali slabije izražen s obzirom na inicijalno manji broj prisutnih NTPDaza2⁺ ćelija u kontroli, tako da se značajni porast udela uočava jedino u Ek (~15%). Na grafiku prikazanom na Slici 25i, uočava se značajan porast udela CD73⁺ ćelija u CD4⁻ populaciji na početku (~40%) i na vrhuncu bolesti (~30%).

2. Ekspresija ektonukleotidaza na ćelijama oligodendrocitne loze

2.1. Kolokalizacija eN/CD73 sa markerima oligodendrocita tokom EAE

Oligodendrociti su ćelije koje tokom EAE trpe najveća oštećenja i koje su izuzetno osetljive na povećane vanćelijske koncentracije kako ATP tako i adenzina. U prethodno prikazanim rezultatima nije pokazana ekspresija NTPDaza1/CD39 i NTPDaza2 u oligodendrocitima već prevashodno u ostalim glijskim ćelijama – mikrogliji i astrocitima. S druge strane, ranije je pokazano da se eN/CD73 eksprimira na astrocitima u kičmenoj moždini tokom EAE, dok njegova ekspresija na ćelijama oligodendrocitne linije nije ispitivana. U tom smislu, u daljoj analizi ispitano je da li se eN/CD73 kao glavni regulator nivoa adenzina u vanćelijskoj sredini CNS eksprimira i na oligodendrocitima, odnosno na njihovim prekursorima, koji su od ključnog značaja za proces remijelinizacije u MS/EAE. Stoga, urađena su dvostruka imunofluorescentna obeležavanja antitelima specifičnim za različite diferencijalne stadijume ćelija oligodendrocitne loze i eN/CD73, a reprezentativne mikrografije bele mase kičmene moždine u Fk i tokom EAE prikazane su na Slici 26. Kolokalizacija eN/CD73 i markera zrelih oligodendrocita MBP nije prisutna ni u kontrolnim presecima ni tokom EAE (Slika 26a), dok je delimična kolokalizacija ovog enzima i markera OPĆ NG2 uočena kako u Fk, tako i tokom EAE (Slika 26b).

Takođe, uočena je i delimična kolokalizacija eN/CD73 i markera premijelinizujućih oligodendrocita O4 u svakoj od faza EAE (Slika 26c). Ovi rezultati pružili su osnov za dalju analizu ekspresije eN/CD73 na ćelijskoj liniji OPĆ miša Oli-neu i funkcionalnog značaja tog enzima na prekursorskim ćelijama u uslovima neuroinflamacije.



Slika 26. Kolokalizacija eN/CD73 sa markerima mijelinizujućih oligodendrocita, OPC i nezrelih oligodendrocita. Reprezentativne mikrografije dobijene su imunofluorescentnim obeležavanjem eN/CD73 (crvena fluorescenca) i markera mijelinizujućih oligodendrocita mijelin baznog proteina - MBP (a), markera nezrelih glijskih ćelija NG2 (b), odnosno nezrelih oligodendrocita O4 (c) (zeleno fluorescenca) u beloj masi KM u kontroli i tokom EAE. Jedra ćelija obojena su Hoechst bojom (plava fluorescenca). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μ m.

2.2. Uticaj proinflamacijskih faktora na preživljavanje, proliferaciju i smrt Oli-neu oligodendrocitnih progenitorskih ćelija

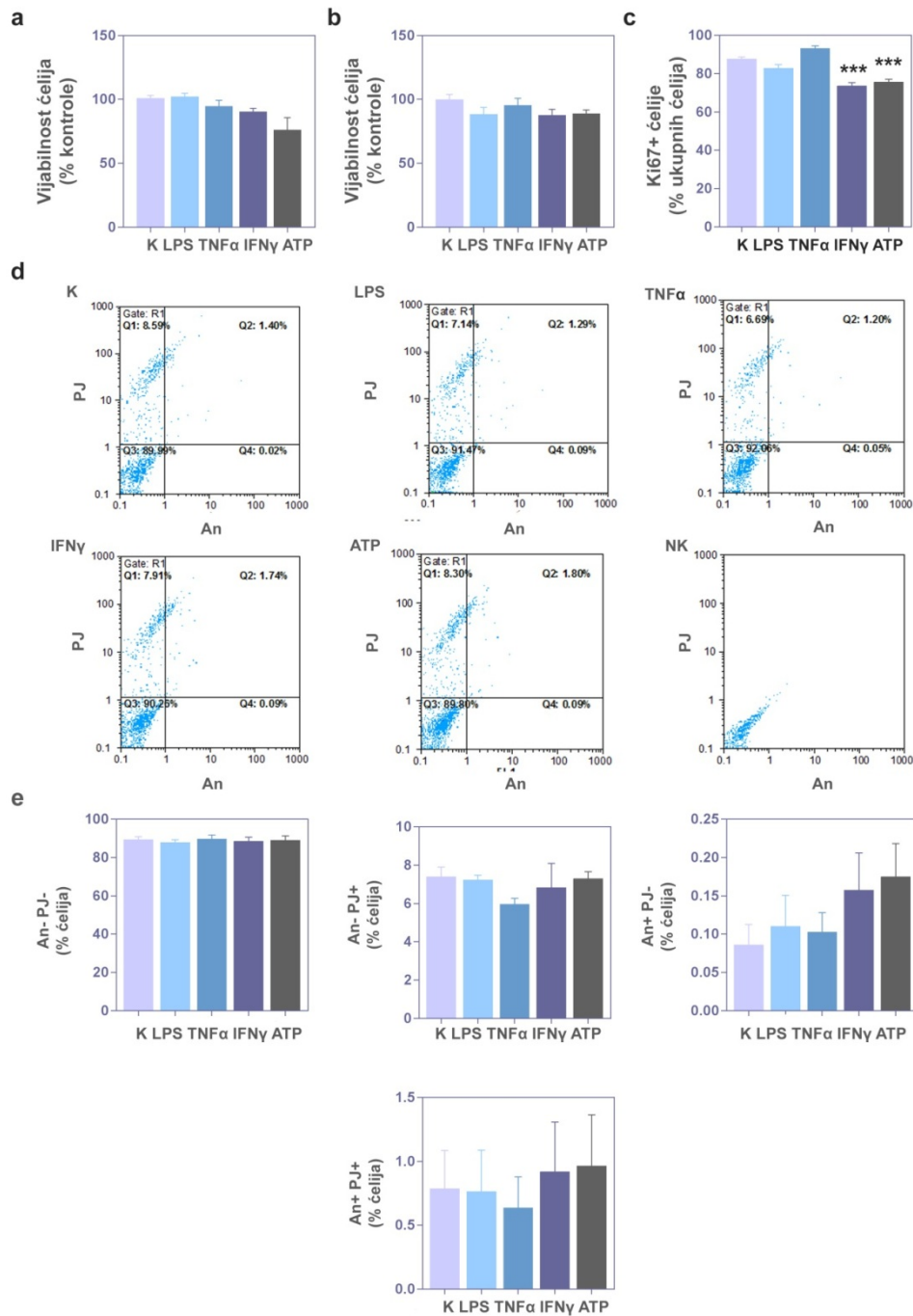
Poznato je da oligodendrocitne progenitorske ćelije imaju ključnu ulogu u procesu remijelinizacije i oporavku u MS/EAE patologiji. U cilju karakterizacije oligodendrocitne progenitorske ćelijske linije Oli-neu, a u kontekstu neuroinflamacije i negativnog dejstva proinflamacijskih faktora na vijabilnost ćelija oligodendrocitne loze u MS/EAE, analiziran je uticaj LPS i glavnih proinflamacijskih faktora uključenih u neuroinflamaciju tokom EAE - $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ i ATP na Oli-neu ćelije. Za ove faktore poznato je da ostvaruju uticaj na parametre ćelijske vijabilnosti, proliferacije i smrti oligodendrocita. Metode korišćene za procenu vijabilnosti Oli-neu ćelija pod uticajem pomenutih proinflamacijskih faktora - CTB (Slika 27a) i MTT esej (Slika 27b), pokazale su odsustvo statistički značajnog uticaja ispitivanih proinflamacijskih faktora na preživljavanje ćelija u datim koncentracijama, iako se pod dejstvom $IFN\gamma$ i ATP uočava izvesno smanjenje broja ćelija u odnosu na kontrolu. S obzirom na dobijeni rezultat, dalje je ispitivan uticaj ovih faktora na proliferaciju ćelija uz pomoć fluorescentnog imunocitohemijskog obeležavanja markera proliferacije ćelija Ki67. Ti

rezultati pokazali su smanjenje procenta proliferišućih ćelija pod dejstvom $\text{IFN}\gamma$ (73.64 ± 1.76) i ATP (75.59 ± 1.54) u odnosu na kontrolu (87.59 ± 1.08) (Slika 27c), što može predstavljati uzrok prethodno uočenog trenda smanjenja vijabilnosti nakon primene ova dva faktora. Iako bez statističke značajnosti, uočen trend smanjenja vijabilnosti pod dejstvom $\text{IFN}\gamma$ i ATP indikovao je i dodatnu analizu tipa ćelijske smrti. U tom cilju, ćelije su obeležavane Aneksinom V kao markerom rane apoptoze i propidijum jodidom kao markerom kasne apoptoze i nekroze, a potom analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Na Slici 27d prikazani su reprezentativni dijagrami dobijeni za kontrolu i tretmane proinflamacijskim faktorima, kao i za neobojenu kontrolu (NK) kao potvrdu tehničke ispravnosti metode. Na slici 27e prikazani su grafici dobijeni analizom rezultata ovog bojenja za An^-PJ^- , An^-PJ^+ , An^+PJ^- i An^+PJ^+ populacija ćelija. Ovi rezultati pokazali su pre svega da An^-PJ^- ćelije čine ~90% ukupnog broja ćelija nezavisno od primenjenog tretmana. Najveći deo preostalih ćelija - približno 7% čine An^-PJ^+ nekrotične ćelije koje su takođe u jednakoj meri zastupljene u kontroli i u svim tretiranim grupama. Pored toga, u pogledu ostalih kategorija ćelija čija je zastupljenost zanemarljivo mala u poređenju sa An^-PJ^- nije bilo statistički značajnih razlika među eksperimentalnim grupama. što je dodatno potvrdilo da primenjeni faktori nisu imali citotoksičan efekat.

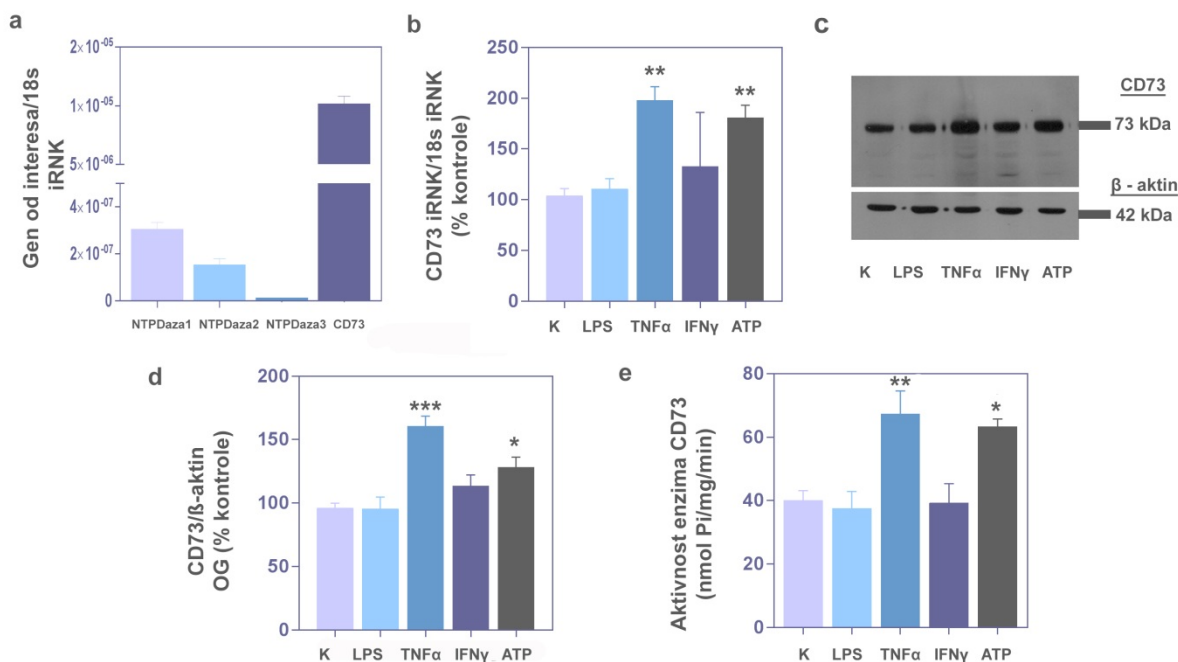
2.3. Uticaj proinflamacijskih faktora na ekspresiju i aktivnost eN/CD73 u Oli-neu oligodendrocitnim progenitorskim ćelijama

Prethodno prikazani rezultati fluorescentnog imunohistohemijskog obeležavanja na Slici 26 pokazali su delimičnu kolokalizaciju eN/CD73 i markera oligodendrocitnih progenitorskih ćelija NG2 u kičmenoj moždini pacova u Fk i tokom EAE. Oli-neu ćelije oligodendrocitne progenitorske linije miša korišćene u prikazanim eksperimentima ekspimiraju Olig2 i NG2 markere OPC (Prilog 4). Analiza bazalne genske ekspresije glavnih ektonukleotidaza CNS u Oli-neu ćelijama metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pokazala je dominantnu ekspresiju eN/CD73 (Slika 28a) što ukazuje na fiziološki značaj ovog enzima u tim ćelijama. Sve prethodno navedeno pružilo je osnov za analizu uticaja glavnih proinflamacijskih faktora LPS, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ i ATP na ekspresiju i aktivnost eN/CD73 u Oli-neu ćelijskoj liniji. Analiza genske (Slika 28b) i proteinske ekspresije CD73 (Slika 28c, d) pod dejstvom proinflamacijskih faktora pokazala je da su među korišćenim faktorima jedino $\text{TNF}\alpha$ i ATP izazvali značajne promene u odnosu na kontrolu. Naime, $\text{TNF}\alpha$ i ATP su povećali iRNK ekspresiju eN/CD73 približno dva puta (Slika 28b), a proteina približno za 60, odnosno 30% (Slika 28d) u odnosu na kontrolu. U skladu sa efektom na proteinsku ekspresiju, isti faktori su doveli i do porasta AMP-hidrolizujuće aktivnosti u odnosu na 40.06 ± 3.08 nmol Pi/mg/min kod kontrole (Slika 28e) na 67.28 ± 7.34 u slučaju $\text{TNF}\alpha$, odnosno 63.36 ± 2.43 nmol Pi/mg/min kod ATP.

Budući da su OPC i njihov potencijal migracije i diferencijacije veoma značajni za uspešan proces remijelinizacije u MS/EAE, ispitivan je uticaj relevantnih proinflamacijskih faktora na morfologiju Oli-neu ćelija. Pored navedenog, poznato je i da eN/CD73 ima ulogu u adheziji i migraciji određenih ćelijskih tipova. Na Slici 29a prikazan je grafik zavisnosti veličine ćelija od tretmana proinflamacijskim faktorima dobijen analizom površine ćelija nakon fluorescentnog bojenja F-aktinom (rezultati nisu prikazani). Uočeno je značajno povećanje veličine Oli-neu ćelija u odnosu na kontrolu pod dejstvom tri proinflamacijska faktora: $\text{TNF}\alpha$ (~20%), $\text{IFN}\gamma$ (~50%) i ATP (~50%). Na Slici 29b prikazan je procenat ćelija bez nastavaka, odnosno sa 1, 2, 3, 4 ili više nastavaka u kontrolnoj grupi, kao i pod dejstvom inflamacijskih faktora. U kontrolnim uslovima, najveći procenat ćelija nema nastavke (~65%), 10% ćelija ima jedan nastavak, 20% dva i približno 5% tri, dok ćelija sa četiri i više nastavaka

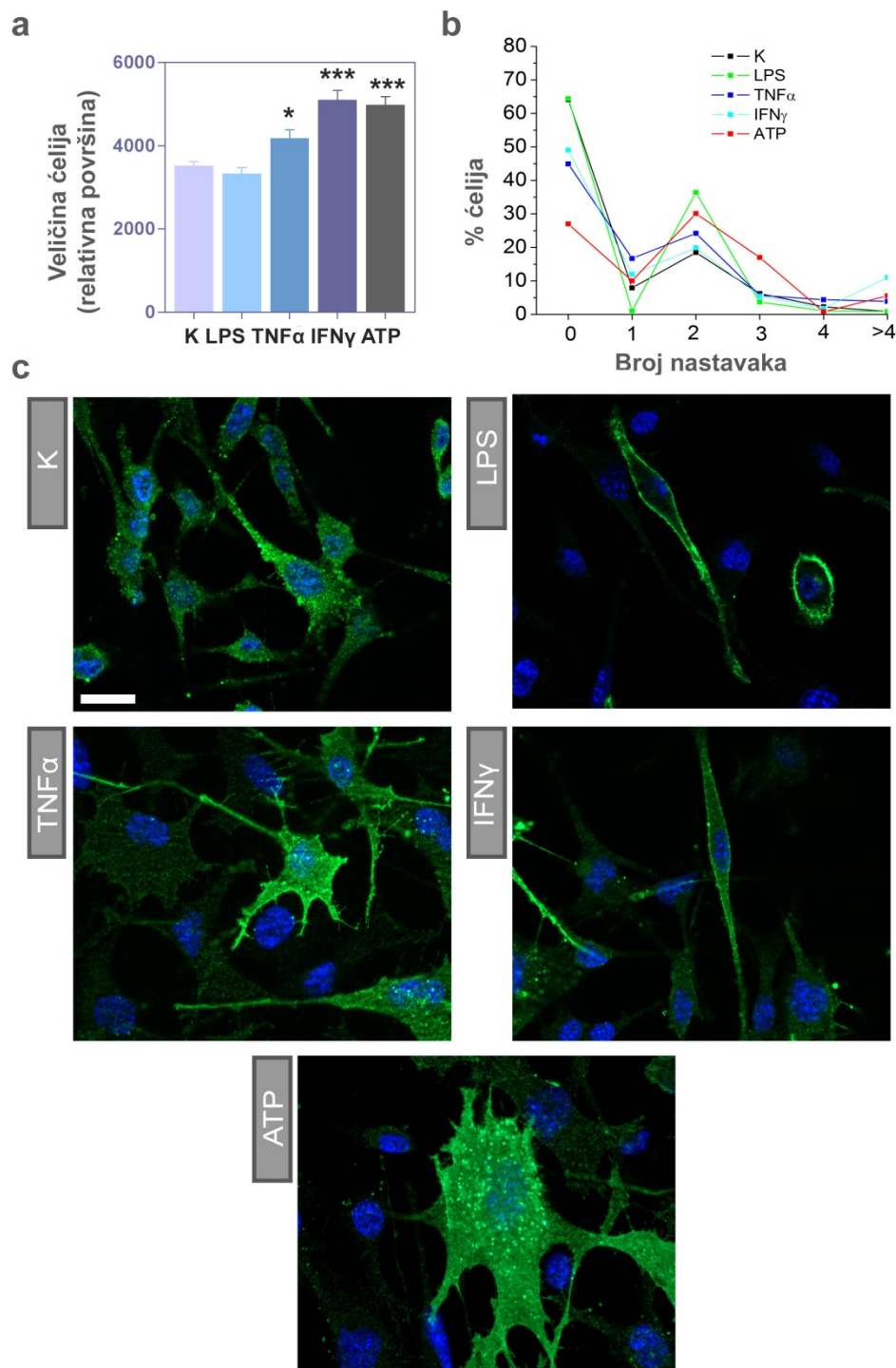


Slika 27. Uticaj proinflamacijskih faktora na preživljavanje, proliferaciju i smrt Oli-neu ćelija. Metoda Cell Titer Blue (a) i MTT metoda (b) pokazale su odsustvo uticaja proinflamacijskih faktora na vijabilnost Oli-neu ćelija. (c) Uticaj proinflamacijskih faktora na proliferaciju ćelija dobijen određivanjem broja Ki67⁺ ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija po mikrografiji. (d) Reprerzentativni grafici distribucije signala pod dejstvom proinflamacijskih faktora dobijeni analizom ćelijske smrti Aneksin V i propidijum jodid bojenjem i protočnom citofluorimetrijom. (e) Grafici uticaja proinflamacijskih faktora na različite tipove ćelijske smrti kod Oli-neu ćelija. Nivoi značajnosti: *p<0.05 i ***p<0.001, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test.



Slika 28. Uticaj proinflamacijskih faktora na ekspresiju eN/CD73 kod Oli-neu ćelija na genskom i proteinskom nivou. (a) Bazalna ekspresija odabranih ektonukleotidaza Oli-neu ćelija. (b) Ekspresija eN/CD73 na genskom nivou pod dejstvom proinflamacijskih faktora. (c) Reprerativni radiografski filmovi prikazuju hemiluminiscencom vizuelizovane trake koje odgovaraju eN/CD73. (d) Kvantifikacija ekspresije eN/CD73 na proteinskom nivou pod dejstvom proinflamacijskih faktora. (e) Aktivnost eN/CD73 po dejstvom proinflamacijskih faktora. Nivo značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.0001$, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test.

nema. Uočeno je da svi proinflamacijski faktori povećavaju broj nastavaka Oli-neu ćelija. LPS ne utiče na broj ćelija bez nastavaka (~65%), smanjuje broj unipolarnih ćelija na 0%, a povećava broj bipolarnih ćelija (~40%), tripolarnih ćelija ima nešto manje od 5%, dok ćelija sa više nastavaka nema. TNF α smanjuje udeo ćelija bez nastavaka u odnosu na kontrolu (~45%), povećava broj ćelija sa jednim nastavkom (~15%), kao i broj ćelija sa dva nastavka (~25%), ali je prisutan i nizak procenat ćelija sa tri, četiri i više nastavaka (~5%). IFN γ takođe smanjuje udeo ćelija bez nastavaka (~50%), udeo ćelija sa jednim nastavkom je sličan kontroli, kao i udeo ćelija sa dva i tri nastavka, dok se jasno uočava povećanje udela ćelija sa više od četiri nastavka koji iznosi oko 10%. Uticaj ATP ogleda se u drastičnom smanjenju udela ćelija bez nastavaka (~25%), dok u pogledu udela unipolarnih ćelija nema uticaja. Udeo bi- i tripolarnih ćelija se povećava pod dejstvom ATP do ~35 i ~20%. Udeo ćelija sa četiri nastavka je jednak nuli, a povećava se udeo ćelija sa više od četiri nastavka (~5%). Na Slici 29c prikazane su reprezentativne mikrofografije eN/CD73 imunofluorescentno obeleženih Oli-neu ćelija nakon izlaganja dejstvu proinflamacijskih faktora. Na njima se, u skladu sa prethodnom analizom pored povećanja ekspresije eN/CD73 pod dejstvom TNF α i ATP uočava i uticaj proinflamacijskih faktora na veličinu i broj nastavaka ćelija. Sve navedeno ukazuje na diferencijalni uticaj inflamacijskih faktora na morfologiju Oli-neu ćelija i njihovu ekspresiju eN/CD73, što može imati uticaja na potencijal diferencijacije i migracije ovih ćelija.



Slika 29. Uticaj proinflamacijskih faktora na morfologiju Oli-neu ćelija i ekspresiju eN/CD73. (a) Promena veličine ćelija pod dejstvom proinflamacijskih faktora. Ispitivanje veličine ćelija urađeno je u programu ImageJ®. Nivo značajnosti: * $p < 0.05$ i *** $p < 0.0001$, ANOVA sa jednim faktorom uz Dunnett *post hoc* test. (b) Promena broja ćelijskih nastavaka pod dejstvom proinflamacijskih faktora. (c) Reprezentativne mikrografije dobijene imunocitohemijskim obeležavanjem eN/CD73 (zelena fluorescencija) Oli-neu ćelija u kontrolnim uslovima i pod dejstvom proinflamacijskih faktora LPS, TNF α , IFN γ i ATP. Jedra ćelija obojena su DAPI bojom (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μm .

V DISKUSIJA

Multipla skleroza je hronična inflamacijska bolest CNS složene etiologije koja podrazumeva sadejstvo genetičkih i sredinskih faktora i pogađa prvenstveno radno sposobno stanovništvo. Zbog toga ova bolest ima veliki negativni zdravstveni i socioekonomski uticaj, prvenstveno na populacije ljudi kavkaskog tipa koji naseljavaju Evropu i Severnu Ameriku (Wootla *i sar.* 2012, Bjelobaba *i sar.* 2017, Lassmann 2018). Iako je bolest otkrivena sredinom 19. veka, lek za nju još uvek nije pronađen, premda su u primeni terapeutici koji ublažavaju simptome i modifikuju tok bolesti (Bjelobaba *i sar.* 2017). Stoga su istraživanja na adekvatnom model sistemu za ovu bolest od velikog značaja kako za rasvetljavanje patogeneze i mehanizma bolesti, tako i za otkriće novih terapeutika.

EAE je najbolje okarakterisan i najčešće upotrebljavan model MS (Constantinescu *i sar.* 2011) koji i pored određenih nedostataka u najvećoj meri odslikava kliničke i patološke karakteristike humane bolesti u odnosu na sve ostale modele (Baker & Amor 2014, Bjelobaba *i sar.* 2017, Van der Star *i sar.* 2012). U ovoj disertaciji, u skladu sa prethodno objavljenim studijama, pokazano je da pacovi DA soja nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine i CFA razvijaju akutni monofazni EAE sa spontanom oporavkom (Lavrnja *i sar.* 2009, Lavrnja *i sar.* 2015). Postoji više razloga za podložnost izazivanju EAE kod pacova DA soja – pre svega, ovaj soj se odlikuje visokom endogenom produkcijom IL-2, IFN γ , IL-17 i IL-6 (Lalic *i sar.* 1991) što ih čini podložnim za razvoj autoimunskih bolesti posredovanih Th1 i Th17 imunskim odgovorom (Arsov *i sar.* 1994, Markovic *i sar.* 2009, Momcilović *i sar.* 2012). Pored toga, DA pacovi imaju nisku bazalnu ekspresiju CXCL12 u CNS koji ograničava infiltraciju imunskih ćelija, što takođe povećava podložnost ovog soja razvoju EAE (Petkovic *i sar.* 2013). Takođe, nedavno je pokazano da je i mikrobiota creva ovih pacova relativno niskog diverziteta i visoke nestabilnosti (Stanisavljevic *i sar.* 2019) što doprinosi neadekvatnoj regulaciji imunskog odgovora. Izvesne razlike u pojavi i toku EAE pokazane se kod pacova DA soja različite starosti ili pola (Nacka-Aleksic *i sar.* 2015, Dimitrijevic *i sar.* 2017, Stojic-Vukanic *i sar.* 2018). Naime, prilikom indukcije EAE kod ženki je veća incidenca, a simptomi umereniji u odnosu na mužjake (Nacka-Aleksic *i sar.* 2015), što je takođe pokazatelj dobro odabranog modela za MS, budući da žene dva do tri puta češće oboljevaju od ove bolesti, ali muškarcima razvijaju teže simptome (Sadovnick 2013, Ascherio & Munger 2016). Iako u pilot eksperimentima koji su prethodili ovoj disertaciji nije utvrđena značajna razlika u bazalnoj ekspresiji glavnih komponenti purinske signalizacije kod ženki i mužjaka (rezultati nisu prikazani), eksperimenti u okviru ove disertacije rađeni su isključivo na ženkama iste starosti u cilju izbegavanja različitog tumačenja rezultata usled polnog dimorfizma.

Tokom EAE se, kao i u MS, uočavaju karakteristične histopatološke promene u CNS: inflamacija sa infiltracijom imunskih ćelija, astrogliaza, mikroglioza, demijelinizacija, kao i oštećenje aksona (McQualter & Bernard 2007, Lassmann 2018), koje su pokazane i u ovom istraživanju. Akumulacija imunskih ćelija između ovojnica CNS prethodi inflamaciji, a zatim dolazi do ključnog događaja u nastanku i progresiji MS/EAE patologije - infiltracije encefalitogenih T-limfocita zajedno sa drugim imunskim ćelijama iz krvi u CNS (Kierdorf *i sar.* 2019). Nakon prodora u CNS u kontaktu sa rezidentnim fagocitima dolazi do reaktivacije T-limfocita koji kroz lokalno oslobađanje citokina otpočinju inflamaciju (Miljkovic *i sar.* 2011, Mundt *i sar.* 2019). Saglasno ranije objavljenim rezultatima (Lavrnja *i sar.* 2009), kvantifikacija infiltrata imunskih ćelija u lumbosakralnom regionu kičmene moždine u ovoj disertaciji potvrdila je da se pojava prvih simptoma EAE podudara sa

početkom infiltracije imunskih ćelija, a da do pogoršanja simptoma dolazi paralelno sa porastom broja infiltriranih ćelija, kao i da se broj ovih ćelija smanjuje na minimum po okončanju simptoma. Ujedno, u skladu sa nalazima ranijih studija, najveći gubitak mijelina i oštećenje neurita podudarili su se sa prisustvom najmasivnijih infiltrata na vrhuncu simptoma (Lavrnja *i sar.* 2009, Wekerle & Sun 2010). Oštećenje aksona se u MS/EAE može javiti kao posledica demijelinizacije, ali i nezavisno od nje (Haines *i sar.* 2011). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su u svim vremenskim tačkama tokom EAE u kičmenoj moždini na mestima perivaskularnih infiltrata ili u njihovoj neposrednoj blizini vidljivu hipertrofiju ćelijskih tela astrocita, praćenu skraćivanjem i zadebljavanjem nastavaka, što ukazuje na astrogliozu, kao jednu od glavnih histopatoloških karakteristika MS/EAE (Bannerman *i sar.* 2007). Pored hipertrofije, gliotični astrociti povećavaju ekspresiju intermedijarnih filamenata, pre svega GFAP, ali i vimentina i nestina (Sofroniew 2015), što je takođe vidljivo sa prikazanih mikrografija, a tako aktivirani astrociti mogu imati dvojaku ulogu u neuroinflamaciji (Liddelov & Barres 2017). Dodatno, tokom EAE u ovom istraživanju došlo je i do aktivacije mikroglije vidljive po karakterističnim promenama morfologije Iba1⁺ ćelija iz ramifikovane forme prisutne u kontroli u ameboidnu formu vidljivu na vrhuncu bolesti (Ransohoff 2007). Kao i kod astrocita, aktivacija mikroglije može imati dvojaku ulogu, te u zavisnosti od inflamacijskog fenotipa dominantno prisutnog u populaciji ovih ćelija može pogoršati ili ublažiti prisutnu neuroinflamaciju (Ransohoff 2016). Zajedno, model akutnog monofaznog EAE korišćen u eksperimentima urađenim u okviru ove disertacije odlikuje se tipičnim histopatološkim karakteristikama MS - infiltracijom ćelija imunskog sistema koja je praćena gliozom, demijelinizacijom i neurodegeneracijom.

Sve više podataka iz literature govori u prilog tome da vanćelijski purinski nukleotidi i nukleozidi imaju važnu ulogu u komunikaciji između neurona i glije, kao i u međusobnoj komunikaciji glijskih ćelija, posebno mikroglije i astrocita, kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima (Fields & Burnstock 2006, Franke *i sar.* 2012, Burnstock 2016, Quintas *i sar.* 2018). ATP se u uslovima neuroinflamacije naglo oslobađa u vanćelijsku sredinu gde u visokim koncentracijama deluje kao signal opasnosti, ostvarujući proinflamacijske efekte kroz aktivaciju mikroglije i astrocita i njihovu sekreciju proinflamacijskih citokina (Abbracchio *i sar.* 2009, Di Virgilio & Vuerich 2015). Nasuprot tome, adenzin koji u vanćelijsku sredinu dospeva uglavnom kao produkt hidrolize ATP (Wall & Dale 2007) ima imunosupresivno i antiinflamacijsko dejstvo inhibirajući aktivnost imunskih ćelija i učestvujući u neuroprotekciji (Di Virgilio & Vuerich 2015, Safarzadeh *i sar.* 2016, Burnstock 2017). Opisane uloge oba nukleotida potvrđene su u brojnim CNS patologijama, uključujući i MS/EAE (Rodrigues *i sar.* 2015).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da tokom EAE dolazi do fazno-specifičnih promena na nivou genske i proteinske ekspresije kod tri glavne ektonukleotidaze CNS - NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73. Uočeni porast ekspresije glavnog ATP- i ADP-hidrolizujućeg enzima NTPDaza1/CD39 zajedno sa glavnim AMP-hidrolizujućim i adenzin-produkujućim enzimom eN/CD73 na vrhuncu EAE, u skladu su sa ranije pokazanim porastom hidrolize ATP, ADP i AMP (Lavrnja *i sar.* 2009), kao i sa pojavom dodatne proteinske trake na imunoblotu kod eN/CD73 u membranskoj frakciji kičmene moždine na vrhuncu bolesti (Lavrnja *i sar.* 2015). Zajednički, dobijene promene ekspresije pomenutih ektonukleotidaza ukazuju na moguće smanjenje nivoa ATP verovatno praćeno porastom adenzina u vanćelijskoj tečnosti CNS i u tom smislu bi mogle imati kritičnu ulogu u modulaciji neuroinflamacije tokom EAE i njenog preusmeravanja u pravcu razrešenja. U prilog mogućih antiinflamacijskih efekata opisanih promena ekspresije ektonukleotidaza u MS/EAE govore i nalazi koji pokazuju da NTPDaza1/CD39 *knock out* životinje spontano razvijaju simptome oboljenja autoimunskog tipa spregnutog sa Th1 imunskim odgovorom (Dwyer *i sar.* 2007),

dok je kod MS pacijenata pokazano smanjeno prisustvo NTPDaza1+ Treg i smanjena regulacija Th17 ćelija (Fletcher *i sar.* 2009). Takođe, pokazano je da transkripcioni faktor Sp1 koji pozitivno reguliše ekspresiju NTPDaza1/CD39 (Eltzschig *i sar.* 2009, Menon *i sar.* 2012) ima centralnu ulogu u MS patologiji kroz modulaciju autoimunskog odgovora, što dodatno govori u prilog značaju NTPDaza1/CD39 u MS/EAE i ukazuje da bi u pokazanom povećanju ekspresije ovog enzima tokom EAE mogao da bude uključen taj transkripcioni faktor. Na značaj eN/CD73 u MS/EAE ukazuje nalaz da *knock out* miševi ne razvijaju simptome EAE i da je ovaj enzim neophodan za ulazak limfocita u CNS kroz endotelnu barijeru (Mills 2008). S druge strane, tandem NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 može samostalno da sprovede kompletnu degradaciju ATP do adenzina, menjajući kao svojevrsni „imunološki prekidač“ proinflamacijsku aktivnost imunskih ćelija u antiinflamacijsku (Antonoli *i sar.* 2013). Dodatno, porast ekspresije NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 mogao bi prema literaturnim nalazima da posredstvom A_{2a} adenzinskog receptora pokrene imunosupresivnu kaskadu događaja koja ostvaruje različite efekte na Th1 i Th2 imunski odgovor (Dwyer *i sar.* 2007). Paralelno sa porastom ekspresije NTPDaza1/CD39 i eN/CD73, u ovoj disertaciji je pokazano da tokom EAE dolazi i do smanjenja ekspresije NTPDaza2. Prema literaturnim podacima promotorski region *Entpd2* gena sadrži dva IL-6 responsivna elementa preko kojih IL-6 suprimira ekspresiju ovog gena (Yu *i sar.* 2008). Pomenuti citokin ostvaruje efekte faktora rasta i diferencijacije Th17 i B-limfocita (Serada *i sar.* 2008) i ima presudnu ulogu u inflamacijskim bolestima CNS, poput MS/EAE (Fujimoto *i sar.* 2008, Janssens *i sar.* 2015). Budući da je poznato da je nivo IL-6 povišen u cerebrospinalnoj tečnosti i plazmi MS pacijenata, kao i u CNS EAE miševa (Savarin *i sar.* 2015), smanjena ekspresija NTPDaza2 tokom EAE pokazana u ovoj disertaciji mogla bi biti izazvana porastom nivoa IL-6 u CNS. Takođe, u skladu sa podacima dobijenim na primarnim astrocitima (Brisevac *i sar.* 2013) uočeno smanjenje ekspresije NTPDaza2 bi dodatno moglo da bude izazvano i porastom citokina TNF α i IFN γ ključnih za MS/EAE (Göbel *i sar.* 2018), čiji porast je ranije pokazan kod ovog EAE modela (Lavrnja *i sar.* 2008). S obzirom da tokom enzimske aktivnosti NTPDaza2 dolazi do nagomilavanja ADP (Kukulski *i sar.* 2005), smanjenje ekspresije NTPDaza2 zajedno sa povećanom ekspresijom NTPDaza1/CD39 moglo bi dovesti do smanjenja nivoa ADP u simptomatskoj fazi EAE, kao i posledičnog smanjenja aktivacije ADP - zavisnih purinskih receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃. Pored toga, u ovom istraživanju pokazano je i smanjenje genske ekspresije NTPDaza3 čija se ekspresija vezuje isključivo za neurone (Grkovic *i sar.* 2019), a koja po svojoj hidrolitičkoj aktivnosti predstavlja prelazni tip između NTPDaza1 i 2 te zajedno sa NTPDaza2 dovodi do prolazne akumulacije ADP (Grkovic *i sar.* 2019). U tom smislu i smanjenje ekspresije NTPDaza3, kao druge ADP-produkujuće ektonukleotidaze u CNS moglo bi da doprinese smanjenoj akumulaciji ADP a time i smanjenoj aktivaciji specifičnih receptora, čija je ekspresija takođe pokazala fazno-specifične promene tokom EAE u ovom istraživanju. Prethodno navedeno potvrđuje da je u neuroinflamaciji u EAE prisutna modulacija ekspresije komponenti purinskog signalnog sistema, pre svega glavnih ektonukleotidaza CNS, što govori u prilog aktivnoj ulozi ćelija koje ih ekspimiraju u kreiranju inflamacijskog miljea u CNS u ovoj patologiji. Kako su u razvoj EAE uključene rezidentne ćelije CNS poput mikroglije i astrocita, kao i periferne imunske ćelije, pre svega CD4+ T limfociti i monociti/makrofagi, na čiju aktivnost purinska signalizacija ima značajan uticaj, cilj daljih ispitivanja bio je identifikacija ćelijskih tipova na kojima dolazi do povećanja ekspresije NTPDaza1/CD39 tokom EAE i potencijalnog patofiziološkog značaja uočenih promena.

Metode imunofluorescentnog obeležavanja NTPDaza1/CD39 i *in situ* hibridizacije specifične za *Entpd1* iRNK u kombinaciji sa antitelima specifičnim za ćelijske markere glije i neurona omogućile su identifikaciju ćelijskih tipova na kojima dolazi do povećanja ekspresije ovog enzima. U skladu sa literaturnim podacima (Braun *i sar.* 2000), rezultati ovog istraživanja pokazali su da se u fiziološkim uslovima NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini pacova uglavnom ekspimiraju na ramifikovanoj,

mirujućoj mikrogliji i endotelu krvnih sudova. Pored toga, saglasno podacima koji govore o ekspresiji NTPDaza1 u primarnim kulturama neurona i astrocita (Wang *i sar.* 1997), kao i na ependimskim ćelijama (Homola *i sar.* 2015), uočena je i ekspresija na astrocitima uglavnom u beloj masi, krupnim telima neurona u ventralnim rogovima sive mase kičmene moždine i ependimskim ćelijama koje okružuju centralni kanal kičmene moždine. Pored toga, posebno izražen porast iRNK bio je prisutan na nivou infiltrata na vrhuncu EAE, što je saglasno podacima o povišenoj ekspresiji NTPDaza1/CD39 na mikrogliji/makrofagima u lezijama prisutnim u beloj masi kod MS pacijenata (Huizinga *i sar.* 2012). Kvantitativna analiza NTPDaza1 imunofluorescence pokazala je da najveći doprinos povećanju ekspresije ove ektonukleotidaze koje je posebno izraženo na vrhuncu EAE, daju ćelije grupisane u zonama infiltrata sačinjenim pre svega od perifernih imunskih ćelija, ali i mikroglije. Imajući u vidu da su reaktivna mikroglija/makrofagi i astrociti, pored CD4⁺ T-limfocita, glavni medijatori neuroinflamacije tokom EAE (Murphy *i sar.* 2010, Brambilla *i sar.* 2014) na čiji funkcionalni status značajno utiče purinska signalizacija (Burnstock & Boeynaems 2014) dalje je analiziran doprinos pojedinačnih tipova ćelija uočenom porastu ekspresije NTPDaza1/CD39, uz određivanje funkcionalnog fenotipa tih ćelija tokom bolesti. Analiza kolokalizacije NTPDaza1/CD39 i Iba1 markera mikroglije pokazali su da u fiziološkim uslovima u kičmenoj gotovo polovina NTPDaza1⁺ imunofluorescentnog signala kolokalizuje sa Iba1, što ukazuje da je ekspresija NTPDaze1 u CNS u najvećoj meri povezana sa mikroglijskim ćelijama. S druge strane, najveći deo Iba1 fluorescentnog signala kolokalizovan je sa NTPDaza1/CD39 fluorescencijom što saglasno mikroskopskim zapažanjima, kao i literaturnim podacima (Braun *i sar.* 2000) ukazuje na konstitutivnu ekspresiju NTPDaza1/CD39 na mirujućoj mikrogliji. Ujedno, u skladu sa vidljivim povećanjem broja mikroglije/makrofaga tokom EAE i njihovom stabilnom koekspresijom NTPDaza1, kvantitativna analiza je pokazala da paralelno sa porastom NTPDaza1 raste i ekspresija Iba1 fluorescence, kao i da približno 80% Iba1 signala kolokalizuje sa NTPDaza1 u svim fazama bolesti. Zajedno, ovi rezultati jasno ukazuju da su mikroglija/makrofagi ćelije koje su najzaslužnije za povećanje ekspresije NTPDaza1/CD39 tokom bolesti. Inače, porast ekspresije NTPDaza1/CD39 na mikrogliji u uslovima neuroinflamacije već je pokazan u MS (Huizinga *i sar.* 2012) kao i u modelu traumatske povrede mozga (Nedeljkovic *i sar.* 2006). Ekspresija CD68 kao markera aktivirane mikroglije/makrofaga koji se dovodi u vezu sa fagocitoznom aktivnošću (Fu *i sar.* 2014), raste tokom EAE paralelno sa težinom simptoma, a u vezi sa porastom broja ovih ćelija tokom neuroinflamacije, dok su na kontrolnim presecima ove ćelije očekivano, bile odsutne. S obzirom da je kvantitativna analiza pokazala da se na početku EAE približno 10% ukupne NTPDaza1/CD39 imunoreaktivnosti preklapa sa CD68⁺ signalom, dok je na vrhuncu bolesti taj udeo porastao na 30%, rezultati ukazuju da su CD68⁺ ćelije zaslužne za oko 30% povećanja ekspresije NTPDaza1/CD39 na vrhuncu bolesti, kao i da ova populacija čini manji deo mikroglije/makrofaga u EAE. Pored antiinflamacijskih efekata (Di Virgilio & Vuerich 2015) povišena hidroliza ATP uzrokovana aktivacijom i povećanjem broja mikroglijskih ćelija i makrofaga kao glavnih nosilaca porasta ekspresije NTPDaza1/CD39 u EAE, može se posmatrati i kao svojevrsni (samo)odbrambeni mehanizam ćelija. Naime, visoka koncentracija ATP može dovesti do smrti mikroglije i oligodendrocita preko aktivacije P2X₇ receptora (Ferrari *i sar.* 1999, Matute *i sar.* 2007, He *i sar.* 2017), kao i porasta nivoa ROS posredovanog istim receptorom na mikrogliji (Parvathenani *i sar.* 2003). Dodatno, kako je u modelima ishemije i lezije entorinalne kore kod NTPDaza1/CD39 *knock out* životinja pokazano da odsustvo ovog enzima smanjuje migraciju mikroglije ka mestu ishemije/povrede (Farber *i sar.* 2008), stabilna ekspresija NTPDaza1 na mikrogliji mogla bi i da omogući migraciju ovih ćelija ka mestu prodora perifernih imunskih ćelija u CNS tokom EAE. S druge strane, imajući u vidu da je zajednička aktivnost NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 kroz produkciju adenzina neophodna za izduživanje i grananje nastavaka primarne mikroglije u fiziološkim uslovima ili pod dejstvom ATP, kao

i za orijentaciju i izduživanje nastavaka u pravcu ATP/ADP gradijenta (Matyash *i sar.* 2017), uočeni porast ekspresije obe ektonukleotidaze mogao bi doprinosti povratku na mirujuće, ramifikovano stanje mikroglije koje se uočava po okončanju neuroinflamacije u EAE. Već je napomenuto da su na prikazanim mikrografijama tokom EAE uočljive promene morfologije mikroglijskih ćelija, tipične za aktivaciju (Volonté *i sar.* 2016). U MS je pokazano da reaktivna mikroglija/makrofagi mogu imati neki od prelaznih fenotipova iz širokog spektra između dva ekstrema - proinflamacijskog M1 i antiinflamacijskog M2 fenotipa (Mikita *i sar.* 2011, Miron *i sar.* 2013, Fumagalli *i sar.* 2015, Kalkman *i sar.* 2016, Parisi *i sar.* 2016, Geloso *i sar.* 2017). U *in vitro* uslovima utvrđeno je da takozvanom klasičnom aktivacijom, pod dejstvom LPS i IFN γ nastaje aktivirana mikroglija/makrofagi označena kao M1, koja ispoljava citotoksična i proinflamacijska dejstva. Nasuprot tome, alternativnom aktivacijom pod dejstvom IL-4 nastaje M2 fenotip mikroglije/makrofaga koji ispoljava zaštitna i antiinflamacijska svojstva (Porta *i sar.* 2009, Kalkman *i sar.* 2016). Budući da je pokazano da periferni makrofagi *in vitro* smanjuju ekspresiju NTPDaza1/CD39 prilikom polarizacije ka M1 fenotipu (Zanin *i sar.* 2012), hipoteza postavljena u ovoj disertaciji pretpostavljala je da prelaz mikroglije i infiltriranih makrofaga iz M1 u M2 fenotip tokom akutne neuroinflamacije u EAE može biti u sprezi sa povećanom ekspresijom NTPDaza1/CD39 u tim ćelijama. Prelazak iz jednog u drugi aktivacioni fenotip u vezi je sa promenom ekspresije nekoliko hiljada gena, uključujući i gene koji kodiraju enzime uključene u metabolizam arginina (Xu *i sar.* 2003). Naime, klasifikacija mikroglija/makrofaga na M1 i M2 fenotip može se sažeto prikazati kroz dva međusobno isključujuća metabolička puta koja predvode dva enzima: iNOS i Arg1. Oba enzima su u kompeticiji za L-arginin i razgrađuju ga do NO i citrulina u slučaju iNOS, odnosno ornitina i uree u slučaju Arg1. Proizvodi tih reakcija imaju suprotne efekte u kontekstu neuroinflamacije (Morris Jr 2007, Fenn *i sar.* 2014). Prelaz iz M1 u M2 povezan je sa značajnom promenom u produkciji citokina (Franco & Fernandez-Suarez 2015), koja je ranije pokazana u ovde korišćenom EAE modelu (Lavrnja *i sar.* 2008, Lavrnja *i sar.* 2012). Prisutni citokinski milje usmerava T-limfocite ka Th1 ili Th2 imunskom odgovoru, koji povratno stimuliše M1 ili M2 inflamacijski odgovor kroz uspostavljenu pozitivnu povratnu spregu tako stabilizujući dominantni fenotip mikroglije/makrofaga. Budući da su najčešće upotrebljavani markeri za M1 i M2 funkcionalna stanja mikroglije/makrofaga iNOS i Arg1 (Cherry *i sar.* 2014), predstavljena hipoteza ispitana je analizom genske ekspresije i kvantitativnom analizom fluorescence, kao i stepena kolokalizacije ova dva markera sa markerima mikroglije/makrofaga i NTPDaza1/CD39.

Akutni neuroinflamacijski odgovor u EAE u sprezi je sa diferencijalnim načinom ekspresije nekolicine markera reaktivne mikroglije/makrofaga i astrocита. U ovom istraživanju, pored fluorescence i genska ekspresija za Iba1 i CD68 markere mikroglije/makrofaga bila je značajno povećana u svim vremenskim tačkama EAE, a najviše na vrhuncu, što je posledica aktivacije mikroglije i prisustva makrofaga u EAE (Ajami *i sar.* 2011). Iz istih razloga na početku i vrhuncu bolesti dobijen je i porast ekspresije gena koji kodira CD11b, takođe opšti marker mikroglije/makrofaga uključen u aktivaciju ovih ćelija i oslobađanje NO i inflamacijskih citokina i hemokina (Heppner *i sar.* 2005). U tom smislu bio je povišen i CX3CR1 koji se se u CNS u fiziološkim uslovima eksprimira na mikrogliji, a u EAE dodatno i na infiltriranim makrofagima i predstavlja receptor za neuronski CX3CL1 čiju ekspresiju indukuje adozin (Mills *i sar.* 2012). Iako postoje i kontradiktorni podaci (Mills *i sar.* 2012, Ridderstad Wollberg *i sar.* 2014), CX3CR1 *knock out* životinje imaju pogoršane simptome tokom EAE, veću infiltraciju ćelija i smrtnost, kao i povećanu ekspresiju IL-17 i IFN γ (Huang *i sar.* 2006, Garcia *i sar.* 2013, Limatola & Ransohoff 2014). Kako je ekspresija ovog hemokinskog receptora visoka upravo u makrofagima M2 fenotipa (Shechter *i sar.* 2013), porast njegove ekspresije na vrhuncu i kraju bolesti u ovom istraživanju mogao bi da govori u prilog tranziciji M1 u M2 fenotip mikroglije/makrofaga. U prilog mogućoj M1/M2 tranziciji na vrhuncu EAE govori i genska ekspresija

korišćenih markera M1, odnosno M2 fenotipa - iNOS i Arg1, koje je bila višestruko povećana, za iNOS na početku, a za Arg1 i u Ep i Ev.

Imajući u vidu opisane promene u ekspresiji dva ključna M1/M2 markera, u ovom istraživanju ispitana je i njihova ćelijska ekspresija. Tokom EAE pokazano je prisustvo mikroglije/makrofaga koji ekspimiraju iNOS, Arg1 ili oba markera i takve ćelije označene su kao mikroglija/makrofagi fenotipa nalik M1, nalik M2 odnosno mešovito M1/M2 fenotipa. Rezultati su pokazali da je ekspresija oba ova markera višestruko uvećana već na početku i vrhuncu, nakon čega opada dostižući fiziološki nivo na kraju EAE. Najveće preklapanje Iba1 i iNOS signala uočeno je na početku, a Iba1 i Arg1 na vrhuncu EAE, što ukazuje na veću zastupljenost reaktivne mikroglije/makrofaga nalik M1 fenotipu na početku, odnosno nalik M2 na vrhuncu bolesti. Pored toga, u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da u *in vivo* uslovima aktivirana mikroglija/makrofagi često istovremeno ekspimiraju markere M1 i M2 fenotipa (Fumagalli *i sar.* 2015; Kalkman *i sar.* 2016), uočena je dvostruka iNOS/Arg1 imunoreaktivnost kod jednog dela Iba1⁺ ćelija na početku i u manjoj meri na vrhuncu EAE. Prevalencija iNOS⁺ mikroglije/makrofaga na početku, odnosno Arg1⁺ na vrhuncu EAE u odnosu na dvostruko pozitivne iNOS⁺Arg1⁺ ćelije dodatno ukazuje na tranziciju ka fenotipu nalik M2 na vrhuncu neuroinflamacije. Slično kao u slučaju kolokalizacije Iba1/iNOS i Iba1/Arg1 imunofluorescentnih signala, približno 10% NTPDaza1/CD39 fluorescencije preklapa se sa iNOS signalom u Ep, dok je najveće preklapanje signala NTPDaza1/CD39 i Arg1 od 30% uočeno u Ev, ponovo ukazujući na veću povezanost NTPDaza1/CD39 i fenotipa mikroglije/makrofaga nalik M2 u ovoj fazi bolesti. Paralelno sa tim, analizom prisustva iNOS i Arg1 u CD68⁺ aktiviranoj mikrogliji/makrofagima takođe je uočen prelaz između stanja nalik M1 na početku u stanje nalik M2 na vrhuncu EAE. Naime, analiza kolokalizacije otkrila je približno dvostruko veću kolokalizaciju CD68 i iNOS u odnosu na Arg1 na početku, dok je na vrhuncu polovina CD68 imunofluorescencije, inače uvećane u odnosu na početak, kolokalizovala sa Arg1 nasuprot gotovo zanemarljivoj kolokalizaciji sa iNOS. U pogledu zastupljenosti pojedinačnih aktivacionih fenotipova na početku EAE, iNOS⁺CD68⁺ ćelije nalik M1 fenotipu bile su znatno zastupljenije od ćelija mešovito M1/M2 fenotipa, dok su na vrhuncu bolesti preovladavale Arg1⁺CD68⁺ ćelije, dodatno potvrđujući tranziciju iz pro- u antiinflamacijsko stanje mikroglije/makrofaga na vrhuncu EAE. Pored T- i B-limfocita, mikroglija i makrofagi su dominantne imunske ćelije u inflamacijskim demijelinizujućim lezijama u MS/EAE (Lassmann, 2018), te stoga njihov funkcionalni fenotip diktira tok neuroinflamacije ka progresiji ili razrešenju. U ovoj studiji, prelazak mikroglije/makrofaga iz reaktivnog stanja nalik M1 u M2 dogodio se na vrhuncu neuroinflamacije prisutne u EAE kod 80% aktiviranih ćelija koje su inače u povećanom broju uočene u toj vremenskoj tački, a od kojih većina ekspimiraju NTPDaza1/CD39. Prikazani rezultati ukazuju na povezanost NTPDaza1/CD39 sa antiinflamacijskim fenotipom mikroglije/makrofaga kao i na moguću ulogu ove ektonukleotidaze u potencijaciji njegovih imunosupresivnih dejstava (Pesce *i sar.* 2009) i saglasni su sa ranije pokazanim porastom ekspresije NTPDaza1/CD39 kod primarnih M2 u odnosu na M1 makrofage, kao i posledičnim smanjenjem nivoa proinflamacijskog ATP u medijumu u kojem su gajeni (Zanin *i sar.* 2012). Kako u MS polarizacija mikroglije/makrofaga u M2 fenotip nastaje kao posledica Th2 imunskog odgovora i dalje utiče na balans između Th1/Th17 i Treg ćelija, postoji jak osnov za terapije u MS koje favorizuju M2 diferencijaciju (Liu *i sar.* 2013), a sklopu toga i indukciju ekspresije NTPDaza1/CD39 na mikrogliji/makrofagima.

Kao što je već pomenuto, ključni događaj u nastanku i progresiji MS/EAE patologije je infiltracija encefalitogenih T-limfocita zajedno sa drugim imunskim ćelijama iz krvi u CNS (Kierdorf *i sar.* 2019). U EAE modelu korišćenom u okviru ove disertacije pokazano je da dolazi do masovne infiltracije mononuklearnih ćelija u kičmenu moždinu u svim vremenskim tačkama, a posebno na

vrhuncu bolesti kada su i neurološki simptomi najviše izraženi. Pored rezultata dobijenih kvantifikacijom infiltrata na mikroskopskim presecima kičmene moždine i analiza genske ekspresije *Itgam* i *Cx3cr1* gena specifičnih kako za mikrogliju tako i za makrofage monocitnog porekla govori u prilog velikom broju infiltriranih ćelija (Sunnemark *i sar.* 2005, Greter *i sar.* 2015). Budući da je u ovom istraživanju analizom NTPDaza1/CD39 imunofluorescence u kičmenoj moždini tokom bolesti pokazana visoka ekspresija tog enzima u okviru infiltrata i njihovoj neposrednoj blizini, jedan od ciljeva ove disertacije bio je analiza udela infiltriranih mononuklearnih ćelija u povećanju ekspresije NTPDaza1/CD39 tokom EAE, metodom protočne citofluorimetrije. Udeo NTPDaza1⁺ ćelija u izolovanoj mononuklearnoj frakciji porastao je sa približno 20% na početku, do čak 80% na vrhuncu bolesti a potom opao na 60%. Visok udeo NTPDaza1⁺ ćelija u infiltratima na vrhuncu i kraju EAE mogao bi dodatno da govori u prilog prisustvu mikroglije/makrofaga fenotipa nalik M2, ali i Treg limfocita koji doprinose razrešenju neuroinflamacije (Deaglio *i sar.* 2007).

Dalja analiza podrazumevala je određivanje tipa ćelija u okviru NTPDaza1⁺ ćelija na vrhuncu EAE. Literaturni podaci govore da T-limfociti čine 40% (White *i sar.* 1998) frakcije mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine na vrhuncu bolesti, među kojima je većinski CD4⁺ podtip čija je uloga u neuroinflamaciji tokom EAE ključna (Dittel 2008, Murphy *i sar.* 2010, Constantinescu *i sar.* 2011). Analiza udela CD4⁺ ćelija u izolovanim infiltratima pokazala je da je u frakciji mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine na vrhuncu EAE bilo približno 45% CD4⁺ ćelija koje čine uglavnom T-limfociti, saglasno literaturnim podacima dobijenim za isti EAE model (Miljković *i sar.* 2011), od čega su približno 70% činile NTPDaza1/CD39⁺ ćelije koje bi mogle da pripadaju Treg podtipu (Borsellino *i sar.* 2007). To zapravo ukazuje da bi približno 30% od svih ćelija mononuklearnih infiltrata prisutnih na vrhuncu EAE moglo da pripada Treg podtipu CD4⁺ limfocita. Naime, ranije je pokazano da se NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 konstitutivno ekspimiraju na Treg limfocitima miša (Borsellino *i sar.* 2007, Deaglio & Robson 2011). Imajući u vidu literaturne podatke koji pokazuju da Treg limfociti imaju ključnu ulogu u spontanom oporavku od neuroinflamacije u EAE/MS suzbijanjem Th1 i Th17 imunskog odgovora posredstvom sekrecije antiinflamacijskih citokina (Kleinewietfeld & Hafler 2014, Koutouros *i sar.* 2014, Wang *i sar.* 2014, Álvarez-Sánchez *i sar.* 2019), kao i istovremenim uklanjanjem ATP i produkcijom adenzina (Deaglio *i sar.* 2007), Treg limfociti bi mogli dodatno da potpomognu tranziciju mikroglije/makrofaga u antiinflamacijski fenotip na vrhuncu EAE. S druge strane, pokazano je i da astrociti gajeni u inflamacijskim uslovima u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima putem direktnih interakcija izazivaju porast ekspresije NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 na limfocitima, čime menjaju proinflamacijski fenotip Th17 u imunosupresivni (Filipello *i sar.* 2016), što dodatno govori o složenosti interakcija mikroglije, astrocita i infiltriranih limfocita u patologiji MS/EAE. Pored CD4, u mononuklearnoj frakciji ćelija analizirana je i koekspresija NTPDaza1/CD39 i CD40 kostimulatornog receptora na vrhuncu EAE. Naime, CD40 kao kostimulatorni receptor presudan za reaktivaciju autoreaktivnih T-limfocita nakon infiltracije kroz KMB u CNS (Becher *i sar.* 2001) ima ključnu ulogu u neuroinflamaciji (Aarts *i sar.* 2019). Ranije je pokazano da se CD40 ekspimiraju na približno 45% aktivirane mikroglije i 70% makrofaga u frakciji mononuklearnih ćelija na vrhuncu EAE (Aarts *i sar.* 2017). U skladu sa tim, analiza izolovanih mononuklearnih ćelija infiltrata prikazana u ovoj disertaciji pokazala je da je udeo CD40⁺ ćelija približno 30%, od čega je većina (približno 80%) koekspimirala NTPDaza1/CD39. Iako se CD40 smatra markerom M1 mikroglije/makrofaga (Aarts *i sar.* 2017), pokazano je da čak 70% CD40⁺ mikroglije/makrofaga u MS lezijama ekspimiraju i markere M2 fenotipa što ukazuje na povezanost ekspresije CD40 sa mešovitim M1/M2 fenotipom (Vogel *i sar.* 2013). Dodatno, to ukazuje da izvestan deo CD40⁺NTPDaza1⁺ mikroglije/makrofaga prisutan na vrhuncu u ovom EAE modelu predstavlja neku formu intermedijarnog M1/M2 fenotipa. Dalje, u skladu sa literaturnim podacima (White *i sar.* 1998), ovo istraživanje je pokazalo da je u mononuklearnoj

frakciji ćelija na vrhuncu EAE bilo prisutno približno 87% CD45⁺ ćelija među kojima su i ćelije poreklom iz krvi i mikroglijske ćelije koje visoko ekspimiraju NTPDaza1/CD39. U pogledu nivoa ekspresije CD45 (Zhang *i sar.* 2002, Rumble *i sar.* 2015), dobijeni rezultati su pokazali prisustvo 29% ćelija sa niskom ekspresijom CD45 što ukazuje na mirujuću mikrogliju, 36% ćelija sa intermedijernom ekspresijom CD45 koje najverovatnije predstavlja aktiviranu mikrogliju i oko 24% ćelija sa visokom ekspresijom CD45 koje obuhvataju makrofage i druge hematopoetske ćelije što je uglavnom u skladu sa literaturnim podacima (Miljković *i sar.* 2011, Rumble *i sar.* 2015, Stojić-Vukanić *i sar.* 2016). Povećanje udela NTPDaza1⁺ ćelija u populaciji ćelija sa visokom ekspresijom CD45 u odnosu na populacije intermedijarne i niske ekspresije implicira da aktivacija izazvana neuroinflamacijom povećava ekspresiju NTPDaza1/CD39 u mikrogliji/makrofagima. Dodatno, ovo ukazuje i da ukupnom porastu ekspresije NTPDaza1/CD39 u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti u najvećoj meri doprinosi aktivirana mikroglija/makrofagi, što je dodatno potkrepljeno histološkim nalazima koji su pokazali porast frakcije NTPDaza1/CD39 kolokalizovane sa CD68 imunofluorescentnim signalom.

Karakterizacija inflamacijskog profila NTPDaza1⁺ mikroglije/makrofaga tokom EAE prikazana u ovoj disertaciji pokazala je da na početku bolesti preovladava fenotip nalik M1, dok na vrhuncu među aktiviranom mikroglijom/makrofagima dominira fenotipa nalik M2, kao i da je u obe tačke prisutan mešoviti M1/M2 fenotip, s tim što je na vrhuncu on zastupljen u manjoj meri u odnosu na početak bolesti. Dodatno, uočeni prelazak iz pro- u antiinflamacijski fenotip mikroglije/makrofaga na vrhuncu EAE praćen je povećanjem ekspresije NTPDaza1/CD39 na ovom tipu ćelija. Na vrhuncu EAE uočen je visok udeo NTPDaza1⁺ ćelija u CD4⁺, CD40⁺, kao i CD45⁺ populacijama u infiltratima što ukazuje na visoku ekspresiju ove ektonukeotidaze na Treg limfocitima, odnosno aktiviranoj mikrogliji i makrofagima. Prethodno sumirani rezultati ove disertacije zajedno sa literaturnim podacima o ulozi NTPDaza1/CD39 u prelasku mikroglije u mirujućim fenotip kroz uticaj na ramifikaciju i migraciju, ukazuju na mogući terapijski potencijal ovog enzima u MS/EAE patologiji.

Pored već poznate ekspresije na mikrogliji, u rezultatima ove disertacije prvi put je opisano prisustvo NTPDaza1/CD39 i na astrocitima u fiziološkim uslovima *in vivo*. MKK1 vrednosti dobijene analizom kolokalizacije pokazale su da frakcija NTPDaza1/CD39 koja kolokalizuje sa GFAP i u fiziološkoj kontroli iznosi približno 30%, tokom EAE dodatno opada, dok su MKK2 vrednosti pokazale da se frakcija GFAP kolokalizovana sa NTPDaza1/CD39 ne menja tokom bolesti i iznosi približno 50%. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da se broj astrocitnih nastavaka koji ekspimiraju NTPDaza1/CD39 uglavnom ne menja tokom EAE, dok je za smanjenje frakcije ektonukleotidaze kolokalizovane sa GFAP u Ev verovatno u najvećoj meri odgovoran porast broja Iba1⁺ ćelija koje je snažno ekspimiraju. S druge strane, kako PKK govori istovremeno o kolokalizaciji i korelaciji intenziteta dva signala, dobijeno smanjenje vrednosti ovog koeficijenta za GFAP i NTPDaza1/CD39 imunofluorescencu može delimično biti i posledica smanjene ekspresije ektonukleotidaze na astrocitima tokom EAE što je donekle saglasno literaturnim podacima u kojima je pokazano smanjenje ekspresije NTPDaza1/CD39 na astrocitima *in vitro* u odgovoru na tretman IFN γ (Ulivieri *i sar.* 2019). Ipak, na osnovu predstavljenih rezultata nije moguće doneti zaključak o takvom smanjenju ekspresije bez dodatnih analiza. Kako i aktivirani astrociti u neuroinflamaciji, poput mikroglije i makrofaga, mogu imati različite fenotipe, predmet dalje analize bio je ispitivanje potencijalnih promena ekspresije NTPDaza1/CD39 na različitim tipovima aktiviranih atrocita. U pogledu GS⁺ astrocita, iako rezultati Western Blot analize nisu pokazali promene u tkivu na nivou proteinske ekspresije GS tokom EAE (Prilog 1), uočen je jak signal na uvećanim telima i zadebljalim nastavcima perivaskularnih astrocita i njihovih završnih stopala na kraju bolesti. Ovaj nalaz bi mogao da ukazuje na intenzivno uklanjanje glutamata i amonijaka od strane ove specifične funkcionalne jedinice, tzv. gliovaskularne jedinice, koja

bi na taj način mogla da ostvaruje neuroprotektivne efekte. (Boulay *i sar.* 2016) u uslovima neuroinflamacije. Dodatno, na istim nastavcima uočava se i i koekspresija NTPDaza1/CD39, čija bi ATP-hidrolizujuća aktivnost dodatno mogla da potencira pomenute protektivne efekte u neuroinflamaciji. Za razliku od GS koja je pan-astrocitni marker, vimentin kao marker aktivacije astrocita u fiziološkim uslovima se eksprimira retko, dok se njegova ekspresija na aktiviranim astrocitima u EAE povećava uz gotovo potpuno preklapanje sa NTPDaza1/CD39. Zajedno, ovi rezultati nedvosmisleno su pokazali da aktivirani astrociti ekspimiraju NTPDaza1/CD39 tokom EAE što je pružilo osnov za dalju analizu funkcionalnog fenotipa tih ćelija, kao i ekspresije ove ektonukleotidaze na njima u kontekstu neuroinflamacije .

Pored imunosupresivnog delovanja u neuroinflamaciji, dodatna funkcionalna posledica dominantnog prisustva mikroglije/makrofaga nalik M2 na vrhuncu EAE mogla bi biti ostvarivanje uticaja na funkcionalno stanje astrocita, s obzirom da je pokazano da je fenotip reaktivne mikroglije presudan za indukciju reaktivnog fenotipa astrocita u uslovima neuroinflamacije (Liddelov *i sar.* 2017). Stoga bi dominantno prisutni antiinflamacijski fenotip mikroglije/makrofaga mogao da potpomogne aktivaciju astrocita u pravcu neuroprotektivnog fenotipa u korišćenom modelu EAE. Pored toga, povećana ekspresija NTPDaza1/CD39 od strane mikroglije mogla bi da potencira indukciju neuroprotektivnog A2 fenotipa astrocita putem smanjenja signalizacije posredovane P2Y₁ receptorom (Shinozaki 2017). Dodatno, u ovom istraživanju je pokazano da tokom EAE dolazi do smanjenja ekspresije P2Y₁ na nivou mRNA, dok su preliminarni rezultati vezani za ćelijsku ekspresiju ukazali da je uočeno smanjenje povezano u najvećoj meri sa fibroznim astrocitima, što ukazuje na indukciju neuroprotektivnog A2 fenotipa astrocita. A2 astrociti povećavaju ekspresiju mnogih faktora koji omogućavaju preživljavanje i rast neurona (Zamanian *i sar.* 2012, Liddelov & Barres 2017), a gen za ciklooksigenazu 2 (Cox-2) je među visoko indukovanim i najspecifičnijim genima kod A2 fenotipa, sa jakim protektivnim efektom u neuroinflamaciji (Aid & Bosetti 2011). U prikazanim rezultatima uočena je snažna indukcija ovog enzima na astrocitima tokom EAE koja se dodatno povećava od početka prema kraju bolesti. Dodatno, uočena je i izražena kolokalizacija Cox-2 sa NTPDaza1/CD39 posebno na fibroznim astrocitima, što ukazuje na njihov protektivni fenotip. Povećana ekspresija Cox-2 može biti uključena u modulaciju krvotoka u CNS od strane perivaskularnih astrocita u odgovoru na neuroinflamaciju (Font-Nieves *i sar.* 2012, MacVicar & Newman 2015), što bi zajedno sa aktivnošću GS moglo doprinosti oporavku KMB u EAE (Bennett *i sar.* 2010).

Prema podacima iz literature, NTPDaza1/CD39 prisutna je i na neuronima i to izrazito u talamusu, kaudoputamenu i hipokampusu (Langer *i sar.* 2008), kao i na primarnim neuronima (Wang *i sar.* 1997) u fiziološkim uslovima. U pogledu ekspresije i potencijalne uloge NTPDaza1/CD39 na neuronima u patološkim uslovima nema podataka u literaturi, te su rezultati u okviru ove disertacije koji pokazuju smanjenje prisustva ovog enzima na motoneuronima u EAE prvi te vrste. Pokazano je da neuroni NTPDaza1/CD39 *knock out* životinja pokazuju hiperekscitabilnost (Rocha 2014), što se objašnjava poznatom ulogom adenoizina i njegovih receptora u inhibiciji ekscitacije neurona i sinaptičke transmisije u brojnim regionima mozga (Newman 2003, Zhang *i sar.* 2003, Pascual *i sar.* 2005, Fellin *i sar.* 2009), kao i u motoneuronima kičmene moždine (Witts *i sar.* 2011). U EAE je pokazana korelacija između ekscitatorne neurotransmisija na motoneuronima i jačine neuroloških simptoma (Blakely *i sar.* 2015). Pored toga, u EAE je pokazano oštećenje dendrita i sinapsi na motoneuronima ventralnog roga kičmene moždine koje može biti uzrokovano ekscitotoksičnošću (Zhu *i sar.* 2003). Zajedno, ovde pokazano smanjenje NTPDaza1/CD39 na motoneuronima u kičmenoj moždini tokom EAE, najveće na početku bolesti, potencijalno ukazuje na smanjenu lokalnu produkciju protektivnog adenoizina što može doprineti oštećenju ovih ćelija i razvoju neuroloških simptoma

prisutnih u MS/EAE. Saglasno tome, na mikrografijama dobijenim u ovom istraživanju uočeno je prisustvo NTPDaza1⁺Iba1⁺ ćelija uz tela motoneurona ventralnih rogova sive mase kičmene moždine tokom EAE, što ukazuje da bi aktivirana mikroglija mogla učestvovati u fagocitozi oštećenih sinapsi u procesu “orezivanja” (Kettenman 2012) kao deo neuroprotektivnog odgovora (Chen *i sar.* 2014), iako još uvek ne postoje jasni dokazi ovog fenomena u EAE (Blakely *i sar.* 2015).

Pored ispitivanja promena u ekspresiji NTPDaza1/CD39, u okviru ove disertacije ispitane su i promene na nivou druge dominantne ektonukleotidaze CNS, NTPDaza2 tokom EAE. U literaturi ekspresija ove ektonukleotidaze u mozgu pacova pokazana je na nekim specijalizovanim tipovima astrocita poput laminarnih astrocita u moždanom stablu i cerebrumu, satelitskim astrocitima ganglija dorzalnih korenova kičmene moždine (Braun *i sar.* 2004), tanicitama, nestelatnim atrocitima određenih regiona (Gampe *i sar.* 2012) astrocitima nalik adultnim progenitorskim ćelijama u subventrikularnoj zoni lateralnih komora (Shukla *i sar.* 2005, Mishra *i sar.* 2006, Gampe *i sar.* 2015) Dodatno, *in vitro* je pokazano da NTPDaza2 predstavlja glavnu ektonukleotidazu primarnih astrocita (Wink *i sar.* 2006, Brisevac *i sar.* 2015). Rezultati ove disertacije potvrdili su selektivnu lokalizaciju NTPDaza2 u CNS (Braun *i sar.* 2004, Shukla *i sar.* 2005, Mishra *i sar.* 2006, Gampe *i sar.* 2015), nasuprot generalnoj ekspresiji na astrocitima u kulturi (Wink *i sar.* 2006, Brisevac *i sar.* 2015). Naime, u kičmenoj moždini pacova ekspresija NTPDaza2 bila je ograničena uglavnom na GFAP⁺ fibrozne astrocite kao i nestin⁺ ćelije u beloj masi, dok na protoplazmatičnim astrocitima, neuronima, mikrogliji, oligodendrocitima i NG2⁺ ćelijama nije uočena. Fibrozni astrociti koji eksprimiraju NTPDaza2 su izduženi i po izgledu slični laminarnim astrocitima koji okružuju mijelinizovana vlakna (Braun *i sar.* 2003, Shukla *i sar.* 2005, Gampe *i sar.* 2012). U ovde prikazanim rezultatima približno 20% NTPDaza2⁺ elemenata koeksprimiralo je marker nervnih progenitorskih ćelija nestin, što ukazuje da bi ove ćelije razbacane po beloj masi mogle predstavljati adultne progenitore (Shukla *i sar.* 2005, Mishra *i sar.* 2006, Gampe *i sar.* 2015). To dodatno ukazuje da bi neke od NTPDaza2⁺ GFAP⁺ ćelija prisutnih u beloj masi mogle predstavljati adultne progenitorske ćelije. Po prvi put u literaturi ovo istraživanje je pokazalo i da tokom EAE dolazi fazno-specifičnog smanjenja ekspresije NTPDaza2 u kičmenoj moždini koje koreliše sa težinom simptoma. Naime, sa porastom težine simptoma tokom EAE dolazi do postepenog smanjenja na nivou genske i proteinske ekspresije NTPDaza2, dok je oporavak praćen povratkom ekspresije na fiziološki nivo. Kvantifikacija GFAP⁺ i GFAP⁺NTPDaza2⁺ elemenata na mikrografijama preseka kičmene moždine iz svake od faza bolesti pokazalo je da dolazi do smanjenja NTPDaza2 imunoreaktivnosti ali ne i broja NTPDaza2⁺ elemenata, što ukazuje da je uočeno smanjenje ekspresije posledica smanjene ekspresije NTPDaza2 na istim elementima – pre svega fibrozim astrocitima, a ne posledica smanjenog broja elemenata koji eksprimiraju NTPDaza2. S druge strane, rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da tokom EAE broj nestin⁺ elemenata raste, saglasno literaturnim podacima (Shin *i sar.* 2003), što govori u prilog već poznatoj ulozi ovog proteina u oporavku tkiva. Nestin⁺ progenitorske ćelije mogu da se diferenciraju u astrocite ili oligodendrocite u zavisnosti od prisutnih faktora (Calvo *i sar.* 1991, Calza *i sar.* 2002, Shin *i sar.* 2003), što zajedno sa uočenim postepenim povećanjem udela NTPDaza2⁺ nestin⁺ elemenata ka kraju bolesti navodi na pretpostavku da je oporavak tokom EAE spregnut sa povećanim brojem progenitorskih ćelija u kičmenoj moždini. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju vezani za ekspresiju NTPDaza1/CD39 i NTPDaza2, kao i ranije pokazana ekspresija eN/CD73 (Lavrnja *i sar.* 2015) ukazuju da su astrociti, prvenstveno fibrozni, izuzetno dobro opremljeni za hidrolizu adeninskih nukleotida u fiziološkim uslovima. S druge strane, kako je pokazano da su za povećanje ekspresije NTPDaza1/CD39 tokom EAE odgovorne aktivirane mikroglijske ćelije i infiltrirani makrofagi, dok je smanjena ekspresija NTPDaza2 u najvećoj meri povezana sa fibrozim astrocitima, može se pretpostaviti da tokom EAE vodeću ulogu u hidrolizi ATP preuzimaju mikroglija i makrofagi, dok astrociti, imajući u vidu ranije pokazan porast ekspresije

eN/CD73 (Lavrnja *i sar.* 2015) u većoj meri preuzimaju ulogu u nastanku antiinflamacijskog adenzina. Ranije pokazan porast ATP- i ADP- hidrolizujućih aktivnosti u kičmenoj moždini tokom EAE u istom modelu, kao i istovremeni porast ekspresije NTPDaza1/CD39 i smanjenje ekspresije NTPDaza2 pokazan u ovom istraživanju, zajedno ukazuju na moguću smanjenu akumulaciju ADP tokom neuroinflamacije što bi posledično moglo uticati na signalizaciju ali i ekspresiju ADP – zavisnih P2Y receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃. U fiziološkim uslovima, sva tri receptora se ekspimiraju i na mikrogliji i na astrocitima, s tim što se na mikrogliji ekspimiraju u istoj meri, dok je na astrocitima najviše ekspimiran P2Y₁, nešto manje P2Y₁₂, a najslabije P2Y₁₃ (Quintas *i sar.* 2018). U pogledu uloge u MS/EAE, od pomenutih receptora jedino je za P2Y₁₂ potvrđena veza sa ovom patologijom (Bagatini *i sar.* 2018). U fiziološkim uslovima, ovaj receptor se ekspimirira na oligodendrocitima (Sasaki *i sar.* 2003, Amadio *i sar.* 2010) i na mirujućoj mikrogliji (Sasaki *i sar.* 2003), a njegovo smanjenje i potpuni nestanak na mikrogliji reflektuje prelazak ovih ćelija iz mirujućeg u aktivirani fenotip. Saglasno tome, ATP preko aktivacije P2Y₁₂ receptora izaziva izduživanje nastavaka mikroglije, dok u povredi ili inflamaciji pri povlačenju nastavaka dolazi do smanjenja ekspresije P2Y₁₂ (Haynes *i sar.* 2006, Orr *i sar.* 2009, Koizumi *i sar.* 2013, Dissing-Olesen *i sar.* 2014, Matyash *i sar.* 2017). U MS je pokazano da je nivo ovog receptora smanjen u lezijama i korelira sa stepenom demijelinizacije (Amadio *i sar.* 2010, Mildner *i sar.* 2017, Zrzavy *i sar.* 2017), ali je kod pacijenata u oporavku povećan i povezuje se sa anitinflamacijskim fenotipom mikroglije/makrofaga (Beaino *i sar.* 2017). Specifična lokalizacija NTPDaza2 na fibroznim astrocitima koji blisko naležu na mijelinizovana vlakna u beloj masi kao i prisustvo P2Y₁₂ na oligodendrocitima i mirujućoj mikrogliji ukazuju na moguću ulogu u signalizaciji posredovanoj ADP između ovih ćelija. Aktivacija P2Y₁₂ receptora može takođe ostvarivati direktne ili indirektne efekte na preživljavanje oligodendrocita i gubitak aksona (Amadio *i sar.* 2010). U fiziološkim uslovima, električna aktivnost aksona dovodi do toničnog otpuštanja ATP koji, nakon što se hidrolizuje u ADP, aktivira P2Y₁₂ receptor i održava mirujući fenotip mikroglije (Haynes *i sar.* 2006). Analizom nivoa genske i proteinske ekspresije, u ovoj disertaciji pokazano je da je na genskom nivou došlo do smanjenja ekspresije P2Y₁₂ na početku bolesti koje se može objasniti inicijalnom aktivacijom mikroglije (Orr *i sar.* 2009). Zatim je ekspresija značajno povećana i na genskom i na proteinskom nivou na vrhuncu EAE kada se uočava njegova ekspresija na oligodendrocitima i mijelinu (Prilog 2). Na kraju bolesti njegova povećana ekspresija povezana je sa ponovnom ekspresijom na mikrogliji (Prilog 2) koja se vraća u mirujuću formu (Sasaki *i sar.* 2003, Amadio *i sar.* 2010, Moore *i sar.* 2015, Beaino *i sar.* 2017). Zajedno sa prethodno pokazanom povećanom hidrolizom ADP tokom EAE, smanjena ekspresija NTPDaza2 pokazana u ovoj disertaciji i posledična smanjena akumulacija ADP mogle bi da kroz smanjenje signalizacije posredovane P2Y₁₂ receptorom deluju kao signal opasnosti i pokrenu prelazak mirujuće u aktiviranu mikrogliju tokom EAE. .

Kada je u pitanju P2Y₁ receptor, nedavno je otkriveno da smanjenje signalizacije posredovane P2Y₁ receptorom može doprineti nastanku neuroprotektivnog fenotipa astrocita (Shinozaki *i sar.* 2017). U ovoj doktorskoj disertaciji, pokazano je upravo smanjenje P2Y₁ receptora na genskom i proteinskom nivou, posebno izraženo na vrhuncu bolesti. U pogledu ćelijske distribucije u kičmenoj moždini tokom EAE, uočena je dominantna ekspresija ovog receptora na fibroznim elementima u beloj masi nalik astrocitima (Prilog 3), za čiju je potvrdu neophodno uraditi dodatne imunohistohemijske analize. U tom smislu, ovde prikazani rezultati zajedno sa literaturnim podacima (Agresti *i sar.* 2005, Shinozaki *i sar.* 2017, Quintas *i sar.* 2011) mogli bi ukazivati na pojavu neuroprotektivnog fenotipa astrocita u ovom modelu, ali su za to neophodna detaljnija ispitivanja.

U rezultatima ove disertacije takođe je pokazano da dolazi do značajnog porasta ekspresije P2Y₁₃ receptora na kraju bolesti, što sugerira moguću ulogu ovog receptora u rezoluciji neuroinflamacije i u oporavku tokom EAE. Pomenuto je već da je ovaj receptor prisutan na mikrogliji gde zajedno sa P2Y₁₂ inhibira proliferaciju astrocita i indukuje neuroprotektivni fenotip (Shinozaki *i sar.* 2017, Quintas *i sar.* 2018). Takođe, poznato je da aktivacija P2Y₁₃ receptora na mikrogliji dovodi do oslobađanja IL-1 β , TNF- α and IL-6 (Liu *i sar.* 2017), a da upravo ti citokini dovode do indukcije neuroprotektivnog fenotipa astrocita i smanjene ekspresije P2Y₁ (Shinozaki *i sar.* 2017). Pokazano je da aktivacija P2Y₁₃ receptora indukuje glavne signalne puteve vezane za preživljavanje neurona, poput ERK1/2 i PI3K/Akt/GSK3 (Pérez-Sen *i sar.* 2015), a dovodi i do aktivacije Nrf-2/HO-1 ose koja ove ćelije štiti od ekscitotoksičnog oštećenja (Espada *i sar.* 2010). Stoga, uočeno povećanje ekspresije ovog receptora i na genskom i na proteinskom nivou u kičmenoj moždini, posebno izraženo na kraju bolesti može da ukazuje na njegovu ulogu u neuroprotekciji, odnosno preživljavanju i otpornosti neurona na različite štetne stimulse (del Puerto *i sar.* 2012), kao i u nastanku neuroprotektivnog fenotipa astrocita koji doprinosi razrešenju neuroinflamacije tokom EAE.

Rezultati ove disertacije pružaju nove podatke o izmenjenoj ekspresiji i potencijalnoj ulozi P2Y₁ i P2Y₁₃ receptora i potvrđuju izmenjenu ekspresiju P2Y₁₂ receptora prethodno opisanu u MS/EAE, posebno u vezi sa ulogom mikroglije/makrofaga u ovoj patologiji. Izmenjena ekspresija NTPDaza2 i ADP senzitivnih receptora P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃ receptora, kao i prethodno opisana izmenjena hidroliza ADP, sveukupno ukazuju na značaj ADP kao vanćelijskog signala u MS/EAE patologiji. Preliminarno, rezultati govore u prilog vezi između ADP i neuroprotekcije i impliciraju da, nasuprot ATP, ADP može podsticati završetak neuroinflamacije. U tom smislu, ADP receptori bi mogli imati važnu ulogu u menjanju toka neuroinflamacije i predstavljati novu potencijalnu metu terapeutika u MS/EAE.

Kada su u pitanju ostali P2 purinski receptori, pokazana je veza nekih P2X receptora sa patofiziologijom MS/EAE. Poznato je da se P2X₄ receptor pojačano eksprimira tokom MS/EAE (Guo & Schluesener 2005, Vazquez-Villoldo *i sar.* 2014) i da je njegova uloga u EAE protektivna (Zabala *i sar.* 2018). Sa druge strane, pokazano je da je povišena ekspresija P2X₇ receptora prisutna u MS/EAE proinflamacijska (Oyanguren-Desez *i sar.* 2011, Domercq & Matute 2019, Sharp *i sar.* 2008, Grygorowicz *i sar.* 2016, Grygorowicz *i sar.* 2018, Grygorowicz & Struzynska 2019). U skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Lavrnja *i sar.* 2015), ovde je potvrđeno smanjenje ekspresije gena za P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ i P2X₇ receptore. Dodatno, i P2Y receptori, čija je modulacija ekspresije u ovom modelu EAE već prikazana, mogu da regulišu aktivnost P2X receptora (Bilbao *i sar.* 2012).

Iako bi se imajući u vidu početno smanjenje genske ekspresije P2X₄ kao i porast uočen na kraju bolesti moglo spekulirati o (auto)protektivnom dejstvu opisanih promena tokom EAE, neophodne su opsežne dodatne analize na proteinskom i funkcionalnom nivou koje bi potvrdile ili opovrgnule takvu hipotezu. Celokupni rezultati ove disertacije koji se odnose na analizu ekspresije P2 receptora u opisanom modelu EAE nesumnjivo otkrivaju značaj ADP signalizacije uopšte, kao i veći značaj P2Y receptora u ovoj patologiji nego što je to prethodno bilo poznato.

Iako je poznato da adenozin za razliku od ATP ima imunosupresivna i antiinflamacijska svojstva u neuroinflamaciji (Di Virgilio & Vuerich 2015, Safarzadeh *i sar.* 2016), uloga njegovih receptora u MS/EAE patologiji nije jednoznačna. Potvrđeno je da svi P1 receptori imaju ulogu u MS/EAE, ali se njihove uloge međusobno razlikuju, kao i njihovi afiniteti za adenozin i nivo ekspresije u CNS (Safarzadeh *i sar.* 2016). Očekivano, rezultati analize genske ekspresije adenozijskih receptora

u kičmenoj moždini DA pacova tokom EAE prikazani u ovoj disertaciji pokazali su različite trendove promena: smanjenje ekspresije A_1 i A_{2b} na početku i vrhuncu bolesti, umereno povećanje A_{2a} i višestruko povećanje ekspresije A_3 u svim vremenskim tačkama EAE, a što je u skladu sa literaturnim podacima o regulaciji ekspresije ovih receptora u kičmenoj moždini miša (Wei *i sar.* 2013). Literaturni podaci uglavnom govore u prilog tome da A_1 receptor ima protektivnu ulogu u neuroinflamaciji tokom MS/EAE (Safarzadeh *i sar.* 2016). Međutim, podaci o ulozi A_{2a} receptora u patologiji nisu jednoznačni (Mills *i sar.* 2012, Melani *i sar.* 2009, Loram *i sar.* 2015, Safarzadeh *i sar.* 2016), a poznato je i da se povišena ekspresija ovog receptora zajedno smanjenjem na nivou P2Y₁₂ javlja u fazi skraćivanja nastavaka mikroglije tokom inflamacije (Orr *i sar.* 2009). Smanjena ekspresija P2Y₁₂ receptora u inicijalnoj fazi EAE prikazana u rezultatima ove disertacije praćena povišenom ekspresijom A_{2a} receptora mogla bi da bude uključena u promene morfologije mikroglije povezane sa aktivacijom ovih ćelija tokom EAE. U pogledu A_{2b} receptora dostupni literaturni podaci vezani su samo za porast u limfoidnim organima kod miša i u serumu kod MS pacijenata, u oba slučaja sa proinflamacijskim efektom (Wei *i sar.* 2013). S druge strane, u literaturi ne postoje podaci o ulozi A_3 receptora u MS/EAE, iako je poznato da ovaj receptor svojom aktivnošću inhibira produkciju TNF α (Levy *i sar.* 2006, Wei *i sar.* 2013), kao i da je njegova aktivacija prisutna u hemotaksi mikroglije (Ohsawa *i sar.* 2012), što može biti i jedan od razloga za njegovu povišenu ekspresiju uočenu u ovom istraživanju. Sve navedeno govori u prilog tome da na genskom nivou postoji diferencijalna, složena modulacija ekspresije adenzinskih receptora i adenzinske signalizacije u prikazanom modelu EAE što pruža osnov za dalja istraživanja na proteinskom i funkcionalnom nivou. Sve promene ekspresije glavnih ektonukleotidaznih enzima u EAE opisane u ovoj disertaciji, zajedno sa prethodno objavljenim promenama na funkcionalnom nivou (Lavrnja *i sar.* 2009) ukazuju na smanjenje koncentracije proinflamacijskog ATP i akumulaciju antiinflamacijskog adenzina i posledične promene u purinskoj signalizaciji, dodatno posredno potvrđene uočenom modulacijom ekspresije P1 i P2 receptora na genskom nivou.

Inicijalna faza EAE podrazumeva aktivaciju ćelija stečenog imunskog odgovora u delu perifernog limfnog sistema koji je najbliži mestu indukcije (Constantinescu *i sar.* 2011), u ovom slučaju poplitealnom limfnom čvoru. S obzirom na centralnu ulogu CD4⁺ T-limfocita u patofiziologiji EAE/MS (McFarland and Martin, 2007) kao i činjenicu da ove ćelije čine znatan deo mononuklearnih infiltrata, u daljem ispitivanju analizirana je ekspresija NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 na ovim ćelijama tokom EAE. Pored Th1 i Th17 CD4⁺ limfocita koji su nosioci patogeneze u EAE (Murphy *i sar.* 2010, Miljkovic *i sar.* 2011), ključnu ulogu u razrešenju neuroinflamacije imaju Treg limfociti koji oslobađanjem antiinflamacijskih citokina i adenzina, ali i putem površinskih molekula, suzbijaju odgovor Th ćelija i na taj način regulišu oporavak tokom EAE (Borsellino *i sar.* 2007, Ernst *i sar.* 2010, Antonioli *i sar.* 2013, Van Kaer *i sar.* 2019). Treg ćelije miša eksprimiraju NTPDaza1/CD39 kao i eN/CD73, koji se mogu smatrati markerima ovih ćelija (Borsellino *i sar.* 2007). Za razliku od miša, kod čoveka postoje dve populacije Treg ćelija, NTPDaza1⁺ i NTPDaza1⁻ pri čemu su NTPDaza1⁺ Treg ćelije veoma značajne u MS patologiji jer su stabilnije i imaju visoku sposobnost preživljavanja, proliferacije i imunosupresije u odnosu na NTPDaza1⁻ Treg ćelije (Lu *i sar.* 2015, Gu *i sar.* 2017, Álvarez-Sánchez *i sar.* 2019). Za nekoliko terapija MS koje su u upotrebi pokazano je da povećavaju ekspresiju NTPDaza1/CD39 u Treg ćelijama (Álvarez-Sánchez *i sar.* 2019). Zajednički, pomenuti podaci govore o velikom protektivnom značaju NTPDaza1⁺ Treg ćelija u MS/EAE patologiji. U tom smislu, rezultati analize ekspresije NTPDaza1/CD39 na ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da udeo NTPDaza1/CD39⁺ CD4⁺ ćelija raste tokom EAE, dostižući najviši nivo na vrhuncu bolesti, što bi moglo da ukazuje na regulatornu ulogu ovih ćelija u razrešenju neuroinflamacije nakon njihovog prodora u CNS. Nasuprot tome, udeo eN/CD73⁺

CD4⁺ ćelija ne pokazuje značajne promene u odnosu na fiziološku kontrolu, osim na kraju bolesti kada je smanjen. Postoje podaci da se ekspresija NTPDaza1/CD39 povećava na CD4⁺ T-limfocitima nakon aktivacije i to na populacijama sa memorijskim fenotipom (Regateiro *i sar.* 2013). S druge strane, značajan porast udela inače dvostruko zastupljenijih NTPDaza1⁺/CD4⁻ ćelija na početku, ali i na vrhuncu EAE verovatno je povezan sa ekspresijom ovog enzima na monocitima/makrofagima čije je masovno prisustvo pokazano u kičmenoj moždini na vrhuncu bolesti. Pored toga, postoje i druge CD4⁻ ćelije za koje je pokazano da ekspresiraju NTPDaza1/CD39 od kojih većina ima regulatornu ulogu (Boros *i sar.* 2016, Morandi *i sar.* 2018). Iako postoje oprečni podaci o ulozi ovih ćelija u MS/EAE patologiji, načelno se smatra da imaju supresivno dejstvo, pri čemu je poznato da ekspresiraju NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 (Boros *i sar.* 2016, Morandi *i sar.* 2018). Načelno, pretpostavlja se da ove ćelije iz poplitealnog limfnog čvora kroz narušenu KMB dospevaju u kičmenu moždinu gde će usled povišene ekspresije NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 izbeći ćelijsku smrt izazvanu povišenom koncentracijom ATP usled inflamacije, a to će dalje stabilizovati njihov fenotip i omogućiti im antiinflamacijsko i protektivno dejstvo u neuroinflamaciji (Álvarez-Sánchez *i sar.* 2019). Kada je u pitanju ekspresija NTPDaza2 na CD4⁺ ćelijama, ovo je prva studija u kojoj je pokazano prisustvo kao i promene u ekspresiji ove ektonukleotidaze na CD4⁺ T limfocitima tokom EAE. U pogledu udela NTPDaza2⁺CD4⁺ ćelija u drenirajućem limfnom čvoru uočava se konstitutivna ekspresija ovog enzima na ~ 30% ćelija. Tokom EAE, najpre na početku bolesti dolazi do značajnog smanjenja udela ovih ćelija, dok se na kraju bolesti njihov udeo značajno povećava, što može govoriti u prilog ulozi NTPDaza2⁺ populacije ćelija u razrešenju inflamacije. Isti trend zapaža se i u CD4⁻ populaciji, pri čemu je konstitutivni udeo znatno niži (~ 5%). S obzirom da na mikrofografijama preseka kičmene moždine tokom EAE nije uočena ekspresija NTPDaza2 na CD4⁺ ćelijama infiltrata, dok je s druge strane iz literature poznato da je za indukciju EAE presudna infiltracija CD4⁺ ćelija među kojima su NTPDaza1/CD39, kao i eN/CD73 široko zastupljene, dobijeni rezultati ukazuju da NTPDaza2⁺CD4⁺ ćelije ne prodiru u CNS te stoga nisu uključene u indukciji EAE. S druge strane, kako je pokazano da u promotorskom regionu *Entpd2* gena pacova postoje dva mesta za vezivanje IL-6 koji deluje kao supresor transkripcije (Yu *i sar.* 2008), povišen nivo IL-6 inače detektovan u plazmi i CSF kod MS pacijenata mogao bi da bude odgovoran za smanjenje ekspresije NTPDaza2 tokom EAE pokazano u ovom istraživanju. Dodatno, promotorski region humanog *ENTPD2* i mišijeg *Entpd2* sadrži i mesto za dejstvo još jednog značajnog faktora sa imunoregulatornom ulogom – GATA-3 (Chadwick & Frischauf 1997). Naime, GATA-3 je transkripcioni faktor koji određuje polarizaciju CD4⁺ ćelija ka Th2 fenotipu indukujući ekspresiju specifičnih citokina IL-4, IL-6 i IL-10 (Zhu *i sar.* 2004, Evans & Jenner 2013) i inhibirajući ekspresiju IFN γ kao glavnog citokina Th1 fenotipa (Lee *i sar.* 2000). Stoga, budući da je *ENTPD2* jedan od gena spregnutih sa GATA-3 faktorom može se pretpostaviti da njegova ekspresija na T-limfocitima zapravo karakteriše potpuno diferencirani Th2 ćelijski fenotip. Kako Th1 ima ulogu u indukciji, a Th2 u oporavku od bolesti (Nagelkerken 1998) predstavljeni rezultati mogu navesti na pretpostavku da smanjenje udela CD4⁺NTPDaza2⁺ ćelija na početku bolesti može ukazivati na dominantno prisustvo Th1 fenotipa. Nasuprot tome, porast ovih ćelija na kraju EAE može ukazivati na pomeranje u pravcu Th2 odgovora u fazi razrešenja neuroinflamacije.

Kako je u ovoj studiji analizirana razlika u zastupljenosti NTPDaza1⁺, NTPDaza2⁺ i CD73⁺ ćelija među CD4⁺ i CD4⁻ ćelijama drenirajućeg poplitealnog limfnog čvora, bez distinkcije među različitim subpopulacijama CD4 ćelija, na osnovu dobijenih rezultata moguće je izvesti samo uopštene zaključke. Prvo, obe populacije ćelija ekspresiraju sva tri ektoenzima kako u fiziološkim uslovima, tako i tokom EAE. Takođe, u fiziološkim uslovima značajan deo ukupnog broja ćelija čine NTPDaza2⁺CD4⁺, kao i CD73⁺CD4⁺ ćelije. Zatim, tokom EAE uočene su promene udela ćelija koje ekspresiraju svaki od ova tri enzima. Smanjenje udela NTPDaza2⁺ ćelija u drenirajućem limfnom

čvoru na početku i povećanje na kraju EAE ukazuje na moguću ulogu ovog enzima u promeni fenotipa imunskih ćelija iz regulatornog u inflamacijski i obrnuto. Suprotan profil promene u ovim vremenskim tačkama primećen je za NTPDaza1/CD39 i eN/CD73. Povišen udeo NTPDaza1⁺ ćelija na vrhuncu bolesti u drenirajućem limfnom čvoru ukazuje na moguće prisustvo regulatornog fenotipa T-limfocita, ali i drugih imunskih ćelija. Naposljetku, visok udeo CD73⁺ ćelija zajedno sa povišenim udelom NTPDaza1⁺ ćelija ukazuje i na protektivnu ulogu ovih enzima na samim ćelijama na kojima se ekspimiraju od citotoksičnog dejstva visoke koncentracije ATP prisutne tokom neuroinflamacije u CNS.

Remijelinizacija u MS/EAE je složen i relativno neuspešan proces (Bradl & Lassmann 2010, Lassmann 2018). U njoj učestvuju OPC, a u njihovom preživljavanju, proliferaciji, migraciji i diferencijaciji učestvuju brojni faktori, uključujući i purinske nukleotide (Agresti *i sar.* 2005, Peferoen *i sar.* 2014, Coppi *i sar.* 2015, Welsh & Kucenas 2018). Poznato je da se na OPC ekspimiraju NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 (Welsh & Kucenas 2018). U rezultatima ove disertacije nije uočeno značajno prisustvo NTPDaza1/CD39 i NTPDaza2 na ovim ćelijama. Pored toga, u ovom istraživanju je pokazano da je u *in vitro* modelu OPC - Oli-neu ćelijskoj liniji najizraženija bazalna ekspresija eN/CD73, što ukazuje na fiziološki značaj pomenute ektonukleotidaze u ovom tipu ćelija. Imajući u vidu prethodno pomenute podatke, jedan od ciljeva ove disertacije bio je utvrđivanje *in vivo* lokalizacije eN/CD73 na ćelijama oligodendrocitne linije u fiziološkim uslovima, ali i tokom EAE. U tom smislu rezultati dvostrukog imunofluorescentnog obeležavanja na eN/CD73 i markere oligodendrocitne linije (Barateiro & Fernandes 2014) u kičmenoj moždini fiziološke kontrole pokazali su da je ova ektonukleotidaza ekspimirana na OPC i nezrelim oligodendrocitima, za razliku od zrelih oligodendrocita, što je u skladu sa literaturnim podacima (Welsh & Kucenas 2018). Ekspresija eN/CD73 na prekursorskim ćelijama oligodendrocitne loze tokom EAE pokazana u rezultatima ove disertacije ukazuje na potencijalni značaj ovog enzima za OPC u ovoj patologiji. U tom smislu, u daljim ispitivanjima analizirana je ekspresija ove ektonukleotidaze u *in vitro* modelu Oli-neu ćelija pod dejstvom proinflamacijskih faktora relevantnih za MS/EAE patologiju - TNF α , IFN γ i ATP, kao i LPS. Za sve primenjene faktore pokazano je da nemaju značajnog uticaja na preživljavanje, odnosno ćelijsku smrt – nekrozu i apoptozu, što je donekle u suprotnosti sa podatkom da i TNF α , kao i IL1 β izaziva apoptozu OPC (Peferoen *i sar.* 2014). S druge strane, IFN γ i ATP su u skladu sa literaturnim podacima donekle smanjili proliferaciju (Agresti *i sar.* 1996, Agresti *i sar.* 2005), dok TNF α neočekivano nije pokazao ovaj efekat (Peferoen *i sar.* 2014). Razlike u dobijenim efektima u odnosu na literaturu najverovatnije su vezane za razlike u korišćenom modelu OPC. Kada je u pitanju morfologija ćelija, u smislu dimenzija i broja nastavaka, gotovo svi primenjeni faktori izazvali su porast oba parametra, što bi u izvesnoj meri moglo da ukazuje na pozitivan uticaj ovih faktora na diferencijaciju OPC (Pfeiffer *i sar.* 1993). LPS ne utiče na veličinu, ali povećava broj bipolarnih ćelija što ukazuje na njihovu migratornu morfologiju (Binamé *i sar.* 2013). Međutim, fiziološki značaj ovog rezultata u ovom tipu ćelija je diskutabilan (McCarthy *i sar.* 2017).

U pogledu uticaja odabranih faktora na eN/CD73, u ovom istraživanju je pokazano da TNF α i ATP dovode do povećanja ekspresije ovog enzima na genskom i proteinskom nivou, kao i do povećanja njegove aktivnosti. Imajući u vidu literaturne podatke koji govore o ekspresiji eN/CD73 isključivo na nezrelim ćelijama oligodendrocitne loze i o njegovom potpunom nestanku kod diferenciranih oligodendrocita (Zhang *i sar.* 2014, Welsh & Kucenas 2018), dobijeni rezultati ukazuju da, uprkos izazvanom porastu veličine ćelija i broja nastavaka, ovi proinflamacijski faktori bi mogli učestvovati u sprečavanju procesa diferencijacije kod OPC linije Oli-neu. TNF α je jedan od poznatih pozitivnih regulatora ekspresije i aktivnosti eN/CD73 (Kalsi *i sar.* 2002, Hunsucker *i sar.* 2005,

Grünewald & Ridley 2010, Ode *i sar.* 2011, Brisevac *i sar.* 2012), što bi moglo da ukazuje i na povezanost ovog proinflamacijskog citokina sa diferencijacijom OPC. S druge strane, za ATP je takođe pokazano da kod primarnih astrocita izaziva porast ekspresije eN/CD73 (Brisevac *i sar.* 2015), što je u skladu sa ovde pokazanim efektima na OPC. Međutim, iako je rezultujući porast AMP-hidrolizujuće aktivnosti u tom smislu bio očekivan, s obzirom na inhibitorni efekat ATP na aktivnost eN/CD37 (Zimmermann 2006), moguće je i da je dobijeni porast enzimske aktivnosti jednim delom bio posredovan i adenozinom. Naime, Oli-neu ćelije u nešto manjoj meri ekspimiraju i NTPDaza1/CD39 koja bi putem degradacije ATP i rezultujuće produkcije AMP mogla da podstakne aktivnost eN/CD73 (Zimmermann *i sar.* 2012). Pored toga, ranije je pokazano da sam eN/CD73 učestvuje u ćelijskoj adheziji, smanjujući migraciju kod primarnih astrocita (Sadej & Skladanowski 2012, Adzic & Nedeljkovic 2018). S obzirom da eN/CD73 uspostavlja snažne interakcije sa proteinima vanćelijske sredine – tenascinom C, lamininom i fibronektinom, inače značajne za proliferaciju, migraciju i diferencijaciju OPC (Kiernan *i sar.* 1996, Sadej *i sar.* 2008, Czopka *i sar.* 2009, Czopka *i sar.* 2010, Olmo *i sar.* 1992, Buttery 1999, Baron *i sar.* 2003, Chun *i sar.* 2003, Colognato *i sar.* 2004, Relucio *i sar.* 2009, Stoffels *i sar.* 2013, Lourenço *i sar.* 2016), ovde pokazan porast ekspresije eN/CD73 kod Oli-neu ćelija mogao bi dodatno da utiče i na smanjenje njihove migratorne sposobnosti. Zajedno, rezultati ovog segmenta istraživanja mogli bi da ukazuju na negativne efekte neuroinflamacije na proliferaciju, diferencijaciju kao i migraciju OPC, a time i na proces remijelinizacije tokom MS/EAE. Imajući prethodno izneseno u vidu, dalje analize neophodne su za razumevanje značaja ovog enzima za fiziologiju OPC kao i njegove uloge u procesu remijelinizacije u MS/EAE patologiji.

Imajući sve navedeno u vidu, rezultati ove studije pokazali su da tokom EAE dolazi do promena u ekspresiji svih analiziranih komponenti purinskog signalnog sistema, kako na nivou ektonukleotidaza tako i na nivou svih kategorija purinskih receptora. Dodatno, uočeni porast ekspresije glavnog ATP- i ADP- hidrolizujućeg enzima NTPDaza1/CD39 povezan je sa tranzicijom aktivirane mikroglije/makrofaga iz fenotipa nalik M1 u M2 na vrhuncu neuroinflamacije, kao i sa aktivacijom astrocita u pravcu neuroprotektivnog fenotipa, što ukazuje na antiinflamacijski uticaj porasta ekspresije ovog enzima. U pogledu NTPDaza2, rezultati ovog istraživanja pokazali su njenu veoma selektivnu ekspresiju kao i smanjenje tokom EAE vezano za astrocite u beloj masi kičmene moždine. Paralelni porast ekspresije NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 koji deluje u pravcu smanjenja nivoa proinflamacijskog ATP i povećanja antiinflamacijskog adenozina na vrhuncu EAE, mogao bi kroz modulaciju inflamacijskog miljea da doprinosi razrešenju neuroinflamacije. S druge strane, smanjenje ekspresije NTPDaza2 zajedno sa porastom NTPDaza1/CD39 moglo bi da dovede do smanjenja nivoa ADP, što zajedno sa uočenim promenama ekspresije ADP-zavisnih receptora ukazuje na značaj ADP-zavisne signalizacije u EAE/MS. S druge strane, porast ekspresije eN/CD73 na Oli-neu liniji OPC pod dejstvom proinflamacijskih faktora ukazuje na mogući inhibitorni efekat proinflamacijskih faktora prisutnih u EAE/MS na diferencijaciju OPC, a time i na proces remijelinizacije, kao i na mogući uticaj eN/CD73 ekspimirane na progenitorskim ćelijama oligodendrocitne loze u CNS na relativno neuspešnu remijelinizaciju u ovoj patologiji. Zajedno, rezultati prikazani u ovoj disertaciji pružaju novi uvid u molekularne događaje na nivou purinske signalizacije koji vode razrešenju neuroinflamacije tokom EAE i time pružaju dobar osnov za nove terapijske pristupe u lečenju MS bazirane na modulaciji purinske signalizacije.

VI ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije, a nakon analize dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. NTPDaza1/CD39 se u kičmenoj moždini pacova u fiziološkim uslovima eksprimira na mikrogliji, endotelnim ćelijama krvnih sudova, ependimskim ćelijama centralnog kanala, α -motoneuronima ventralnih rogova, kao i na astrocitima, pretežno u beloj masi. Tokom EAE u korelaciji sa težinom simptoma dolazi do porasta genske i proteinske ekspresije NTPDaza1/CD39, a glavni nosioci ove promene su aktivirana mikroglija/makrofagi, kao i ostale infiltrirane imunske ćelije.
2. Porast broja NTPDaza1⁺ rezidentnih i perifernih imunskih ćelija posebno je izražen na nivou brojnih infiltrata na vrhuncu EAE. Najveći deo ovih ćelija čine Iba1⁺ i CD68⁺ aktivirani mikroglija/makrofagi kod kojih je na početku bolesti zastupljeniji fenotip nalik M1, a na vrhuncu fenotip nalik M2, dok su u manjoj meri u obe vremenske tačke prisutne i prelazne M1/M2 forme inflamacijskog fenotipa. Tranzicija iz fenotipa nalik M1 u fenotip nalik M2 na vrhuncu EAE povezana je sa porastom ekspresije NTPDaza1/CD39. Iz ovoga sa može zaključiti da razrešenju neuroinflamacije tokom EAE prethodi promena aktivacionog statusa mikroglije/makrofaga u antiinflamacijski fenotip, dodatno potenciran visokom ekspresijom NTPDaza1/CD39. Tokom EAE paralelno sa aktivacijom mikroglije, dolazi i do aktivacije astrocita u pravcu A2 aktivacionog fenotipa.
3. U okviru mononuklearne frakcije ćelija izolovane iz kičmene moždine na vrhuncu EAE najveći deo čine CD45⁺ ćelije hematopoetskog porekla, približno polovinu CD4⁺ ćelije koje su najvećim delom T – limfociti, dok trećina ćelija koja eksprimira kostimulatorni protein CD40⁺ predstavlja uglavnom aktiviranu mikrogliju/makrofage. U okviru ovih populacija najveći deo eksprimira NTPDaza1/CD39, pri čemu je taj udeo u frakciji CD45⁺ ćelija najviši kod ćelija koje uglavnom predstavljaju makrofage, odnosno aktiviranu mikrogliju (CD45^{hi/int}).
4. U fiziološkim uslovima, NTPDaza2 se u kičmenoj moždini pacova eksprimira uglavnom na astrocitima u beloj masi, dok tokom EAE dolazi do smanjenja ekspresije NTPDaza2 koje je u obrnutoj srazmeri sa težinom simptoma. Do smanjenja dolazi usled smanjene ekspresije ovog enzima na fibroznim astrocitima. Pored astrocita i nestin⁺ progenitorske ćelije ekspimiraju NTPDaza2, s tim što je njihov broj u fiziološkim uslovima mali, dok se tokom EAE povećava. Prisustvo NTPDaza2 nije uočeno na mikrogliji/makrofagima, neuronima, zrelim oligodendrocitima/mijelinskom omotaču, kao ni na infiltriranim CD4⁺ ćelijama ni u fiziološkoj kontroli, niti tokom EAE.
5. Promene ekspresije glavnih ektonukleotidaza u kičmenoj moždini pacova tokom EAE – porast NTPDaza1/CD39 i eN/CD73 i smanjenje NTPDaza2, najizraženije na vrhuncu bolesti, praćene su promenama ekspresije svih analiziranih nukleotidnih P2 i nukleozidnih P1 purinskih receptora, sa izuzetkom A2a receptora. Genska ekspresija svih P2X purinskih receptora bila je

smanjena tokom EAE, dok se ekspresija ADP-zavisnih metabotropnih receptora i na genskom i na proteinskom nivou menjala u pravcu smanjenja za P2Y₁, početnog smanjenja a potom porasta na vrhuncu bolesti za P2Y₁₂ i porasta za P2Y₁₃. Među adenozijskim receptorima ekspresija A1 i A2b bila je smanjena, dok je kod A3 bila povišena tokom EAE. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je purinska signalizacija tokom EAE izmenjena u sadejstvu promena ekspresije purinskih receptora i ekspresije glavnih ektonukleotidaza koje deluju u pravcu smanjenja nivoa ATP i ADP, odnosno porasta adenozina.

6. NTPDaza1/CD39, NTPDaza2 i eN/CD73 eksprimiraju se i na CD4⁺ i CD4⁻ frakciji ćelija izolovanih iz drenirajućeg limfnog u kontrolnim uslovima, dok tokom EAE dolazi do promena ekspresije sve tri ektonukleotidaze u obe populacije ćelija. Tokom bolesti povećan je udeo NTPDaza1/CD39⁺ a smanjen udeo NTPDaza2⁺ ćelija u obe populacije ćelija dok je udeo eN/CD73⁺ u CD4⁺ populaciji samo na kraju bolesti smanjen, a u CD4⁻ ekspresija ove ektonukleotidaze povišena je tokom EAE.
7. Pod dejstvom proinflamacijskih faktora LPS, TNF α , ATP i IFN γ dolazi do porasta veličine ćelija i broja nastavaka u OPC⁺ liniji Oli-neu, dok nije uočen uticaj na vijabilnost i ćelijsku smrt, a samo su ATP i IFN γ smanjili proliferaciju ćelija. U fiziološkim uslovima Oli-neu ćelije najjače eksprimiraju eN/CD73 u odnosu na ostale glavne ektonukleotidaze CNS, a pod dejstvom TNF α i ATP njena ekspresija dodatno raste. S obzirom da je u kičmenoj moždini od tri glavne ektonukleotidaze jedino eN/CD73 prisutna na OPC⁺ dok je na zrelih oligodendrocitima nema, dobijeni rezultati navode na zaključak da proinflamacijski faktori uglavnom sprečavaju diferencijaciju OPC⁺, čime bi mogli da vrše negativan uticaj na remijelinizaciju tokom EAE.

Na osnovu prethodno navedenih pojedinačnih, može se izvesti i sledeći opšti zaključak:

U neuroinflamaciji prisutnoj u EAE modelu MS dolazi do fazno-specifičnih promena ekspresije svih najvažnijih komponenti purinskog signalnog sistema u kičmenoj moždini pacova. Nosioci promena ekspresije glavnih ektonukleotidaza u kičmenoj moždini su ćelije ključne za neuroinflamaciju – mikroglia i astrociti, kao rezidentne, i monociti/makrofagi, kao periferne imunske ćelije. Uočene promene ekspresije ektonukleotidaza, zajedno sa promenama na nivou purinskih receptora deluju u pravcu modulacije inflamacijskog miljea iz pro- u antiinflamacijski, što je vidljivo i po tranziciji aktivirane mikroglie/makrofaga iz fenotipa nalik M1 u fenotip nalik M2 na vrhuncu EAE, kao i paralelnoj aktivaciji astrocita u pravcu neuroprotektivnog fenotipa. Pored toga, porast ekspresije eN/CD73 na OPC⁺ linije Oli-neu pod dejstvom proinflamacijskih faktora ukazuje da bi neuroinflamacija mogla da ostvaruje negativan efekat na diferencijaciju OPC⁺ i proces remijelinizacije tokom MS/EAE. U skladu sa prethodno navedenim, prikazani rezultati predstavljaju potencijalni osnov za razvoj terapijskog pristupa koji bi podrazumevao pospešivanje razvoja antiinflamacijskih fenotipa mikroglie/makrofaga i astrocita, kao i remijelinizacije, putem modulacije purinske signalizacije u ovoj patologiji.

VII LITERATURA

Aarts SA, Seijkens TT, Kusters PJ, van Tiel CM, Reiche ME, den Toom M, Beckers L, van Roomen CP, de Winther MP, Kooij GJ (2019). "Macrophage CD40 signaling drives experimental autoimmune encephalomyelitis." *TJop* 247(4): 471-80.

Aarts SABM, Seijkens TTP, van Dorst KJF, Dijkstra CD, Kooij G, Lutgens E (2017). "The CD40-CD40L Dyad in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 8(1791).

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*, Elsevier Health Sciences.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* 37(1): 13-25.

Abbracchio MP, Burnstock G (1994). "Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" *Pharmacol Ther* 64(3): 445-75.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy." *Pharmacol Rev* 58(3): 281-341.

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009). "Purinergetic signalling in the nervous system: an overview." *Trends Neurosci* 32(1): 19-29.

Adzic M, Nedeljkovic N (2018). "Unveiling the Role of Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 in Astrocyte Migration by Using Pharmacological Tools." *Front Pharmacol* 9: 153.

Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM (2006). "Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* 203(4): 1007-19.

Agresti C, D'Urso D, Levi GJ (1996). "Reversible inhibitory effects of interferon- γ and tumour necrosis factor- α on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro." *EJON* 8(6): 1106-16.

Agresti C, Meomartini M, Amadio S, Ambrosini E, Serafini B, Franchini L, Volonte C, Aloisi F, Visentin S (2005). "Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development." *Glia* 50(2): 132-44.

Agresti C, Meomartini M, Amadio S, Ambrosini E, Volonté C, Aloisi F, Visentin S (2005). "ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors." *Brain Res* 48(2): 157-65.

Aid S, Bosetti F (2011). "Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications." *Biochimie* 93(1): 46-51.

Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73." *J Exp Med* 182(5): 1603-8.

Airas L, Jalkanen S (1996). "CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells." *Blood* 88(5): 1755-64.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011). "Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool." *Nat Neurosci* 14(9): 1142.

Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017). "The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets." *Immunol Rev* 276(1): 121-44.

Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Díaz-Sánchez M, Lardone PJ, Guerrero JM, Carrillo-Vico A (2019). "Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients." *Sci Rep* 9(1): 2302.

Amadio S, Apolloni S, D'Ambrosi N, Volonté C (2011). "Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis." *J Neurochem* 116(5): 796-805.

Amadio S, Montilli C, Magliozzi R, Bernardi G, Reynolds R, Volonte C (2010). "P2Y12 receptor protein in cortical gray matter lesions in multiple sclerosis." *Cereb Cortex* 20(6): 1263-73.

Amadio S, Parisi C, Piras E, Fabbriozzi P, Apolloni S, Montilli C, Luchetti S, Ruggieri S, Gasperini C, Laghi-Pasini F, Battistini L, Volonte C (2017). "Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 8: 1529.

Amato MP, Zipoli V, Goretti B, Portaccio E, De Caro MF, Ricchiuti L, Siracusa G, Masini M, Sorbi S, Trojano M (2006). Benign multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 1;253(8):1054-9.

Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM (2005). "Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(8): 706-15.

Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D, van Noort JM (2014). "Inflammation in neurodegenerative diseases--an update." *Immunology* 142(2): 151-66.

Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK, Hafler DA (2007). "Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells." *Science* 318(5853): 1141-3.

Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G (2013). "CD39 and CD73 in immunity and inflammation." *Trends Mol Med* 19(6): 355-67.

Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew MV, John GR (2012). "Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease." *J Clin Invest* 122(7): 2454-68.

- Arsov I, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Lukic M (1994). "Analysis of genetically determined susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in autoimmune diabetes mellitus in rats." *Srp Arh Celok Lek* 122 Suppl 1: 18-21.
- Ascherio A, Munger KL (2016). "Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update." *Semin Neurol* 36(2): 103-14.
- Bach JF (2002). "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." *N Engl J Med* 347(12): 911-20.
- Bagatini MD, Dos Santos AA, Cardoso AM, Manica A, Reschke CR, Carvalho FB (2018). "The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases." *J Immunol Res* 2018: 4892473.
- Baker D, Amor S (2014). "Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely." *Mult Scler Relat Disord* 3(5): 555-64.
- Boulay A-C, Cisternino S, Cohen-Salmon M (2016). "Immunoregulation at the gliovascular unit in the healthy brain: A focus on Connexin 43." *Brain Behav Immun* 56: 1-9.
- Bannerman P, Hahn A, Soulika A, Gallo V, Pleasure D (2007). "Astrogliosis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia." *Glia* 55(1): 57-64.
- Barateiro A, Fernandes A (2014). "Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination." *BBA* 1843(9): 1917-29.
- Barnett MH, Prineas JW (2004). "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion." *Ann Neurol* 55(4): 458-68.
- Baron W, Decker L, Colognato H (2003). "Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains." *Curr Biol* 13(2): 151-55.
- Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM (1988). "A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay." *Anal Biochem* 171(2): 266-70.
- Beaino W, Janssen B, Kooij G, van der Pol SMA, van Het Hof B, van Horsen J, Windhorst AD, de Vries HE (2017). "Purinergic receptors P2Y12R and P2X7R: potential targets for PET imaging of microglia phenotypes in multiple sclerosis." *J Neuroinflammation* 14(1): 259.
- Becher B, Bechmann I, Greter M (2006). "Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain." *J Mol Med (Berl)* 84(7): 532-43.
- Becher B, Durell BG, Miga AV, Hickey WF, Noelle RJ (2001). "The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system." *JEM* 193(8): 967-74.
- Becher B, Spath S, Goverman J (2017). "Cytokine networks in neuroinflammation." *Nat Rev Immunol* 17(1): 49-59.

- Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, Biron KE, Reickmann P, Jefferies WA, McQuaid S (2010). "Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE." *J Neuroimmunol* 229(1-2): 180-91.
- Bert A, Gran B, Weissert R (2011). "EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis." *Trends Immunol* 17(3): 119-25.
- Bilbao PS, Katz S, Boland R (2012). "Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase and steroid hormone receptors orchestrates cell function." *Purinergic Signal* 8(1): 91-103.
- Bilimoria PM, Stevens B (2015). "Microglia function during brain development: New insights from animal models." *Brain Res* 1617: 7-17.
- Binamé F, Sakry D, Dimou L, Jolivel V, Trotter J (2013). "NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins." *J Neurosci* 33(26): 10858-74.
- Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I (2018). "Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* 96(6): 1021-42.
- Bjelobaba I, Savic D, Lavrnja I (2017). "Multiple Sclerosis and Neuroinflammation: The Overview of Current and Prospective Therapies." *Curr Pharm Des* 23(5): 693-730.
- Blakely PK, Hussain S, Carlin LE, Irani DN (2015). "Astrocyte matricellular proteins that control excitatory synaptogenesis are regulated by inflammatory cytokines and correlate with paralysis severity during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Front Neurosci* 9: 344.
- Bo L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mork SJ (2003). "Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration." *Mult Scler* 9(4): 323-31.
- Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ (2014). "Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis." *Acta Neuropathol* 128(2): 191-213.
- Boison D (2008). "Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases." *Curr Opin Pharmacol* 8(1): 2-7.
- Bonora M, De Marchi E, Patergnani S, Suski JM, Celsi F, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Rimessi A, Duszynski J, Pozzan T, Wieckowski MR, Pinton P (2014). "Tumor necrosis factor-alpha impairs oligodendroglial differentiation through a mitochondria-dependent process." *Cell Death Differ* 21(8): 1198-208.
- Boros P, Ochando J, Zeher M (2016). "Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity." *Hum Immunol* 77(8): 631-36.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." *Blood* 110(4): 1225-32.

- Boue-Grabot E, Pankratov Y (2017). "Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors." *Neural Plast* 2017: 9454275.
- Boyd A, Zhang H, Williams A (2013). "Insufficient OPC migration into demyelinated lesions is a cause of poor remyelination in MS and mouse models." *Acta Neuropathol* 125(6): 841-59.
- Bozic I, Savic D, Stevanovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I (2015). "Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells." *Front Cell Neurosci* 9: 351.
- Bradl M, Lassmann H (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* 119(1): 37-53.
- Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen KL, Bethea JR (2014). "Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination." *Glia* 62(3): 452-67.
- Braun N, Sevigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H (2003). "Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain." *Eur J Neurosci* 17(7): 1355-64.
- Braun N, Sevigny J, Robson SC, Enyoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H (2000). "Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain." *Eur J Neurosci* 12(12): 4357-66.
- Braun N, Sevigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H (2004). "Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system." *Glia* 45(2): 124-32.
- Brisevac D, Adzic M, Laketa D, Parabucki A, Milosevic M, Lavrnja I, Bjelobaba I, Sevigny J, Kipp M, Nedeljkovic N (2015). "Extracellular ATP Selectively Upregulates Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 and Ecto-5'-Nucleotidase by Rat Cortical Astrocytes In Vitro." *J Mol Neurosci* 57(3): 452-62.
- Brisevac D, Bajic A, Bjelobaba I, Milosevic M, Stojiljkovic M, Beyer C, Clarner T, Kipp M, Nedeljkovic N (2013). "Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro." *J Mol Neurosci* 51(3): 871-9.
- Brisevac D, Bjelobaba I, Bajic A, Clarner T, Stojiljkovic M, Beyer C, Andjus P, Kipp M, Nedeljkovic N (2012). "Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors." *JNi* 61(5): 681-88.
- Brosnan CF, Raine CS (2013). "The astrocyte in multiple sclerosis revisited." *Glia* 61(4): 453-65.
- Broux B, Mizze MR, Vanheusden M, van der Pol S, van Horssen J, Van Wijmeersch B, Somers V, de Vries HE, Stinissen P, Hellings N (2015). "IL-15 amplifies the pathogenic properties of CD4+CD28- T cells in multiple sclerosis." *J Immunol* 194(5): 2099-109.
- Brown LS, Foster CG, Courtney J-M, King NE, Howells DW, Sutherland BA (2019). "Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain." *13*(282).

- Bruser A, Zimmermann A, Crews BC, Sliwoski G, Meiler J, König GM, Kostenis E, Lede V, Marnett LJ, Schöneberg T (2017). "Prostaglandin E2 glyceryl ester is an endogenous agonist of the nucleotide receptor P2Y6." *Sci Rep* 7(1): 2380.
- Bulavina L, Szulzewsky F, Rocha A, Krabbe G, Robson SC, Matyash V, Kettenmann H (2013). "NTPDase1 activity attenuates microglial phagocytosis." *Purinergic Signal* 9(2): 199-205.
- Burnstock G (1972). "Purinergic nerves." *Pharmacol Rev* 24(3): 509-81.
- Burnstock G (1976). "Do some nerve cells release more than one transmitter?" *Neuroscience* 1(4): 239-48.
- Burnstock G (2011). "Introductory overview of purinergic signalling." *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 896-900.
- Burnstock G (2012). "Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future." *Bioessays* 34(3): 218-25.
- Burnstock G (2016). "An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration." *Neuropharmacology* 104: 4-17.
- Burnstock G (2017). "Purinergic Signalling: Therapeutic Developments." *Front Pharmacol* 8: 661.
- Burnstock G (2018). "The therapeutic potential of purinergic signalling." *Biochem Pharmacol* 151: 157-65.
- Burnstock G, Kennedy C (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" *Gen Pharmacol* 16(5): 433-40.
- Burnstock G, Knight GE (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." *Int Rev Cytol* 240: 31-304.
- Burnstock G, Verkhratsky A (2009). "Evolutionary origins of the purinergic signalling system." *Acta Physiol (Oxf)* 195(4): 415-47.
- Butt A, Verkhratsky A (2018). "Neuroglia: Realising their true potential." *BNA* 2: 2398212818817495.
- Buttery PC (1999). "Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes." *Mol Cell Neurosci* 14(3): 199-212.
- Bynoe MS, Viret C, Yan A, Kim DG (2015). "Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood-brain door." *Fluids Barriers CNS* 12: 20.
- Calabresi PA (2004). "Diagnosis and management of multiple sclerosis." *Am Fam Physician* 70(10): 1935-44.
- Calvo J, Carbonell A, Boya J (1991). "Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats." *Brain Res* 566(1-2): 333-36.

Calza L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L (2002). "Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis." *PNAS* 99(5): 3258-63.

Chadwick BP, Frischauf A (1997). "Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes." *Mamm Genome* 8(9): 668-72.

Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, Ladoire S, Derangere V, Vincent J, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F (2012). "Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression." *Immunity* 36(3): 362-73.

Charcot MJ (1868). "Histologie de la sclerose en plaque." *Gaz Hosp* 41: 554-56.

Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, He JC, Wang XT, Chen JF, Zheng RY (2010). "Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats." *Brain Res* 1309: 116-25.

Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park HJ, Gale JT, Kidd GJ, Bernatowicz R, Gossman ZC, Chen JT, Dutta R, Trapp BD (2014). "Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain." *Nat Commun* 5: 4486.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014). "Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed." *J Neuroinflammation* 11: 98.

Chun SJ, Rasband MN, Sidman RL, Habib AA, Vartanian TJ (2003). "Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination." *J Cell Biol* 163(2): 397-408.

Coade SB, Pearson JD (1989). "Metabolism of adenine nucleotides in human blood." *Circ Res* 65(3): 531-7.

Colognato H, Ramachandrapa S, Olsen I (2004). "Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development." *J Cell Biol* 167(2): 365-75.

Compston A, Coles A (2002). "Multiple sclerosis." *Lancet* 359(9313): 1221-31.

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)." *Br J Pharmacol* 164(4): 1079-106.

Coppi E, Cellai L, Maraula G, Dettori I, Melani A, Pugliese AM, Pedata F (2015). "Role of adenosine in oligodendrocyte precursor maturation." *Front Cell Neurosci* 9: 155.

Coppi E, Maraula G, Fumagalli M, Failli P, Cellai L, Bonfanti E, Mazzoni L, Coppini R, Abbracchio MP, Pedata F, Pugliese AM (2013). "UDP-glucose enhances outward K(+) currents necessary for cell differentiation and stimulates cell migration by activating the GPR17 receptor in oligodendrocyte precursors." *Glia* 61(7): 1155-71.

Correale J, Farez M (2015). "The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression." *Front Neurol* 6(180).

Corriden R, Insel PA (2010). "Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation." *Sci Signal* 3(104): re1.

Cunningham C, Dunne A, Lopez-Rodriguez AB (2018). "Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity." *Neuroscientist*: 1073858418809941.

Czopka T, von Holst A, Faissner A (2010). "Regulatory Mechanisms that Mediate Tenascin C-Dependent Inhibition of Oligodendrocyte Precursor Differentiation." *J Neurosci* 30(37): 12310-22.

Czopka T, Von Holst A, Schmidt G, Ffrench-Constant C, Faissner A (2009). "Tenascin C and tenascin R similarly prevent the formation of myelin membranes in a RhoA-dependent manner, but antagonistically regulate the expression of myelin basic protein via a separate pathway." *Glia* 57(16): 1790-801.

Dare E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB (2007). "Modulation of glial cell functions by adenosine receptors." *Physiol Behav* 92(1-2): 15-20.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." *Nat Neurosci* 8(6): 752-8.

de Haas AH, Boddeke HW, Biber K (2008). "Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS." *Glia* 56(8): 888-94.

de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, Kester M, Leppert M, Schattenberg AV, de Witte T, van de Wiel-van Kemenade E, Dolstra H (2005). "A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia." *J Clin Invest* 115(12): 3506-16.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J-F, Enjyoji K, Linden J, Oukka M (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *JEM* 204(6): 1257-65.

Deaglio S, Robson SC (2011). "Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity." *Adv Pharmacol* 61: 301-32.

del Puerto A, Díaz-Hernández J-I, Tapia M, Gomez-Villafuertes R, Benitez MJ, Zhang J, Miras-Portugal MT, Wandosell F, Díaz-Hernández M, Garrido J (2012). "Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation." *J Cell Sci* 125(1): 176-88.

Di Virgilio F, Vuerich M (2015). "Purinergic signaling in the immune system." *Auton Neurosci* 191: 117-23.

Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A (2003). "Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability." *J Neurochem* 86(1): 246-54.

Dimitrijevic M, Kotur-Stevuljevic J, Stojic-Vukanic Z, Vujnovic I, Pilipovic I, Nacka-Aleksic M, Lepasovic G (2017). "Sex Difference in Oxidative Stress Parameters in Spinal Cord of Rats with

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Relation to Neurological Deficit." *Neurochem Res* 42(2): 481-92.

Dissing-Olesen L, LeDue JM, Rungta RL, Hefendehl JK, Choi HB, MacVicar BA (2014). "Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth." *J Neurosci* 34(32): 10511-27.

Dittel B (2008). "CD4 T cells: balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS." *Brain Behav Immun* 22(4): 421-30.

Domercq M, Matute C (2019). "Targeting P2X4 and P2X7 receptors in multiple sclerosis." *Curr Opin Pharmacol* 47: 119-25.

Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB (2016). "Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair." *Front Cell Dev Biol* 4(71).

Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* 68(3): 213-37.

Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH (2011). "A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy." *Am J Physiol Cell Physiol* 300(4): C723-42.

Dunwiddie TV, Masino SA (2001). "The role and regulation of adenosine in the central nervous system." *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55.

Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC (2007). "CD39 and control of cellular immune responses." *Purinergic Signal* 3(1-2): 171-80.

Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schafer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G (2008). "Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor." *Biochem J* 409(1): 107-16.

Eltzschig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP (2009). "Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection." *Blood* 113(1): 224-32.

Erlinge D, Burnstock G (2008). "P2 receptors in cardiovascular regulation and disease." *Purinergic Signal* 4(1): 1-20.

Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF (2010). "Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology." *J Immunol* 185(4): 1993-98.

Espada S, Ortega F, Molina-Jijón E, Rojo AI, Pérez-Sen R, Pedraza-Chaverri J, Miras-Portugal MT, Cuadrado A (2010). "The purinergic P2Y13 receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death." *Free Radical Bio Med* 49(3): 416-26.

Estess P, Nandi A, Mohamadzadeh M, Siegelman MH (1999). "Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasation through a CD44-dependent pathway in vivo." *J Exp Med* 190(1): 9-19.

Evans CM, Jenner RG (2013). "Transcription factor interplay in T helper cell differentiation." *Brief Funct genomics* 12(6): 499-511.

- Faas M, Sáez T, De Vos P (2017). "Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses?" *Mol Aspects Med* 55: 9-19.
- Farber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008). "The ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 modulates purinergic-mediated microglial migration." *Glia* 56(3): 331-41.
- Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, Moss SJ, Haydon PG (2009). "Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(35): 15037-42.
- Fellin T, Pascual O, Haydon PG (2006). "Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition." *Physiology (Bethesda)* 21: 208-15.
- Feng JF, Gao XF, Pu YY, Burnstock G, Xiang Z, He C (2015). "P2X7 receptors and Fyn kinase mediate ATP-induced oligodendrocyte progenitor cell migration." *Purinergic Signal* 11(3): 361-9.
- Fenn AM, Hall JC, Gensel JC, Popovich PG, Godbout JP (2014). "IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1 β + microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4R α after traumatic spinal cord injury." *J Neurosci* 34(26): 8904-17.
- Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1999). "P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death." *FEBS Lett* 447(1): 71-5.
- Fields RD, Burnstock G (2006). "Purinergic signalling in neuron-glia interactions." *Nat Rev Neurosci* 7(6): 423-36.
- Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J (2015). "Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function." *Brain Res* 1617: 18-27.
- Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Romagnani A, Mazzitelli S, Matteoli M, Verderio C, Grassi F (2016). "Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte-CD4 T cell bidirectional signaling." *Oncotarget* 7(5): 5143.
- Fischer W, Krugel U (2007). "P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain." *Curr Med Chem* 14(23): 2429-55.
- Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, Mills KH (2009). "CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis." *J Immunol* 183(11): 7602-10.
- Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Perdomo A, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM (2012). "Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes." *J Biol Chem* 287(9): 6454-68.

Franco R, Fernandez-Suarez D (2015). "Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system." *Prog Neurobiol* 131: 65-86.

Franke H, Illes P (2006). "Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS." *Pharmacol Ther* 109(3): 297-324.

Franke H, Verkhratsky A, Burnstock G, Illes P (2012). "Pathophysiology of astroglial purinergic signalling." *Purinergic Signal* 8(3): 629-57.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." *Pharmacol Rev* 53(4): 527-52.

Fujimoto M, Serada S, Naka T (2008). "[Role of IL-6 in the development and pathogenesis of CIA and EAE]." *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 31(2): 78-84.

Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, Zanier ER, De Simoni M (2015). "The ischemic environment drives microglia and macrophage function." *Front Neurol* 6: 81.

Gampe K, Hammer K, Kittel A, Zimmermann H (2012). "The medial habenula contains a specific nonstellate subtype of astrocyte expressing the ectonucleotidase NTPDase2." *Glia* 60(12): 1860-70.

Gampe K, Stefani J, Hammer K, Brendel P, Potzsch A, Enikolopov G, Enjyoji K, Acker-Palmer A, Robson SC, Zimmermann H (2015). "NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain." *Stem Cells* 33(1): 253-64.

Gao Z, Tsirka SE (2011). "Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis." *Neurol Res Int* 2011: 383087.

Garcia JA, Pino PA, Mizutani M, Cardona SM, Charo IF, Ransohoff RM, Forsthuber TG, Cardona A (2013). "Regulation of adaptive immunity by the fractalkine receptor during autoimmune inflammation." *J Immunol* 191(3): 1063-72.

Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D'Ambrosi N (2017). "The dual role of microglia in ALS: mechanisms and therapeutic approaches." *Front Aging Neurosci* 9: 242.

Gertig U, Hanisch UK (2014). "Microglial diversity by responses and responders." *Front Cell Neurosci* 8: 101.

Gimsa U, A OR, Pandiyan P, Teichmann D, Bechmann I, Nitsch R, Brunner-Weinzierl MC (2004). "Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152)." *J Mol Med (Berl)* 82(6): 364-72.

Göbel K, Ruck T, Meuth S (2018). "Cytokine signaling in multiple sclerosis: lost in translation." *Mult Scler J* 24(4): 432-39.

Goldenberg MM (2012). "Multiple sclerosis review." *Pharm Ther* 37(3): 175-84.

Goldmann T, Wieghofer P, Jordao MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M (2016). "Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces." *Nat Immunol* 17(7): 797-805.

- Gonzalez H, Pacheco R (2014). "T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases." *J Neuroinflammation* 11: 201.
- Gray EG, Whittaker VP (1962). "The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation." *J Anat* 96: 79-88.
- Greter M, Lelios I, Croxford A (2015). "Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation." *Front Immunol* 6: 249.
- Grkovic I, Drakulic D, Martinovic J, Mitrovic N (2019). "Role of Ectonucleotidases in Synapse Formation During Brain Development: Physiological and Pathological Implications." *Curr Neuropharmacol* 17(1): 84-98.
- Grünewald JK, Ridley AJ (2010). "CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells." *J Inflamm* 7(1): 10.
- Grygorowicz T, Dabrowska-Bouta B, Struzynska L (2018). "Administration of an antagonist of P2X7 receptor to EAE rats prevents a decrease of expression of claudin-5 in cerebral capillaries." *Purinergic Signal* 14(4): 385-93.
- Grygorowicz T, Struzynska L (2019). "Early P2X7R-dependent activation of microglia during the asymptomatic phase of autoimmune encephalomyelitis." *Inflammopharmacology* 27(1): 129-37.
- Grygorowicz T, Welniak-Kaminska M, Struzynska L (2016). "Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis." *Mol Cell Neurosci* 74: 1-9.
- Gu J, Ni X, Pan X, Lu H, Lu Y, Zhao J, Zheng SG, Hippen KL, Wang X, Lu L (2017). "Human CD39 hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions." *Cell Mol Immunol* 14(6): 521.
- Guo LH, Schluesener HJ (2005). "Lesional accumulation of P2X(4) receptor(+) macrophages in rat CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neuroscience* 134(1): 199-205.
- Haegel H, Tolg C, Hofmann M, Ceredig R (1993). "Activated mouse astrocytes and T cells express similar CD44 variants. Role of CD44 in astrocyte/T cell binding." *J Cell Biol* 122(5): 1067-77.
- Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Hoftberger R, Bagnato F, Grabner G, Trattnig S, Pfeifenbring S, Bruck W, Lassmann H (2016). "The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain." *Brain* 139(Pt 3): 807-15.
- Haindl MT, Kock U, Zeitelhofer-Adzemovic M, Fazekas F, Hochmeister S (2019). "The formation of a glial scar does not prohibit remyelination in an animal model of multiple sclerosis." *Glia* 67(3): 467-81.
- Haines JD, Inglese M, Casaccia P (2011). "Axonal damage in multiple sclerosis." *Mt Sinai J Med* 78(2): 231-43.
- Hara H, Nanri Y, Tabata E, Mitsutake S, Tabira T (2011). "Identification of astrocyte-derived immune suppressor factor that induces apoptosis of autoreactive T cells." *J Neuroimmunol* 233(1-2): 135-46.

- Haskó G, Pacher P, Deitch EA, Vizi ES (2007). "Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors." *Pharmacol Therapeut* 113(2): 264-75.
- Hauser S, Goodin D (2005). "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases." *Harrisons Principles of Internal Medicine*. 16(2): 2461.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D (2006). "The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides." *Nat Neurosci* 9(12): 1512-19.
- He F, Sun Y (2007). "Glial cells more than support cells?" *Int J Biochem Cell Biol* 39(4): 661-65.
- He Y, Taylor N, Furgeaud L, Bhattacharya A (2017). "The role of microglial P2X₇: modulation of cell death and cytokine release." *J Neuroinflammation* 14(1): 135.
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rüllicke T, Prinz M, Priller J (2005). "Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis." *Nat Med* 11(2): 146.
- Hernandez-Mir G, McGeachy MJ (2017). "CD73 is expressed by inflammatory Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but does not limit differentiation or pathogenesis." *PLoS ONE* 12(3): e0173655.
- Holick MF (2004). "Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease." *Am J Clin Nutr* 80(6 Suppl): 1678s-88s.
- Hollenbach JA, Oksenberg JR (2015). "The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review." *J Autoimmun* 64: 13-25.
- Homola M, Pfeffer M, Fischer C, Zimmermann H, Robson SC, Korf H (2015). "Expression of ectonucleotidases in the prosencephalon of melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57Bl mice: spatial distribution and time-dependent changes." *Cell Tissue Res* 362(1): 163-76.
- Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B (2016). "New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease." *Current Opinion in Neurobiology* 36: 128-34.
- Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T (2006). "MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells." *J Biol Chem* 281(29): 20095-106.
- Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, Acosta-Saltos A, Wallace A, Blight K, Buckley SM, Peebles D, Heuer H, Waddington SN, Raivich G (2010). "Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development." *Glia* 58(1): 11-28.
- Hristovska I, Pascual O (2015). "Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect." *Front Integr Neurosci* 9: 73.
- Huang D, Shi F-D, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren H-G, Biron C (2006). "The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system." *FASEB J* 20(7): 896-905.

Huizinga R, Kreft KL, Onderwater S, Boonstra JG, Brands R, Hintzen RQ, Laman JD (2012). "Endotoxin- and ATP-neutralizing activity of alkaline phosphatase as a strategy to limit neuroinflammation." *J Neuroinflammation* 9: 266.

Hunsucker SA, Mitchell BS, Spsychala JJ (2005). "The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism." *Pharmacol Therapeut* 107(1): 1-30.

Iandiev I, Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Robson SC, Zimmermann H, Bringmann A (2007). "Ectonucleotidases in Muller glial cells of the rodent retina: Involvement in inhibition of osmotic cell swelling." *Purinergic Signal* 3(4): 423-33.

Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014). "Nucleotide signalling during inflammation." *Nature* 509(7500): 310-7.

Illes P, Alexandre Ribeiro J (2004). "Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system." *Eur J Pharmacol* 483(1): 5-17.

Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009). "Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath." *Mol Neurobiol* 40(1): 55-72.

Jäkel S, Agirre E, Mendanha Falcão A, van Bruggen D, Lee KW, Knuesel I, Malhotra D, ffrench-Constant C, Williams A, Castelo-Branco G (2019). "Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis." *Nature* 566(7745): 543-47.

James G, Butt A (2001). "P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ." *Cell Calcium* 30(4): 251-59.

James S, Richardson PJ (1993). "Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse." *J Neurochem* 60(1): 219-27.

Janova H, Bottcher C, Holtman IR, Regen T, van Rossum D, Gotz A, Ernst AS, Fritsche C, Gertig U, Saiepour N, Gronke K, Wrzos C, Ribes S, Rolfes S, Weinstein J, Ehrenreich H, Pukrop T, Kopatz J, Stadelmann C, Salinas-Riester G, Weber MS, Prinz M, Bruck W, Eggen BJ, Boddeke HW, Priller J, Hanisch UK (2016). "CD14 is a key organizer of microglial responses to CNS infection and injury." *Glia* 64(4): 635-49.

Janssens K, Slaets H, Hellings N (2015). "Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis." *Ann N Y Acad Sci* 1351: 52-60.

Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, Collins DA (1999). "5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients." *Rheumatology (Oxford)* 38(5): 391-6.

Johnston JB, Silva C, Gonzalez G, Holden J, Warren KG, Metz LM, Power C (2001). "Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis." *Ann Neurol* 49(5): 650-8.

Jung M, Krämer E, Grzenkowski M, Tang K, Blakemore W, Aguzzi A, Khazaie K, Chlichlia K, Von Blankenfeld G, Kettenmann H (1995). "Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo." *Eur J Neurosci* 7(6): 1245-65.

- Junger WG (2011). "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." *Nat Rev Immunol* 11(3): 201-12.
- Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, Kilianek L, Raine CS, Selmaj K (2005). "Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor." *Brain* 128(Pt 11): 2675-88.
- Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC (1996). "Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase." *J Biol Chem* 271(51): 33116-22.
- Kadi L, Selvaraju R, de Lys P, Proudfoot AE, Wells TN, Boschert U (2006). "Differential effects of chemokines on oligodendrocyte precursor proliferation and myelin formation in vitro." *J Neuroimmunol* 174(1-2): 133-46.
- Kalkman HO, Feuerbach D (2016). "Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization." *Pharmacol Therapeut* 163: 82-93.
- Kalsi K, Lawson C, Dominguez M, Taylor P, Yacoub MH, Smolenski RT (2002). "Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF- α in human endothelial cells." *Mol Cell Biochem* 232(1-2): 113-19.
- Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H (1997). "An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain." *Neuropharmacology* 36(9): 1189-200.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011). "Physiology of microglia." *Physiol Rev* 91(2): 461-553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013). "Microglia: new roles for the synaptic stripper." *Neuron* 77(1): 10-8.
- Khakh BS (2001). "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses." *Nat Rev Neurosci* 2(3): 165-74.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP (2001). "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." *Pharmacol Rev* 53(1): 107-18.
- Kierdorf K, Masuda T, Jordão MJC, Prinz M (2019). "Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease." *Nat Rev Neurosci* 1.
- Kiernan BW, Gotz B, Faissner A, French-Constant C (1996). "Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms." *Mol Cell Neurosci* 7(4): 322-35.
- Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew MV, Voskuhl RR (2014). "Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 274(1-2): 53-61.

- Kipp M, van der Star B, Vogel DY, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2012). "Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond." *Mult Scler Relat Disord* 1(1): 15-28.
- Kipp M, Victor M, Martino G, Franklin R (2012). "Endogeneous remyelination: findings in human studies." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(5): 598-609.
- Kister I, Bacon TE, Chamot E, Salter AR, Cutter GR, Kalina JT, Herbert JT (2013). "Natural history of multiple sclerosis symptoms." *Int J MS Care* 15(3): 146-56.
- Kitada M, Rowitch DH (2006). "Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord." *Glia* 54(1): 35-46.
- Kleinewietfeld M, Hafler D (2014). "Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation." *Immunol Rev* 259(1): 231-44.
- Kobarfard F, Noroozi R, Beirami AD, Taheri M, Ghafouri-Fard S (2019). "Dys-regulation of peripheral transcript levels of ecto-5'-nucleotidase in multiple sclerosis patients." *Hum Antibodies*.
- Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010). "The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology." *Lancet Neurol* 9(5): 520-32.
- Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K, Kohsaka S (2013). "Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors." *Glia* 61(1): 47-54.
- Koning N, Swaab DF, Hoek RM, Huitinga I (2009). "Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions." *J Neuropathol Exp Neurol* 68(2): 159-67.
- Koutouros M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2014). "Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS." *Acta Neuropathol Com* 2(1): 163.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E (2005). "BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma." *J Exp Med* 201(2): 195-200.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W (2008). "Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis." *Brain* 131(Pt 7): 1749-58.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." *Purinergic Signal* 1(2): 193-204.
- Kukulski F, Levesque SA, Sevigny J (2011). "Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling." *Adv Pharmacol* 61: 263-99.

Lalic N, Mostarica-Stojkovic M, Devecerski M, Zamaklar M, Djordjevic P, Slijepcevic D, Trbojevic B, Lukic M (1991). "[Determinants of susceptibility to the induction of autoimmune diabetes in inbred strains of rats]." *Glas Srp Akad Nauka Med*(41): 161-5.

Lang PA, Merkler D, Funkner P, Shaabani N, Meryk A, Krings C, Barthuber C, Recher M, Bruck W, Haussinger D, Ohashi PS, Lang KS (2010). "Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity." *Eur J Immunol* 40(9): 2401-8.

Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008). "Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited." *Cell Tissue Res* 334(2): 199-217.

Lassmann H (2018). "Multiple Sclerosis Pathology." *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(3).

Lassmann H (2018). "Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 9: 3116.

Lavrnja I, Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Pekovic S, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Nedeljkovic N (2009). "Time-course changes in ectonucleotidase activities during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neurochem Int* 55(4): 193-8.

Lavrnja I, Laketa D, Savic D, Bozic I, Bjelobaba I, Pekovic S, Nedeljkovic N (2015). "Expression of a second ecto-5'-nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Mol Neurosci* 55(4): 898-911.

Lavrnja I, Savic D, Bjelobaba I, Dacic S, Bozic I, Parabucki A, Nedeljkovic N, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic MJ (2012). "The effect of ribavirin on reactive astrogliosis in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neurochem Res* 37(3): 221-32.

Lavrnja I, Stojkov D, Bjelobaba I, Pekovic S, Dacic S, Nedeljkovic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Rakic L, Stojiljkovic MJ (2008). "Ribavirin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats and modulates cytokine production." *Neurochem Res* 33(9): 1282-90.

Lazarowski ER (2012). "Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release." *Purinergic Signal* 8(3): 359-73.

Lazzarino G, Amorini AM, Eikelenboom MJ, Killestein J, Belli A, Di Pietro V, Tavazzi B, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Petzold A (2010). "Cerebrospinal fluid ATP metabolites in multiple sclerosis." *Mult Scler* 16(5): 549-54.

Le Duc D, Schulz A, Lede V, Schulze A, Thor D, Bruser A, Schoneberg T (2017). "P2Y Receptors in Immune Response and Inflammation." *Adv Immunol* 136: 85-121.

Lee HJ, Takemoto N, Kurata H, Kamogawa Y, Miyatake S, O'Garra A, Arai N (2000). "GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells." *J Exp Med* 192(1): 105-16.

Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR (2006). "The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF- α production in the human newborn." *J Immunol* 177(3): 1956-66.

Liddel SA, Barres BA (2017). "Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential." *Immunity* 46(6): 957-67.

Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017). "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia." *Nature* 541(7638): 481-87.

Limatola C, Ransohoff R (2014). "Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling." *Front Cell Neurosci* 8: 229.

Liu C, Li Y, Yu J, Feng L, Hou S, Liu Y, Guo M, Xie Y, Meng J, Zhang H, Xiao B, Ma C (2013). "Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil." *PLoS ONE* 8(2): e54841.

Liu JQ, Carl JW, Jr., Joshi PS, RayChaudhury A, Pu XA, Shi FD, Bai XF (2007). "CD24 on the resident cells of the central nervous system enhances experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 178(10): 6227-35.

Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC (2001). "Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions." *Am J Pathol* 158(6): 2057-66.

Liu PW, Yue MX, Zhou R, Niu J, Huang DJ, Xu T, Luo P, Liu XH, Zeng JW (2017). "P2Y12 and P2Y13 receptors involved in ADPbetas induced the release of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha from cultured dorsal horn microglia." *J Pain Res* 10: 1755-67.

Lloyd AF, Davies CL, Holloway RK, Labrak Y, Ireland G, Carradori D, Dillenburg A, Borger E, Soong D, Richardson JC, Kuhlmann T, Williams A, Pollard JW, des Rieux A, Priller J, Miron VE (2019). "Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation." *Nat Neurosci* 22(7): 1046-52.

Lohman AW, Billaud M, Isakson BE (2012). "Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall." *Cardiovasc Res* 95(3): 269-80.

Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Mizze MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, Schwaninger M, Engelhardt B, de Vries HE (2016). "Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke." *Biochim Biophys Acta* 1862(3): 461-71.

Loram LC, Strand KA, Taylor FR, Sloane E, Van Dam AM, Rieger J, Maier SF, Watkins LR (2015). "Adenosine 2A receptor agonism: A single intrathecal administration attenuates motor paralysis in experimental autoimmune encephalopathy in rats." *Brain Behav Immun* 46: 50-4.

Lourenço T, Paes de Faria J, Bippes CA, Maia J, Lopes-da-Silva JA, Relvas JB, Grãos M (2016). "Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues." *Sci Rep* 6: 21563.

Lu Y, Wang X, Gu J, Lu H, Zhang F, Li X, Qian X, Wang X, Lu L (2015). "iTreg induced from CD39+ naive T cells demonstrate enhanced proliferate and suppressive ability." *Int immunopharmacol* 28(2): 925-30.

- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol* 47(6): 707-17.
- Machado-Santos J, Saji E, Troscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, Bien CG, Bauer J, Lassmann H (2018). "The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells." *Brain* 141(7): 2066-82.
- MacVicar BA, Newman EA (2015). "Astrocyte regulation of blood flow in the brain." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(5).
- Maeda A, Sobel RA (1996). "Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(3): 300-9.
- Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H (2015). "Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis." *Lancet Neurol* 14(2): 183-93.
- Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al. (1994). "The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization." *J Immunol* 153(8): 3574-83.
- Marinelli C, Bertalot T, Zusso M, Skaper SD, Giusti P (2016). "Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage." *Front Cell Neurosci* 10(27).
- Markiewicz I, Lukomska B (2006). "The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66(4): 343-58.
- Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M (2009). "Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles." *Mol Immunol* 47(1): 141-6.
- Martinez FO, Gordon S (2015). "The evolution of our understanding of macrophages and translation of findings toward the clinic." *Expert Rev Clin Immunol* 11(1): 5-13.
- Masaki K (2015). "Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Balo's disease and neuromyelitis optica." *Neuropathology* 35(5): 469-80.
- Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J (2013). "Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica." *PLoS ONE* 8(8): e72919.
- Mateo J, Harden TK, Boyer JL (1999). "Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase." *Br J Pharmacol* 128(2): 396-402.
- Mateo J, Kreda S, Henry CE, Harden TK, Boyer JL (2003). "Requirement of Cys399 for processing of the human ecto-ATPase (NTPDase2) and its implications for determination of the activities of splice variants of the enzyme." *J Biol Chem* 278(41): 39960-8.
- Mattiace LA, Davies P, Dickson DW (1990). "Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors." *Am J Pathol* 136(5): 1101-14.

- Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sanchez-Gomez M, Domercq M (2007). "P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci* 27(35): 9525-33.
- Matyash M, Zabiegalov O, Wendt S, Matyash V, Kettenmann H (2017). "The adenosine generating enzymes CD39/CD73 control microglial processes ramification in the mouse brain." *PLoS ONE* 12(4): e0175012.
- Mayne M, Shepel PN, Jiang Y, Geiger JD, Power C (1999). "Dysregulation of adenosine A1 receptor-mediated cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients." *Ann Neurol* 45(5): 633-9.
- Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL (2012). "The innate immune system in demyelinating disease." *Immunol Rev* 248(1): 170-87.
- McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS (2008). "Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis." *Am J Pathol* 172(3): 799-808.
- McCarthy GM, Bridges CR, Blednov YA and Harris RA (2017). "CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways." *F1000Research*, 6:1144.
- McQualter JL, Bernard CC (2007). "Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair." *J Neurochem* 100(2): 295-306.
- Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N (2008). "CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells." *J Exp Med* 205(11): 2643-55.
- Melani A, Cipriani S, Vannucchi MG, Nosi D, Donati C, Bruni P, Giovannini MG, Pedata F (2009). "Selective adenosine A2a receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia." *Brain* 132(6): 1480-95.
- Menon R, Di Dario M, Cordiglieri C, Musio S, La Mantia L, Milanese C, Di Stefano AL, Crabbio M, Franciotta D, Bergamaschi R, Pedotti R, Medico E, Farina C (2012). "Gender-based blood transcriptomes and interactomes in multiple sclerosis: involvement of SP1 dependent gene transcription." *J Autoimmun* 38(2-3): J144-55.
- Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML (2011). "Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats." *J Neuroimmunol* 232(1-2): 68-74.
- Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS (2015). "Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair." *Brain* 138(Pt 5): 1138-59.
- Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canon M-H, Franconi J-M, Boiziau C (2011). "Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe

relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration." *Mult Scler J* 17(1): 2-15.

Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017). "P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases." *Glia* 65(2): 375-87.

Milicevic I, Pekovic S, Subasic S, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Medic-Mijacevic L, Pejanovic V, Rakic L, Stojiljkovic M (2003). "Ribavirin reduces clinical signs and pathological changes of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats." *J Neurosci Res* 72(2): 268-78.

Miljkovic D, Spasojevic I (2013). "Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 19(18): 2286-334.

Miljković D, Stanojević Ž, Momcilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M (2011). "CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats." *Immunobiology* 216(9): 979-87.

Mills JH, Kim DG, Krenz A, Chen JF, Bynoe MS (2012). "A2A adenosine receptor signaling in lymphocytes and the central nervous system regulates inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 188(11): 5713-22.

Mills JH, Thompson LF, Mueller C, Waickman AT, Jalkanen S, Niemela J, Airas L, Bynoe MS (2008). "CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(27): 9325-30.

Mills Ko E, Ma JH, Guo F, Miers L, Lee E, Bannerman P, Burns T, Ko D, Sohn J, Soulika AM, Pleasure D (2014). "Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model." *J Neuroinflammation* 11: 105.

Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJ (2013). "M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination." *JNn* 16(9): 1211.

Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, Ffrench-Constant C (2013). "M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination." *Nat Neurosci* 16(9): 1211-18.

Mishra BB, Mishra PK, Teale JM (2006). "Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis." *J Neuroimmunol* 181(1-2): 46-56.

Mishra SK, Braun N, Shukla V, Fullgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Sevigny J, Robson SC, Zimmermann H (2006). "Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation." *Development* 133(4): 675-84.

Misumi Y, Ogata S, Hirose S, Ikehara Y (1990). "Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid." *J Biol Chem* 265(4): 2178-83.

- Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y (1990). "Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form." *Eur J Biochem* 191(3): 563-9.
- Mittal SK, Roche PA (2015). "Suppression of antigen presentation by IL-10." *Curr Opin Immunol* 34: 22-7.
- Momcilović M, Mostarica-Stojković M, Miljković D (2012). "CXCL12 in control of neuroinflammation." *Immunol Res* 52(1): 53-63.
- Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VT, Michell-Robinson M, Leong SY, Butovsky O, Ludwin SK, Seguela P, Bar-Or A, Antel JP (2015). "P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2(2): e80.
- Moore CS, Cui QL, Warsi NM, Durafourt BA, Zorko N, Owen DR, Antel JP, Bar-Or A (2015). "Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation." *J Immunol* 194(2): 761-72.
- Moran-Jimenez M-J, Matute C (2000). "Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system." *Mol Brain Res* 78(1-2): 50-58.
- Morandi F, Horenstein A, Rizzo R, Malavasi F (2018). "The role of extracellular adenosine generation in the development of autoimmune diseases." *Mediat Inflamm* 2018.
- Morris Jr (2007). "Arginine metabolism: boundaries of our knowledge." *J Nutr* 137(6): 1602S-09S.
- Mossakowski AA, Pohlen J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, Pollok K, Mothes R, Viohl L, Radbruch M, Gerhard J, Bellmann-Strobl J, Behrens J, Infante-Duarte C, Mahler A, Boschmann M, Rinnenthal JL, Fuchtemeier M, Herz J, Pache FC, Bardua M, Priller J, Hauser AE, Paul F, Niesner R, Radbruch H (2015). "Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation." *Acta Neuropathol* 130(6): 799-814.
- Mosser DM, Edwards JP (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-69.
- Muller CE, Jacobson KA (2011). "Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs." *Biochim Biophys Acta* 1808(5): 1290-308.
- Mundt S, Mrdjen D, Utz SG, Greter M, Schreiner B, Becher B (2019). "Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation." *Sci Immunol* 4(31).
- Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH (2010). "Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain Behav Immun* 24(4): 641-51.
- Nacka-Aleksic M, Djikic J, Pilipovic I, Stojic-Vukanic Z, Kosec D, Bufan B, Arsenovic-Ranin N, Dimitrijevic M, Laposavic G (2015). "Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level." *Brain Behav Immun* 49: 101-18.

Nagelkerken L (1998). "Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelinating disease." *Braz J Med Biol* 31(1): 55-60.

Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N (2012). "Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy." *Clin Rev Allergy Immunol* 42(1): 26-34.

Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF (2005). "The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes." *Glia* 49(2): 245-58.

Nave KA, Ehrenreich H (2019). "Time to revisit oligodendrocytes in multiple sclerosis." *Nat Med* 25(3): 364-66.

Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Vjestica A, Rakic L, Stojiljkovic M (2006). "Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats." *Cell Biol Int* 30(6): 541-6.

Newman EA (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." *J Neurosci* 23(5): 1659-66.

Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *Embo j* 17(11): 3016-28.

Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Bruck W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M (2011). "A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." *Nat Med* 17(4): 495-9.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* 308(5726): 1314-8.

Nishiyama A, Boshans L, Goncalves CM, Wegrzyn J, Patel KD (2016). "Lineage, fate, and fate potential of NG2-glia." *Brain Res* 1638(Pt B): 116-28.

O'Loughlin E, Madore C, Lassmann H, Butovsky O (2018). "Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis." *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(2).

Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012). "Heterogeneity of astrocytic form and function." *Methods Mol Biol* 814: 23-45.

Ode A, Kurtz A, Schmidt-Bleek K, Schrade P, Kolar P, Buttgerit F, Lehmann K, Huttmacher D, Duda G, Kasper G (2011). "CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells." *Eur Cell Mater* 22: 26-42.

Ohsawa K, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S (2012). "Adenosine A3 receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration." *Glia* 66(2): 217-27.

Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, Boddeke HW (2012). "Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination." *Glia* 60(2): 306-21.

Oliveira-Giacomelli A, Naaldijk Y, Sarda-Arroyo L, Goncalves MCB, Correa-Velloso J, Pillat MM, de Souza HDN, Ulrich H (2018). "Purinergic Receptors in Neurological Diseases With Motor Symptoms: Targets for Therapy." *Front Pharmacol* 9: 325.

- Olmo N, Turnay J, Risse G, Deutzmann R, von der Mark K, Lizarbe MA (1992). "Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin." *Biochem J* 282 (Pt 1): 181-8.
- Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009). "Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction." *Nat Neurosci* 12(7): 872-8.
- Othman T, Yan H, Rivkees SA (2003). "Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration." *Glia* 44(2): 166-72.
- Oyanguren-Desez O, Rodriguez-Antiguedad A, Villoslada P, Domercq M, Alberdi E, Matute C (2011). "Gain-of-function of P2X7 receptor gene variants in multiple sclerosis." *Cell Calcium* 50(5): 468-72.
- Pandolfi F, Altamura S, Frosali S, Conti P (2016). "Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair." *Clin Ther* 38(5): 1017-28.
- Parabucki A, Savic D, Laketa D, Pekovic S, Stojiljkovic M, Nedeljkovic N, Bjelobaba I (2014). "Expression of major ectonucleotidases after cortical stab brain injury in rats: A real-time PCR study." *Archives of Biological Sciences* 66(1): 149-55.
- Parisi C, Napoli G, Pelegrin P, Volonté C (2016). "M1 and M2 functional imprinting of primary microglia: role of P2X7 activation and miR-125b." *Mediat Inflamm* 2016.
- Parpura V, Verkhratsky A (2012). "Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling." *Croat Med J* 53(6): 518-28.
- Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003). "P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 278(15): 13309-17.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005). "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." *Science* 310(5745): 113-6.
- Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL (1980). "Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture." *Biochem J* 190(2): 421-9.
- Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S (2014). "Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system." *Immunology* 141(3): 302-13.
- Peferoen LA, Vogel DY, Ummenthum K, Breur M, Heijnen PD, Gerritsen WH, Peferoen-Baert RM, van der Valk P, Dijkstra CD, Amor S (2015). "Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis." *J Neuropathol Exp Neurol* 74(1): 48-63.
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2016). "Astrocytes: a central element in neurological diseases." *Acta Neuropathol* 131(3): 323-45.

- Pender MP (2011). "The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis." *Neuroscientist* 17(4): 351-67.
- Pérez-Sen R, Queipo MJ, Morente V, Ortega F, Delicado EG, Miras-Portugal M (2015). "Neuroprotection mediated by P2Y13 nucleotide receptors in neurons." *Comput Struct Biotech* 13: 160-68.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn T (2009). "Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis." *PLoS Pathog* 5(4): e1000371.
- Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD (2001). "Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions." *Ann Neurol* 50(3): 389-400.
- Petkovic F, Campbell IL, Gonzalez B, Castellano B (2016). "Astrocyte-targeted production of interleukin-6 reduces astroglial and microglial activation in the cuprizone demyelination model: Implications for myelin clearance and oligodendrocyte maturation." *Glia* 64(12): 2104-19.
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes." *Trends Cell Biol.* 3(6):191-7.
- Petkovic F, Blazevski J, Momcilovic M, Mostarica Stojkovic M, Miljkovic D (2013). "Nitric oxide inhibits CXCL12 expression in neuroinflammation." *Immunol Cell Biol* 91(6): 427-34.
- Plesner L (1995). "Ecto-ATPases: identities and functions." *Int Rev Cytol* 158: 141-214.
- Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P (2009). "Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B." *PNAS* 106(35): 14978-83.
- Prineas J, Barnard R, Kwon E, Sharer L, Cho E (1993). "Multiple sclerosis: Remyelination of nascent lesions: Remyelination of nascent lesions." *Ann Neurol* 33(2): 137-51.
- Quintas C, Fraga S, Goncalves J, Queiroz G (2011). "Opposite modulation of astroglial proliferation by adenosine 5'-O-(2-thio)-diphosphate and 2-methylthioadenosine-5'-diphosphate: mechanisms involved." *Neuroscience* 182: 32-42.
- Quintas C, Vale N, Gonçalves J, Queiroz G (2018). "Microglia P2Y13 Receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y1 Receptors." *Front Pharmacol* 9(418).
- Ralevic V, Burnstock G (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* 50(3): 413-92.
- Ransohoff RM (2007). "Microgliosis: the questions shape the answers." *Nat Neurosci* 10: 1507.
- Ransohoff RM (2016). "A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?" *Nat Neurosci* 19(8): 987-91.
- Ransohoff RM, Brown MA (2012). "Innate immunity in the central nervous system." *J Clin Invest* 122(4): 1164-71.

- Ransohoff RM, Perry VH (2009). "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses." *Annu Rev Immunol* 27: 119-45.
- Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H (2013). "CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments." *Clin Exp Immunol* 171(1): 1-7.
- Relucio J, Tzvetanova ID, Ao W, Lindquist S, Colognato H (2009). "Laminin alters fyn regulatory mechanisms and promotes oligodendrocyte development." *J Neurosci* 29(38): 11794-806.
- Ridderstad Wollberg A, Ericsson-Dahlstrand A, Juréus A, Ekerot P, Simon S, Nilsson M, Wiklund S-J, Berg A-L, Ferm M, Sunnemark D, Johansson R (2014). "Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis." *PNAS* 111(14): 5409-14.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." *Purinergic Signal* 2(2): 409-30.
- Rocha A (2014). E-NTPDase 1 modulation of neuronal and astrocytic activity in the CNS.
- Rochfort KD, Collins LE, McLoughlin A, Cummins PM (2016). "Tumour necrosis factor-alpha-mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6." *J Neurochem* 136(3): 564-72.
- Rodrigues RJ, Tomé AR, Cunha R (2015). "ATP as a multi-target danger signal in the brain." *Front Neurosci* 9: 148.
- Rumble JM, Huber AK, Krishnamoorthy G, Srinivasan A, Giles DA, Zhang X, Wang L, Segal B (2015). "Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS." *J Exp Med* 212(1): 23-35.
- Sabo JK, Aumann TD, Merlo D, Kilpatrick TJ, Cate HS (2011). "Remyelination is altered by bone morphogenic protein signaling in demyelinated lesions." *J Neurosci* 31(12): 4504-10.
- Sadej R, Inai K, Rajfur Z, Ostapkowicz A, Kohler J, Skladanowski AC, Mitchell BS, Sychala J (2008). "Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells." *Biochim Biophys Acta* 1782(1): 35-40.
- Sadej R, Skladanowski A (2012). "Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells." *Acta Biochim Pol* 59(4).
- Sadovnick AD (2013). "Differential effects of genetic susceptibility factors in males and females with multiple sclerosis." *Clin Immunol* 149(2): 170-5.
- Safarzadeh E, Jadidi-Niaragh F, Motallebnezhad M, Yousefi M (2016). "The role of adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." *Inflamm Res* 65(7): 511-20.
- Saijo K, Glass CK (2011). "Microglial cell origin and phenotypes in health and disease." *Nat Rev Immunol* 11(11): 775-87.
- Saikali P, Antel JP, Pittet CL, Newcombe J, Arbour N (2010). "Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis." *J Immunol* 185(10): 5693-703.

- Salou M, Nicol B, Garcia A, Laplaud DA (2015). "Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 6: 604.
- Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, Kohsaka S (2003). "Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain." *Glia* 44(3): 242-50.
- Savarin C, Hinton DR, Valentin-Torres A, Chen Z, Trapp BD, Bergmann CC, Stohlman SA (2015). "Astrocyte response to IFN-gamma limits IL-6-mediated microglia activation and progressive autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroinflammation* 12: 79.
- Schaefer U, Machida T, Broekman MJ, Marcus AJ, Levi R (2007). "Targeted deletion of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/CD39 leads to desensitization of pre- and postsynaptic purinergic P2 receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 322(3): 1269-77.
- Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, Kosenburger K, Yang JW, Waldhoer M, Sitte HH, Boehm S (2009). "A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides." *Biochim Biophys Acta* 1793(2): 325-34.
- Schulte G, Fredholm BB (2003). "Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases." *Cell Signal* 15(9): 813-27.
- Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, Yoshida H, Nishikawa T, Terabe F, Ohkawara T (2008). "IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." *PNAS* 105(26): 9041-46.
- Sevigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC (2002). "Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation." *Blood* 99(8): 2801-9.
- Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, Feinstein DL (2008). "P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroinflammation* 5: 33.
- Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, Kim K-W, Klein E, Kalchenko V, Bendel PJI (2013). "Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus." *38(3): 555-69.*
- Shin T, Lee Y, Sim K (2003). "Embryonic intermediate filaments, nestin and vimentin, expression in the spinal cords of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Vet Sci* 4(1): 9-14.
- Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S (2017). "Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y₁ Receptor Downregulation." *Cell Rep* 19(6): 1151-64.
- Shukla V, Zimmermann H, Wang L, Kettenmann H, Raab S, Hammer K, Sevigny J, Robson SC, Braun N (2005). "Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus." *J Neurosci Res* 80(5): 600-10.

- Simard M, Nedergaard M (2004). "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis." *Neuroscience* 129(4): 877-96.
- Siskova Z, Tremblay ME (2013). "Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration." *Neural Plast* 2013: 425845.
- Sofroniew MV (2015). "Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation." *Nat Rev Neurosci* 16(5): 249-63.
- Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thome G, Bagatini M, Correa M, Rosa C, Stefanello N, Belle LP, Moretto MB, Oliveira L, Morsch VM, Schetinger MR (2010). "The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients." *Clin Chim Acta* 411(3-4): 210-4.
- Sriram S, Steiner I (2005). "Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis." *Ann Neurol* 58(6): 939-45.
- Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV (2003). "Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase." *J Cell Sci* 116(Pt 22): 4615-28.
- Stanisavljevic S, Cepic A, Bojic S, Veljovic K, Mihajlovic S, Dedovic N, Jevtic B, Momcilovic M, Lazarevic M, Mostarica Stojkovic M, Miljkovic D, Golic N (2019). "Oral neonatal antibiotic treatment perturbs gut microbiota and aggravates central nervous system autoimmunity in Dark Agouti rats." *Sci Rep* 9(1): 918.
- Steelman AJ, Smith R, 3rd, Welsh CJ, Li J (2013). "Galectin-9 protein is up-regulated in astrocytes by tumor necrosis factor and promotes encephalitogenic T-cell apoptosis." *J Biol Chem* 288(33): 23776-87.
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields R (2002). "Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials." *Neuron* 36(5): 855-68.
- Stoffels JM, de Jonge JC, Stancic M, Nomden A, van Strien ME, Ma D, Šišková Z, Maier O, Ffrench-Constant C, Franklin R (2013). "Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination." *Brain* 136(1): 116-31.
- Stojic-Vukanic Z, Kotur-Stevuljevic J, Nacka-Aleksic M, Kosec D, Vujnovic I, Pilipovic I, Dimitrijevic M, Lepasovic G (2018). "Sex Bias in Pathogenesis of Autoimmune Neuroinflammation: Relevance for Dimethyl Fumarate Immunomodulatory/Anti-oxidant Action." *Mol Neurobiol* 55(5): 3755-74.
- Stout JG, Kirley TL (1996). "Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity." *Biochemistry* 35(25): 8289-98.
- Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJ (2012). "Will the real multiple sclerosis please stand up?" *Nat Rev Neurosci* 13(7): 507-14.
- Sunderman FW, Jr. (1990). "The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase." *Ann Clin Lab Sci* 20(2): 123-39.

Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M, Wallström E, Lassmann H, Olsson T, Berg A-L, Ericsson-Dahlstrand AJ (2005). "CX 3 CL1 (fractalkine) and CX 3 CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin." *Glia* 2(1): 17.

Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV (2016). "Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways." *Nat Neurosci* 19(6): 771-83.

Tanabe S, Saitoh S, Miyajima H, Itokazu T, Yamashita T (2019). "Microglia suppress the secondary progression of autoimmune encephalomyelitis." *Glia*

Tepavcevic V, Kerninon C, Aigrot MS, Meppiel E, Mozafari S, Arnould-Laurent R, Ravassard P, Kennedy TE, Nait-Oumesmar B, Lubetzki C (2014). "Early netrin-1 expression impairs central nervous system remyelination." *Ann Neurol* 76(2): 252-68.

Thiel VE, Audus KL (2001). "Nitric oxide and blood-brain barrier integrity." *Antioxid Redox Signal* 3(2): 273-8.

Toft-Hansen H, Fuchtbauer L, Owens T (2011). "Inhibition of reactive astrogliosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease." *Glia* 59(1): 166-76.

Traka M, Podojil JR, McCarthy DP, Miller SD, Popko B (2015). "Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination." *Nat Neurosci* 19: 65.

Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T (1997). "Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 74(1-2): 121-9.

Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, Battapady H, Mork S, Ontaneda D, Jones SE, Fox RJ, Chen J, Nakamura K, Rudick RA (2018). "Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study." *Lancet Neurol* 17(10): 870-84.

Tsutsui S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S, Yong VW, Winston BW, Warren K, Power C (2004). "A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis." *J Neurosci* 24(6): 1521-9.

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Ortensi B, Pelicci G, D'Elia MM, Ballerini C, Baldari C (2019). "A T Cell Suppressive Circuitry Mediated by CD39 and Regulated by ShcC/Rai Is Induced in Astrocytes by Encephalitogenic T Cells." *Front Immunol* 10(1041).

Van der Poel M, Ulas T, Mizze MR, Hsiao C-C, Miedema SS, Schuurman KG, Helder B, Tas SW, Schultze JL, Hamann J (2019). "Transcriptional profiling of human microglia reveals grey-white matter heterogeneity and multiple sclerosis-associated changes." *Nat Comm* 10(1): 1139.

Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L (2019). "Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE." *Cell Mol Immunol* 16(6): 531-39.

Vazana U, Veksler R, Pell GS, Prager O, Fassler M, Chassidim Y, Roth Y, Shahar H, Zangen A, Raccach R, Onesti E, Ceccanti M, Colonnese C, Santoro A, Salvati M, D'Elia A, Nucciarelli V, Inghilleri M, Friedman A (2016). "Glutamate-Mediated Blood-Brain Barrier Opening: Implications for Neuroprotection and Drug Delivery." *J Neurosci* 36(29): 7727-39.

Vazquez-Villoldo N, Domercq M, Martin A, Llop J, Gomez-Vallejo V, Matute C (2014). "P2X4 receptors control the fate and survival of activated microglia." *Glia* 62(2): 171-84.

Verkhratsky A (2005). "Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons." *Physiol Rev* 85(1): 201-79.

Verkhratsky A, Butt A (2013). *Glial physiology and pathophysiology*, John Wiley & Sons.

Vlajkovic SM, Housley GD, Greenwood D, Thorne PR (1999). "Evidence for alternative splicing of ecto-ATPase associated with termination of purinergic transmission." *Brain Res Mol Brain Res* 73(1-2): 85-92.

Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013). "Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status." *J Neuroinflammation* 10: 35.

Volonté C, Apolloni S, Parisi C, Amadio S (2016). "Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis." *Neuropharmacology* 104: 180-93.

Vora P, Pillai P, Mustapha J, Kowal C, Shaffer S, Bose R, Namaka M, Frost EE (2012). "CXCL1 regulation of oligodendrocyte progenitor cell migration is independent of calcium signaling." *Exp Neurol* 236(2): 259-67.

Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV (2009). "Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS." *J Neurosci* 29(37): 11511-22.

Voss EV, Skuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M (2012). "Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment?" *Neurobiol Dis* 45(1): 519-28.

Wall MJ, Dale N (2007). "Auto-inhibition of rat parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity-dependent adenosine release." *J Physiol* 581(Pt 2): 553-65.

Wang J, Zhang X, Mu L, Zhang M, Gao Z, Zhang J, Yao X, Liu C, Wang G, Wang D, Kong Q, Liu Y, Li N, Sun B, Li H (2014). "t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Clin Immunol* 152(1-2): 90-100.

Wang K, Ye L, Lu H, Chen H, Zhang Y, Huang Y, Zheng JC (2017). "TNF-alpha promotes extracellular vesicle release in mouse astrocytes through glutaminase." *J Neuroinflammation* 14(1): 87.

Wang TF, Guidotti G (1996). "CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase." *J Biol Chem* 271(17): 9898-901.

- Wang TF, Ou Y, Guidotti G (1998). "The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure." *J Biol Chem* 273(38): 24814-21.
- Wang TF, Rosenberg PA, Guidotti G (1997). "Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene." *Brain Res Mol Brain Res* 47(1-2): 295-302.
- Wang X, Haroon F, Karray S, Martina D, Schluter D (2013). "Astrocytic Fas ligand expression is required to induce T-cell apoptosis and recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." *Eur J Immunol* 43(1): 115-24.
- Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC, Brown KA (1996). "IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes." *Clin Exp Immunol* 105(1): 112-9.
- Wei W, Du C, Lv J, Zhao G, Li Z, Wu Z, Hasko G, Xie X (2013). "Blocking A2B adenosine receptor alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of IL-6 production and Th17 differentiation." *J Immunol* 190(1): 138-46.
- Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, Camden JM, Erb L (2012). "Neuroprotective roles of the P2Y₂ receptor." *Purinergic signal*. 8(3):559-78.
- Wekerle H, Sun DM (2010). "Fragile privileges: autoimmunity in brain and eye." *Acta Pharmacol Sin* 31(9): 1141-8.
- Welsh TG, Kucenas S (2018). "Purinergic signaling in oligodendrocyte development and function." *J Neurochem* 145(1): 6-18.
- White CA, McCombe PA, Pender M (1998). "Microglia are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95)." *Int Immunol* 10(7): 935-41.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sevigny J, Battastini AM, Robson SC (2006). "Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes." *Neuroscience* 138(2): 421-32.
- Witts EC, Panetta KM, Miles GB (2011). "Glial-derived adenosine modulates spinal motor networks in mice." *J Neurophysiol* 107(7): 1925-34.
- Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H (2017). "Microglia in Physiology and Disease." *Annu Rev Physiol* 79: 619-43.
- Wootla B, Eriguchi M, Rodriguez M (2012). "Is multiple sclerosis an autoimmune disease?" *Autoimmune Dis* 2012: 969657.
- Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, Dwyer KM, Bianchi E, Usheva A, Robson SC (2006). "RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity." *Biochem J* 396(1): 23-30.
- Xiao BG, Xu LY, Yang JS, Huang YM, Link H (2000). "An alternative pathway of nitric oxide production by rat astrocytes requires specific antigen and T cell contact." *Neurosci Lett* 283(1): 53-6.
- Xu L, Hilliard B, Carmody RJ, Tsabary G, Shin H, Christianson DW, Chen Y (2003). "Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system." *Immunology* 110(1): 141-48.

Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM (2014). "Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system." *J Exp Med* 211(8): 1533-49.

Yegutkin GG (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." *Biochim Biophys Acta* 1783(5): 673-94.

Yegutkin GG (2014). "Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(6): 473-97.

Yegutkin GG, Samburski SS, Mortensen SP, Jalkanen S, Gonzalez-Alonso J (2007). "Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans." *J Physiol* 579(Pt 2): 553-64.

Yegutkin GG, Wieringa B, Robson SC, Jalkanen S (2012). "Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities." *Faseb j* 26(9): 3875-83.

Yeung MS, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Brundin L (2014). "Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain." *Cell* 159(4): 766-74.

Yi W, Schluter D, Wang X (2019). "Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity." *Brain Behav Immun*.

Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006). "COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." *BMC Neurol* 6: 12.

Yu J, Lavoie ÉG, Sheung N, Tremblay JJ, Sévigny J, Dranoff J (2008). "IL-6 downregulates transcription of NTPDase2 via specific promoter elements." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(3): G748-G56.

Yurlova L, Kahya N, Aggarwal S, Kaiser HJ, Chiantia S, Bakhti M, Pewzner-Jung Y, Ben-David O, Futerman AH, Brugger B, Simons M (2011). "Self-segregation of myelin membrane lipids in model membranes." *Biophys J* 101(11): 2713-20.

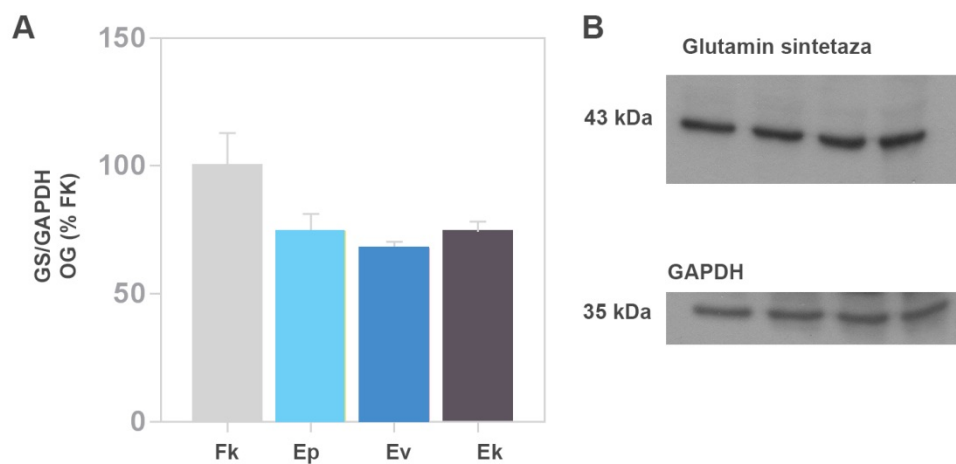
Zabala A, Vazquez-Villoldo N, Rissiek B, Gejo J, Martin A, Palomino A, Perez-Samartin A, Pulagam KR, Lukowiak M, Capetillo-Zarate E, Llop J, Magnus T, Koch-Nolte F, Rassendren F, Matute C, Domercq M (2018). "P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis." *EMBO Mol Med* 10(8).

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012). "Genomic analysis of reactive astrogliosis." *J Neurosci* 32(18): 6391-410.

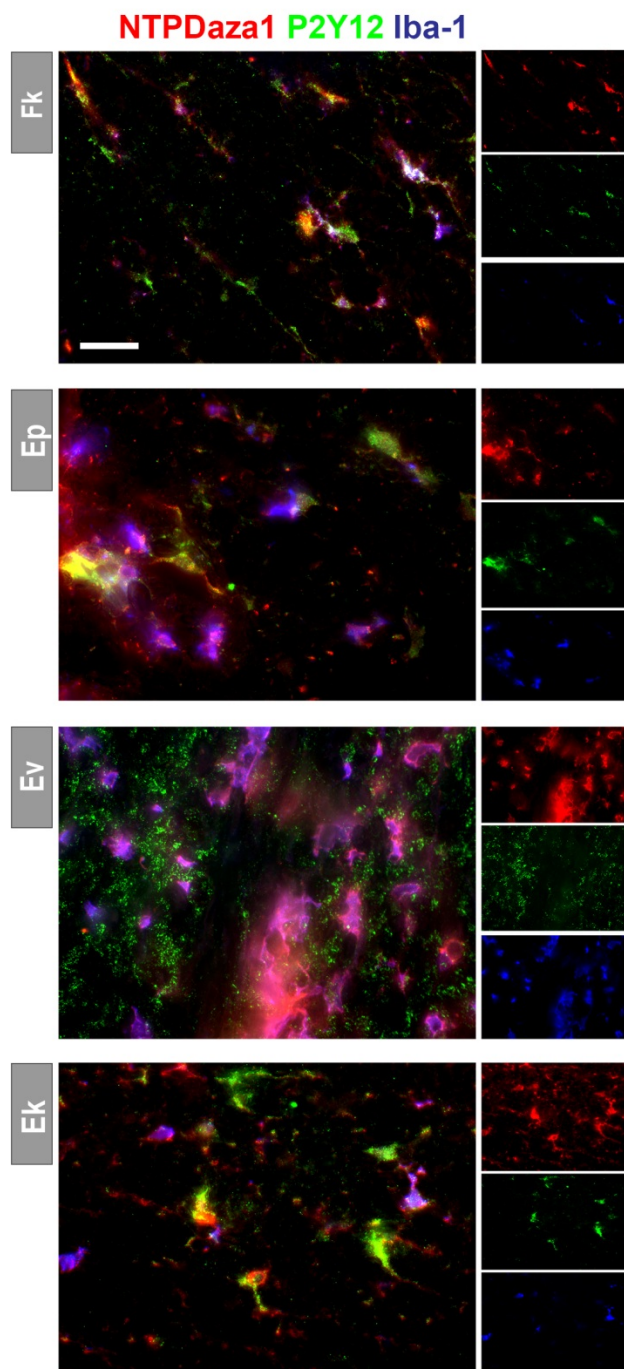
Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LF, Filho AZ, Moreira JC, Morrone FB, Sevigny J, Schetinger MR, de Souza Wyse AT, Battastini AM (2012). "Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase." *PLoS ONE* 7(2): e31205.

- Zhang G-X, Li J, Ventura E, Rostami A (2002). "Parenchymal microglia of naive adult C57BL/6J mice express high levels of B7. 1, B7. 2, and MHC class II." *Exp Mol Pathol* 73(1): 35-45.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003). "ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression." *Neuron* 40(5): 971-82.
- Zhang X, Li QY, Xiao BG (2012). "Anti-inflammatory effect of erythropoietin therapy on experimental autoimmune encephalomyelitis." *Int J Neurosci* 122(5): 255-62.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014). "An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex." *J Neurosci* 34(36): 11929-47.
- Zhong X, Malhotra R, Woodruff R, Guidotti G (2001). "Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization." *J Biol Chem* 276(44): 41518-25.
- Zhou YX, Flint NC, Murtie JC, Le TQ, Armstrong RC (2006). "Retroviral lineage analysis of fibroblast growth factor receptor signaling in FGF2 inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation." *Glia* 54(6): 578-90.
- Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS (2003). "Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Am J Pathol* 162(5): 1639-50.
- Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban Jr JF, Guo L, Paul W (2004). "Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T H 1-T H 2 responses." *Nat Immunol* 5(11): 1157.
- Zimmermann H (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects." *Biochem J* 285 (Pt 2): 345-65.
- Zimmermann H, Braun N (1996). "Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system." *J Auton Pharmacol* 16(6): 397-400.
- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases." *Purinergic Signal* 8(3): 437-502.
- Zlokovic BV (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." *Neuron* 57(2): 178-201.
- Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H (2017). "Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis." *Brain* 140(7): 1900-13.

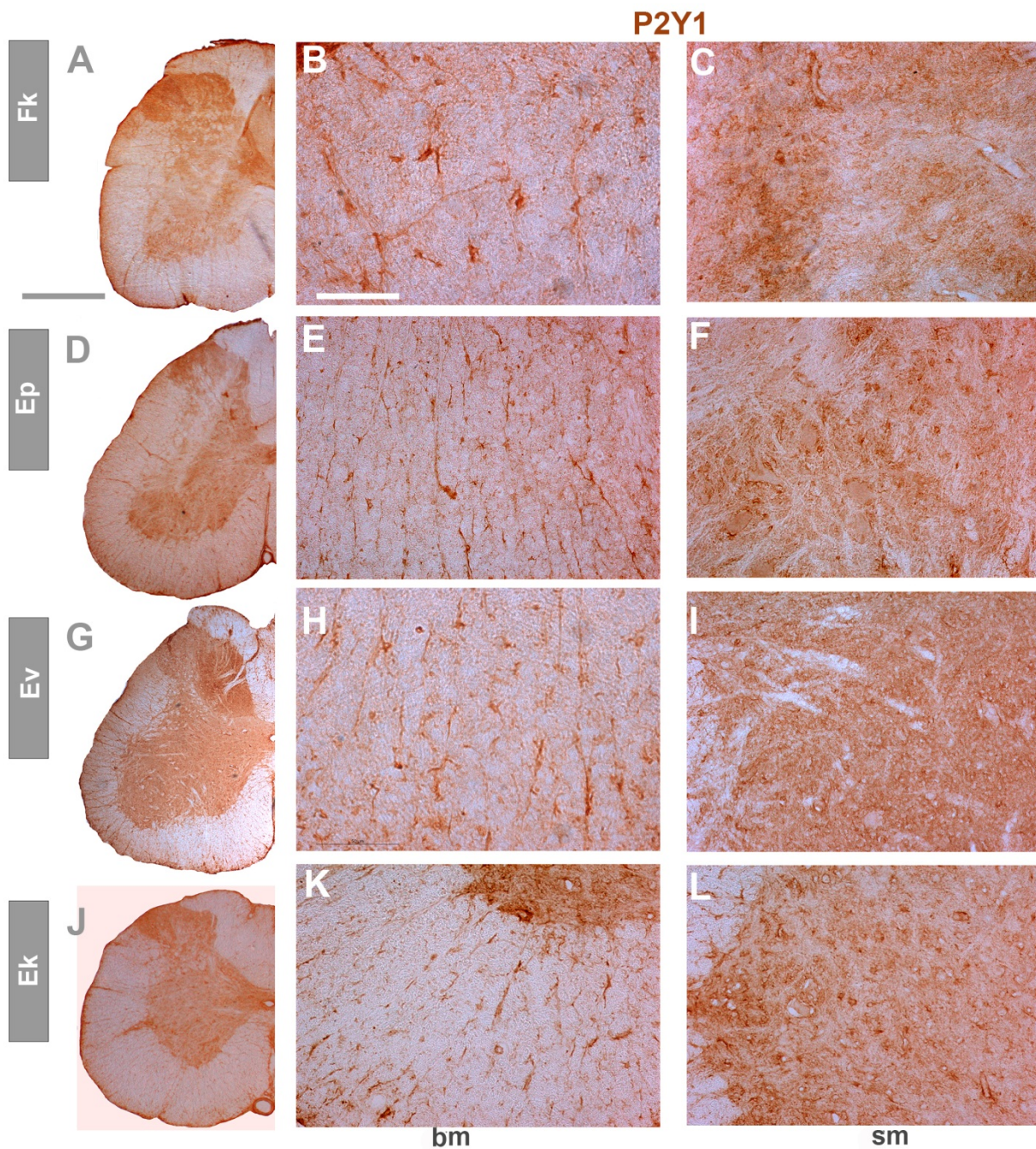
VIII PRILOZI



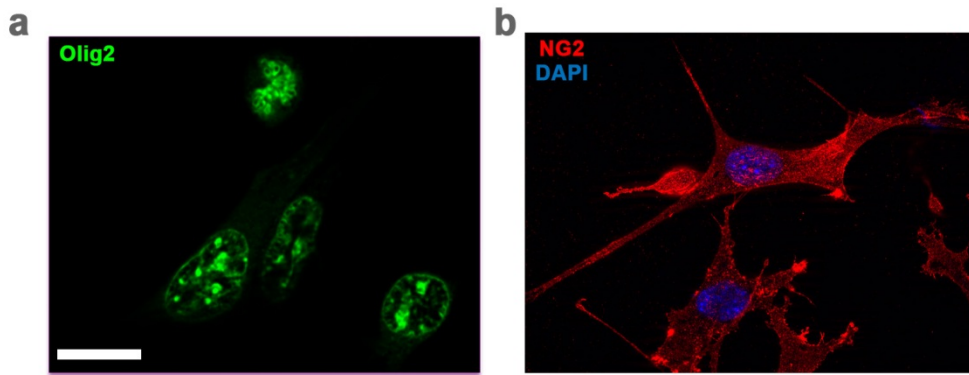
Prilog 1. Ekspresija GS na proteinskom nivou tokom EAE. (A) Kvantifikacija traka koje odgovaraju enzimu GS i endogenoj kontroli (GAPDH) sa istih membrana. Intenzitet svake vizuelizovane trake za protein od interesa određen je denzitometrijski pomoću ImageJ® softvera i izražen u odnosu na optičku gustinu (OG) trake za GAPDH u istoj koloni (protein od interesa/ GAPDH odnos). Vrednosti dobijene za kontrolnu grupu predstavljene su na grafiku kao 100% (\pm SEM), a vrednosti za ostale eksperimentalne grupe predstavljene su kao % u odnosu na kontrolu. Denzitometrijska analiza je urađena iz najmanje 4 imunoblota, iz 2 nezavisna eksperimenta. (B) Reprezentativni radiografski filmovi dobijeni hemiluminiscentnom vizuelizacijom proteinskih traka za GS i GAPDH.



Prilog 2. Kolokalizacija NTPDaza1/CD39, P2Y₁₂ i Iba1. (a) Reprezentativne mikrografije bele mase kičmene moždine u kontroli i tokom EAE koje prikazuju trostruko imunofluorescentno bojenje – NTPDaza1/CD39 (crvena fluorescencija), P2Y₁₂ (zeleni fluorescencija) i Iba1 (plava fluorescencija). Skala veličine za sve mikrografije: 20 μm.



Prilog 3. Imunohistohemijska lokalizacija P2Y₁ u KM tokom EAE. Mikrografije malog uvećanja prikazuju lokalizaciju P2Y₁ receptora na presecima kičmene moždine u Fk i tokom EAE (A, D, G, J). Skala veličine: 500 μ m (A). Mikrografije velikog uvećanja načinjene u beloj (B, E, H, K) i sivoj masi (C, F, I, L). Skala veličine 50 μ m (B).



Prilog 4. Ekspresija Olig2 i NG2 markera OPC u Oli-neu ćelijskoj liniji. Reprezentativne mikrografije pokazuju ekspresiju Olig2 – zelena fluorescencija (a) i NG2 – crvena fluorescencija (b) u Oli-neu ćelijama nakon gajenja 48 h u eksperimentalnim uslovima bez tretmana. Jedra ćelija obojena su DAPI bojom (plava fluorescencija). Skala veličine za obe mikrografije: 20 μm .

IX BIOGRAFIJA

Marija A. Jakovljević (rođ. Jovanović) rođena je 30. avgusta 1986. g. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu “Kralj Petar I” i prirodno-matematički smer Prve gimnazije. Osnovne akademske studije upisala je školske 2005/2006 g. na Biološkom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija - eksperimentalna biomedicina. Tokom osnovnih studija 2009. g. bila je dobitnik DAAD stipendije za dvomesečno usavršavanje nemačkog jezika u Berlinu, Nemačka, a 2010. g. pored volontiranja u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama u periodu od februara do juna na Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjering (IMGGI) u Beogradu, bila je dobitnik Bayhost stipendije za dvomesečnu letnju praksu na Institutu za radiobiologiju Helmholtz centra u Minhenu, Nemačka i stipendije za dvomesečnu letnju praksu na Institutu za signalne puteve i funkcionalnu genomiku renomiranog Nemačkog Instituta za istraživanje kancera (DKFZ) u Hajdelbergu, Nemačka gde je boravila od juna do oktobra te godine. Diplomski rad pod nazivom “Uticaj zračenja na ekspresiju miRNK u ćelijskim linijama kancera dojke” odbranila je 2012. g.

Od februara do novembra 2013. g. kao zaposleni i DAAD stipendista za studijski boravak usavršavala se na Institutu za neuroanatomiju Medicinskog Fakulteta RWTH Univerziteta u Ahenu, Nemačka, nakon čega je angažovana u Laboratoriji za neurohemiju na Odeljenju za neurobiologiju na Institutu za biološka istraživanja “Siniša Stanković” u okviru nacionalnog projekta “Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju” (MPNTR, III41014) u svojstvu istraživača pripravnika, a od novembra 2015. g. istraživača saradnika. Doktorske studije upisala je školske 2013/2014 g. na Biološkom Fakultetu Univerziteta u Beogradu – studijski program Biologija, smer Eksperimentalna neurobiologija. Pohađala je jednomesečni praktični kurs iz Neurobiologije na Institutu za biologiju, Fakulteta bioloških nauka, farmacije i psihologije, Univerziteta u Lajpcigu organizovanog u okviru DAAD projekta “Academic Synapsing in the Balkans” u novembru 2014. g.

Angažovana je u izvođenju praktične nastave na kursu Neurobiologija na osnovnim akademskim studijama od školske 2016/2017. Bila je instruktor neurobioloških metoda u okviru IBRO radionice za studente “Stain the Brain” na Biološkom Fakultetu BU 2019. g. i letnje škole za studente “The role of astrocytes and oligodendrocytes in health and disease” u IS Petnica 2014. g. u okviru DAAD projekta „DAAD Akademischer Neuaufbau Sudosteuropa“, kao i instruktor rada u ćelijskoj kulturi na letnjem seminaru za srednjoškolce u IS Petnica 2014. g. Pored toga, bila je dobitnik nekoliko stipendija i učesnik nekoliko škola i radionica iz oblasti neurobiologije i akademskih veština, među kojima su najznačajnije FENS-IBRO stipendija za učešće u školi “Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases – Finding a Common Ground” u Bragi, Portugalija održanoj u aprilu 2019. g. i “8th EFIS – EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2016)” u Draču, Albanija u oktobru 2016. g.

Autor je 2 (M21 kategorija) i koautor 4 naučne publikacije (M20) u međunarodnim vodećim časopisima, kao i brojnih saopštenja na međunarodnim kongresima (M34). Između ostalih, dobitnik je IBRO stipendije za učešće na FENS regionalnom kongresu održanom u septembru 2017. g. u Pečuju, Mađarska. Član je Srpskog Biološkog društva, Srpskog društva za neuronauke (DNS) i Evropske federacije društava za neuronauke (FENS). Od 2012. g. aktivno učestvuje u popularizaciji nauke u okviru manifestacija “Festival nauke” i “Noć istraživača”.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија А. Јаковљевић

број индекса Б3049/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демијелинизацији – импликације у мултиплој склерози

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

Потпис докторанда



У Београду, 20.02.2020.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија А. Јаковљевић

Број индекса Б3049/2013

Студијски програм Биологија – Експериментална неуробиологија

Наслов рада Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демиелинизацији – импликације у мултиплој склерози

Ментор др Данијела Лакета и др Ирена Лаврња

Потписани/а Марија А. Јаковљевић

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

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 20.02.2020.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демиелинизацији – импликације у мултиплој склерози

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 20.02.2020.

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