

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Željka S. Stanojević

**UTICAJ METILPREDNIZOLONA NA
EKSPRESIJU I PRODUKCIJU
INTERFERONA- γ I INTERLEUKINA-17 U
EKSPERIMENTALNOM
AUTOIMUNSKOM
ENCEFALOMIJELITISU**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Željka S. Stanojević

**EFFECTS OF METHYLPREDNISOLONE
ON EXPRESSION AND PRODUCTION OF
INTERFERON- γ AND INTERLEUKIN-17
IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE
ENCEPHALOMYELITIS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2012

Mentor: dr Marija Mostarica-Stojković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

Komisija u sastavu:

dr Jelena Drulović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,

dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr sci. Miljana Momčilović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za
biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za Imunologiju Instituta za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Marije Mostarice-Stojković. Disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br 145066: „Mehanizmi urođene i stečene imunosti u autoimunskim bolestima i infekciji“. Rukovodilac projekta je prof.dr Marija Mostarica-Stojković

Svom mentoru, **Prof. dr Mariji Mostarici-Stojković**, zahvaljujem se na ukazanom poverenju i nesebičnoj pomoći prilikom uobličavanja i finalizacije ove disertacije. Takođe, zahvaljujem se na iskrenoj ličnoj i profesionalnoj podršci i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Jeleni Drulović zahvaljujem se na korisnim savetima i sugestijama, kao i na bezrezervnom poverenju.

Prof. dr Aleksandri Isaković se posebno zahvaljujem na ukazanoj profesionalnoj pomoći, stalnom interesovanju za ovaj rad i konstantnom hrabrenju da istrajem u realizaciji doktorske teze. Topla prijateljska podrška koju je ona nesebično pružala i razumevanje učinili rad na ovoj tezi lakšim.

Zahvaljujem se **Dr sci Miljani Momčilović** koja je tokom eksperimentalnog rada postala moja jako draga prijateljica. Hvala joj na prisustvu u svakome eksperimentu, uvek dobrom raspoloženju tokom izvođenja eksperimenata i stalnom ohrabrivanju.

Dr sci **Đorđu Miljkoviću** dugujem posebnu zahvalnost na ukazanom poverenju i strpljenju kao i velikom entuzijazmu i istrajnost prilikom osmišljavanja i izvođenja eksperimenata.

Duh prijateljstva i tolerancije koji vlada u laboratoriji Institutu za imunologiju i u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Medicinskog fakulteta doprineo je zadovoljstvu istraživanja i ublažio muke pisanja.

Svojoj porodici zahvaljujem na bezuslovnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Aleksandru i Stefanu.....

Uticaj Metilprednizolona na ekspresiju i produkciju interferona- γ i IL-17 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Uvod: Th17 ćelije predstavljaju populaciju ćelija koje imaju ulogu u imunopatogenezi autoimunskih oboljenja centralnog nervnog sistema kao što su multipla skleroza i eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE). Efekat glukokortikoida, lekova koji se primenjuju kao terapija inflamatornih i autoimunskih oboljenja, na IL-17 još uvek nije ispitan. Stoga je u ovoj studiji ispitivano dejstvo sintetskog glukokortikoida (GK), Metilprednizolona (MP) na ekspresiju i produkciju IL-17. Kako sam mehanizam i mesto dejstva GK nije precizno definisan, takođe je ispitan *in vivo* efekat MP na ekspresiju i produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija kičmene moždine (MNČKM) tretiranih DA pacova tokom eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE).

Materijal i metode: EAE je indukovao kod Dark Agouti (DA) pacova sa homogenatom kičmene moždine uz kompletni Frojndov adjuvans (CFA). Počevši od prvog dana bolesti, DA pacovi su tretirani sa MP i/ili antagonistom glukokortikoidnog receptora-RU486. Produkcija citokina od strane ćelija koje infiltriraju CNS kao i ekspresija gena je merena ELISA metodom i kvantitativnim PCR-om.

Rezultati: MP inhibira produkciju IL-17 od strane mitogenom stimulisanih ćelija limfnog čvora (ČLČ) DA pacova kao i antigen specifičnu produkciju od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora. Inhibicija produkcije IL-17 je dozno zavisna i nije uslovljena inhibicijom proliferacije tokom 48h inkubacije. Takođe, MP inhibira produkciju IL-17 od strane prečišćenih T limfocita, ali ne tako izraženo kao u slučaju ČLČ DA pacova. Sa druge strane pokazano je da MP ublažava kliničko ispoljavanje EAE-a što je praćeno i inhibicijom ekspresije i produkcije IL-17 od strane mononuklearnih ćelija kičmene moždine tretiranih DA pacova. Zapažen efekat MP primenjenog *in vivo* nije posledica smanjenja procentualne zastupljenosti CD4+ T limfocita kao ni njihove apoptoze. Na kraju, antagonist glukokortikoidnog receptora Mifepriston- RU486 poništava inhibitorno dejstvo MP na ekspresiju i produkciju IL-17 u *in vitro* i u *in vivo* uslovima, što ukazuje da su zapaženi efekti MP posredovani putem glukokortikoidnog receptora.

Zaključak: Prikazani rezultati nedvosmisleno pokazuju da MP inhibira ekspresiju i produkciju IL-17 što otvara nove mogućnosti u terapiji autoimunskih oboljenja koje su posredovane Th17 ćelijskom subpopulacijom T limfocita.

Ključne reči: autoimunost, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, metilprednizolon, IL-17

Effects of methylprednisolone on expression and production of interferon- γ and interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis

Background: Interleukin-17 (IL-17)-producing cells are increasingly considered to be the major pathogenic population in various autoimmune disorders. The effects of glucocorticoids, widely used as therapeutics for inflammatory and autoimmune disorders, on IL-17 generation have not been thoroughly investigated so far. Therefore, we studied the effects of a synthetic glucocorticoid methylprednisolone (MP) on IL-17 expression and production in rat lymphocytes. Since the mechanisms and the site of glucocorticoids' actions are still not completely defined we also investigated the *in vivo* effect of the synthetic glucocorticoid MP on the expression and production on IL-17 by cells infiltrating CNS tissue during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Methods: EAE was induced in Dark Agouti (DA) rats by immunization with rat spinal cord homogenate (SCH) mixed with adjuvant. Commencing on the day when the first EAE signs appeared, DA rats were injected daily for 3 days with MP and/or RU486, an antagonist of glucocorticoid receptor. Cytokine production and gene expression in CNS infiltrating cells and lymph node cells were measured using ELISA and real time PCR, respectively.

Results: Production of IL-17 in mitogen-stimulated lymph node cells (LNC) from non-treated rats, as well as in myelin basic protein (MBP)-stimulated draining LNC from rats immunized with SCH + adjuvant was significantly reduced by MP. The reduction was dose-dependent, sustained through the follow-up period of 48 hours, and was not achieved through anti-proliferative effect. Additionally, MP inhibited IL-17 production in purified T cells as well, but to less extent than in LNC. On the other hand treatment of rats with MP ameliorated EAE, and the animals recovered without relapses. Further, MP inhibited IL-17 expression and production in cells isolated from the CNS of DA rats with EAE after the last injection of MP. The observed effect of MP *in vivo* treatment was not mediated through depletion of CD4⁺ T cells among CNS infiltrating cells, or through induction of their apoptosis within the CNS. Finally, the glucocorticoid receptor-antagonist RU486 prevented the inhibitory effect of MP on IL-17 production both *in vitro* and *in vivo*, thus indicating that the observed effects of MP were mediated through glucocorticoid receptor-dependent mechanisms.

Conclusion: These results show that MP potently inhibits IL-17 expression and production and suggest that the clinical efficacy of MP in various T-cell-mediated inflammatory reactions is at least partly due to the inhibition of Th17 lymphocytes.

Key words: autoimmunity, experimental autoimmune encephalomyelitis, methylprednisolone, IL-17

SADRŽAJ:

	<i>1</i>
1. UVOD	<i>1</i>
1.1. Glukokortikoidi.....	<i>1</i>
1.2. Glukokortikoidni receptor.....	<i>1</i>
1.3. Genomski efekti glukokortikoida	<i>2</i>
1.4. Ne-genomski efekti glukokortikoida.....	<i>3</i>
1.5. Antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva glukokortikoida.....	<i>5</i>
1.6. Autoimunost i autoimunske bolesti	<i>5</i>
1.7. Multipla skleroza	<i>6</i>
1.7.1. Etiologija multiple skleroze.....	<i>7</i>
1.7.2. Genetski faktori.....	<i>7</i>
1.7.3. Faktori spoljašnje sredine.....	<i>8</i>
1.7.4. Patohistološke karakteristike MS-a.....	<i>8</i>
1.7.5. Kliničke forme MS-a.....	<i>9</i>
1.8. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE)	<i>10</i>
1.8.1 Indukcija EAE	<i>10</i>
1.8.1a Aktivna indukcija EAE.....	<i>11</i>
1.8.1b Pasivna indukcija EAE.....	<i>14</i>
1.8.1c Spontani EAE.....	<i>14</i>
1.8.2. Patohistološke karakteristike EAE-a.....	<i>16</i>
1.8.3. Klinički oblici EAE-a.....	<i>16</i>
1.8.3a Akutni EAE.....	<i>16</i>
1.8.3b Hiperakutni EAE.....	<i>17</i>
1.8.3c Hronična relapsirajuća bolest.....	<i>17</i>
1.9. Th1/Th17 paradigma	<i>18</i>
1.10.Th17 polarizacija.....	<i>20</i>
1.11.Plastičnost Th17 ćelijske subpopulacije	<i>22</i>
1.11.1. Biološke funkcije IL-17.....	<i>23</i>
1.12.Uloga IL-17 u autoimunskim bolestima.....	<i>24</i>

1.12.a	Efekti glukokortikoida u multiploj sklerozi i u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	25
2	<i>CILJEVI</i>	29
3	<i>MATERIJAL I METODE</i>	31
3.1.	Eksperimentalne životinje.....	31
3.2.	Indukcija i evaluacija EAE-a.....	31
3.3.	Tretman Metilprednizolonom.....	32
3.3.1.	Tretman antagonistom glukokortikoidnog receptora, Mifepristone- RU486.....	32
3.4.	Priprema ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija.....	33
3.4.1.	Medijum za pripremu i kultivisanje ćelija.....	33
3.4.2.	Izolovanje ćelija limfnog čvora.....	33
3.4.3.	Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine.....	34
3.4.4.	Prečišćavanje CD3+ T limfocita.....	34
3.4.5.	Ćelijske kulture.....	35
3.5.	Određivanje proliferativnog odgovora ćelija.....	36
3.6.	Imunofluorescentno bojenje i protočna citofluorometrija.....	36
3.7.	Određivanje nivoa ekspresije gena.....	40
3.8.	ELISA i cELISA.....	44
3.9.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	45
4.	<i>REZULTATI</i>	47
4.1.	Uticaj MP na produkciju, proliferaciju ćelija limfnog čvora i ekspresiju gena Th1 i Th17 citokina u <i>in vitro</i> uslovima	46
4.1.1.	Uticaj MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane mitogenom aktivisanih ćelija limfnog čvora.....	46
4.1.2.	Uticaj MP na proliferaciju ćelija limfnog čvora DA pacova.....	48
4.1.3.	MP inhibira ekspresiju IFN- γ i IL-17 u ĆLĆ DA pacova aktivisanim mitogenom.....	50
4.1.4.	MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ T od strane ĆLĆ DA pacova aktivisanim mitogenom.....	52
4.1.5.	Kinetika inhibicije produkcije IFN- γ od strane ĆLĆ DA pacova aktivisanih mitogenom pod uticajem MP.....	54
4.1.6.	Kinetika inhibicije produkcije IL-17 od strane ĆLĆ DA pacova aktivisanih mitogenom pod uticajem MP.....	56
4.2	Uticaj MP na produkciju IFN-γ i IL-17 od strane antigen-specifičnih ćelija	58

4.2.1.	MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IFN- γ od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova koji su oboleli od EAE-a.....	58
4.2.2.	MP inhibira antigen-specifične produkciju IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	60
4.2.3.	MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IL-17 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova obolelih od EAE-a.....	62
4.2.4.	MP inhibira antigen-specifične produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	64
4.3.	Dejstvo MP da produkciju IFN-γ i IL-17 od strane T limfocita.....	65
4.3.1.	MP inhibira produkciju IFN- γ od strane prečišćenih T limfocita.....	65
4.3.2.	MP inhibira produkciju IL-17 od strane prečišćenih T limfocita.....	67
4.3.3.	MP inhibira IL-6 produkciju od strane CD3-ćelija.....	69
4.4.	Uticaj endogenog IFN-γ na produkciju IL-17 od strane ćelija limfnog čvora neimunizovanih DA pacova.....	70
4.4.1.	MP zajedno za IFN- γ dovodi do inhibicije produkcije IL-17.....	70
4.4.2.	MP svoje dejstvo ne ostvaruje delujući na ERK, P38 ili JNK signalni put kod ConA stimulisanih ćelija limfnog čvora DA pacova.....	72
4.4.3.	MP svoje inhibitorno dejstvo na IL-17 produkciju ostvaruje putem inhibicije Jun aktivacionog puta.....	74
4.5	Ispitivanje efekata <i>in vivo</i> primenjenog MP na kliničko ispoljavanje EAE-a, ekspresiju i produkciju IFN-γ i IL-17 i T-bet i RorγT transkripcionog faktora.....	76
4.5.1.	MP ublažava kliničku sliku EAE-a.....	76
4.5.2.	MP smanjuje brojnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora, slezine periferne krvi i kičmene moždine.....	78
4.5.3.	Uticaj trodnevne <i>in vivo</i> aplikacije MP na ekspresiju gena za IFN- γ IL-17 u ćelijama kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a.....	80
4.5.4.	Uticaj <i>in vivo</i> aplikacije MP na ćelije izolovane iz kičmene moždine koje ekspimiraju unutraćelijski IFN- γ i IL-17.....	82
4.5.5.	Uticaj <i>in vivo</i> aplikacije MP na spontanu produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ćelija izolovane iz kičmene moždine.....	83
4.5.6.	Uticaj <i>in vivo</i> aplikacije MP na spontanu i Con A-stimulisanu produkciju IFN- γ i IL-17 iz ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova obolelih od EAE-a.....	84
4.6	Uticaj <i>in vivo</i> aplikacije MP na ekspresiju transkripcionih faktora koji definišu Th1 i Th17 diferencijaciju.....	86
4.6.1.	<i>In vivo</i> primenjen MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora T-bet u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a.....	86

4.6.2.	<i>In vivo</i> primenjen MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ -T u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a.....	88
4.6.3.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na nivo ekspresije gena za IL-23R u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a.....	90
4.7.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na sastav ćelijskog infiltrata kičmene moždine tokom EAE-a.....	91
4.7.1.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na procentualno učešće CD4 ⁺ ćelija unutar kičmene moždine tokom EAE-a.....	91
4.7.2.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na apoptozu CD4 ⁺ limfocita kičmene moždine tokom EAE-a.....	93
4.7.3.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog Metilprednizolona na procentualno učešće CD11b ⁺ i CD4 ⁺ CD11b ⁺ ćelija unutar kičmene moždine tokom EAE-a.....	94
4.7.4.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na procentualno učešće aktivisanih i naivnih ćelija unutar CD4 ⁺ populacije tokom EAE-a.....	95
4.7.5.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane CD4 ⁺ limfocita tokom EAE-a.....	96
4.8.	Mehanizam dejstva MP primenjenog u <i>in vivo</i> uslovima tokom EAE-a.....	98
4.8.1.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog antagonista GR Mifepristona (RU486) na kliničku sliku EAE-a.....	98
4.8.2.	Antagonist glukokortikoidnog receptora RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IFN- γ u uslovljenu dejstvom MP u <i>in vitro</i> uslovima.....	100
4.8.3.	Antagonist glukokortikoidnog receptora RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IL-17 u uslovljenu dejstvom MP u <i>in vitro</i> uslovima.....	101
4.8.4.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog antagonista GR Mifepristona (RU486) na produkciju IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	102
4.8.5.	Uticaj <i>in vivo</i> primenjenog antagoniste GR Mifepristona (RU486) na produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa.....	104
4.9.	MP inhibira ekspresiju i produkciju IFN-γ ali ne i IL-17 od strane od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine NOD miševa obolelih EAE-a.....	106
5.	DISKUSIJA.....	108
6.	ZAKLJUČCI.....	119
7.	LITERATURA.....	121

1.UVOD

1.1 GLUKOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi (GK) spadaju u grupu steroidnih hormona. koje stvara kora nadbubrežne žlezde. Pored brojnih funkcija u metabolizmu, razviću, funkcijama niza organa i sistema, glukokortikoidi imaju značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora. Poremećaji u njihovoj produkciji i delovanju predstavljaju endokrinu osnovu brojnih inflamatornih i autoimunskih bolesti, pa stoga i njihovi sintetski analozi imaju veoma široku primenu u terapiji inflamatornih i autoimunskih oboljenja (De Bosscher i Haegeman.2008). Naime, davne 1949 godine, Hench i njegove kolege su prvi put primenili glukokortikoid kortizon kao lek za reumatoidni artritis (Hench i Kendall, 1949) i od tada do danas glukokortikoidi se primenju u lečenju autoimunskih i inflamatornih oboljenja kao što su: multipla skleroza, astma, reumatoidni artritis, inflamatorne bolesti creva i druge bolesti uslovljene ili praćene inflamacijom (Boumpas i sar.1993).

1.2 GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

Većinu svojih mnogobrojnih antiinflamatornih i imunosupresivnih efekata GK obavljaju vezujući se za citoplazmatski glukokortikoidni receptor (GR). Gen koji kodira GR sadrži devet egzona i lociran je na hromozomu 5q31-q32. GR, 94kDa protein, se nalazi u citoplazmi u sklopu multiproteinskog kompleksa koji je sačinjen od šaperona i proteina toplotnog šoka (eng. *Heat shock proteins*): Hsp 90, 70, 23 i imunofilina FKBP51, FKBP52, Cyp44 and PP5 (Pratt i Toft. 2003).Postoje više izoformi ovog receptora (Duma i sar. 2006). Ipak, najbolje su proučene dve forme, alfa (α GR) i beta (β GR). Prvo je opisana izoforma označena kao alfa koja je (Hollenberg i sar.1985) eksprimirana u gotovo svim ćelijama i u potpunosti je funkcionalna kada je aktivirana glukokortikoidima. Druga izoforma je β GR koji čini 0.2-1% GR i ona, za razliku od α GR izoforme, nema mogućnost vezivanja za glukokortikoide s obzirom da je domen za vezivanje liganda nefunkcionalan (Lu i Cidlowski, 2004) i zna se da deluje kao dominantno negativan regulator α GR (Bambergeri sar. 1995).

1.3 GENOMSKI EFEKTI GLUKOKORTIKOIDA

Zahvaljujući svojoj lipofilnoj strukturi, glukokortikoidi lako prolaze kroz ćelijsku plazma membranu i vezuju se visokim afinitetom za ligand-vezujući domen GR što rezultira oslobađanjem samog receptora iz multiproteinskog kompleksa (Almawi i sar., 1996). Translokacija vezanog GR u jedro se dešava u roku od 10-30 minuta nakon izlaganja glukokortikoidima (Robertson i sar. 1993).

Nakon translokacije u jedro GR se vezuje za specifične nukleotidne DNK sekvence nazvane glukokortikoid-odgovarajući elementi (eng. *glucocorticoid response elements*, GRE) koje sadrže 15 nukleotida (GTACAnnnTGTTCT) (Berg. 1989). Sam broj i lokalizacija GRE određuje nivo transkripcione indukcije. Kao što je poznato, transkripcioni faktori su proteini i vezuju se za regulatorne sekvence odgovarajućih gena čime povećavaju ili smanjuju nivo genske transkripcije. Stoga i GR koji je vezao GK predstavlja transkripcioni faktor. Kao takav, GR ostvaruje transaktivaciju tj. povećanje

transkripcije specifičnih gena, bilo direktno stabilizacijom transkripcionih kompleksa ili indirektno, delovanjem na hromatinske strukture, čime omogućavaju vezivanje transkripcionih faktora i samu inicijaciju transkripcije.

Pored transaktivacije GK svoje dejstvo ostvaruju i putem transrepresije. Transrepresija se odnosi na dejstvo GK koje ostvaruju preko negativnih GRE koji su sadržani u nizu nukleotida (ATYACnnTnTGATC). Proinflamatorni citokini kao što su IL-1 i IFN- γ su posebno osetljivi na ovaj vid steroidne inhibicije (Barnes i Adcock. 1993). Naime, GR za koji je već vezan glukokortikoid ima mogućnost da direktnim ili indirektnim interakcijama inhibira transaktivacionu funkciju transkripcionih faktora kao što su aktivacioni protein 1 (AP1) i NF κ B. Jedan od načina je i vezivanje kompleksa GK-GR za vezujuću subjedinicu transkripcionih faktora i na taj način sprečava njihovu asocijaciju za molekul DNK (Song i sar. 2005, De Bosscher i sar. 2000). Većinu svojih antiinflamatornih i imunosupresivnih efekata GK ostvaruju putem ove transrepresivne aktivnosti koja posledično dovodi do inhibicije sinteze prostanglandina i proinflamatornih citokina kao što su IL-1, IL-2, TNF, IFN- γ i drugih proinflamatornih medijatora (Schäcke i sar. 2006).

Uprkos tome što je poznato da je za inhibiciju sinteze proinflamatornih citokina i prostanglandina neophodno vreme i da je ona izražena tek nakon nekoliko sati, zapaženo

je da antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva mogu nastupiti veoma brzo i tada se ne mogu objasniti genomskim delovanjem (Croxtall i sar. 2000).

1.4. NE-GENOMSKI EFEKTI GLUKOKORTIKOIDA

Pored genomskog efekta glukokortikoida danas je sve više podataka koji ukazuju da GK svoj efekat mogu da ostvare i mimo genoma. Naime, rezultat ovog negenomskog efekta je veoma brz i ne odigrava se na transkripcionom nivou. Do sada opisana su tri načina brzog, ne-genomskog delovanja glukokortikoida:

- a) Fizičko-hemijske interakcije na nivou ćelijske membrane (Buttgereit i Scheffold, 2002),
- b) Efekat posredovan citoplazmatskim GR (Croxtall i sar., 2000),
- c) Efekat posredovan membranskim GR (Bartholome i sar., 2004).

a) Fizičko-hemijske interakcije na nivou ćelijskih membrana

Pri visokim koncentracijama glukokortikoidi mogu promeniti fizičko-hemijske osobine kako plazma membrane tako i membrane mitohondrija. Glukokortikoidi, kao izrazito lipofilni, umeću se u navedene membrane i na taj način menjaju funkciju proteina koji ulaze u njihov sastav i to lipidnom peroksidacijom koja za posledicu ima povećanu membransku propustljivost (Buttgereit i sar. 2004). Glukokortikoidi, takođe, dovode i do inhibicije oksidativne fosforilacije što posledičnosmanjuje sitezu molekula ATP-a. Kako je za sintezu citokina, migraciju, fagocitozu, obradu i prezentaciju antigena neophodna energija u vidu adenzin tri fosfata (ATP), pri visokim dozama glukokortikoidi ostvaruju svoj imunosupresivni i antiinflamatorni učinak inhibicijom njegove sinteze (Buttgereit i sar. 2000).

b) Efekat posredovan citoplazmatskim GR

Ne-genomski efekat glukokortikoida može biti posredovan proteinima koji se oslobađaju iz multiproteinskog kompleksa nakon vezivanja GK sa GR unutar citoplazme. Oslobođeni proteini, kao što su *Src* koji imaju tirozin-kinaznu aktivnost su odgovorni za neke brze efekte glukokortikoida (Croxtall i sar. 2000). Takođe, inhibicija oslobađanja arahidonske kiseline, koja predstavlja medijator metaboličkih i inflamatornih reakcija, predstavlja još jedan način imunosupresivnog delovanja GK koji se ostvaruje mimo genoma (Croxtall i sar. 2000). Osim toga, pokazano je da GK ostvaruju svoj ne-genomski efekat u aktivisanim T limfocitima kod ljudi i to putem delovanja na protein kinaze (Lck) specifične za limfocite u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Löwenberg i sar. 2005).

c) Efekat posredovan membranskim GR

Pored ne-genomskog efekta koji se ostvaruju putem fizičko-hemijskih interakcija i citoplazmatskog GR, glukokortikoidi ovaj efekat mogu ostvariti i preko membranskog GR (mGR). mGR je detektovan na humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi koristeći visoko senzitivno imunofloroscentno bojenje sa monoklonskim antitelom koje je specifično za citoplazmatski GR (Song i Buttgerit, 2006). Prekomerna ekspresija citoplazmatskog GR neće rezultirati povećanjem mGR, pa se stoga može reći da je mGR zapravo varijantna citoplazmatskog receptora koji je nastao kao posledica drugačije posttranslacione obrade, a ne samo jednostavno premeštanje citoplazmatskog GR u plazma membranu (Bartholome i sar. 2004).

1.5 ANTIINFLAMATORNA I IMUNOSUPRESIVNA DEJSTVA GLUKOKORTIKOIDA

Glukokortikoidi ispoljavaju značajna antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva koje ostvaruju na krvnim sudovima, ćelijama i medijatorima zapaljenske i imunske reakcije (Barnes 2006b). Glukokortikoidi blokiraju sve tipove zapaljenskih reakcija tako što stabilizuju membrane lizozoma, smanjuju propustljivost kapilara, i inhibiraju sintezu arahidonske kiseline i njenih metabolita (prostaglandina i leukotriena), faktora aktivacije trombocita (PAF), faktora nekroze tumora (TNF), interleukina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ kao i faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) (Rhen i Cidlowski 2005; Barnes 2006a). Svoj imunosupresivni efekat glukokortikoidi ostvaruju i indukcijom apoptoze kako nezrelih T limfocita unutar timusa tako i zrelih T limfocita na periferiji (Michałowska-Wender i Wender, 2008).

Svi navedeni efekti glukokortikoidnih hormona pružaju mnogobrojne mogućnosti za njihovu farmakološku primenu. Tako su sintetički glukokortikoidi najčešće prepisivani lekovi u lečenju inflamatornih stanja i autoimunih bolesti kao što su: reumatoidni artritis, multipla skleroza, sistemski lupus erytematosus (Gross i Cidlowski 2008).

1.6. AUTOIMUOST I AUTOIMUNSKJE BOLESTI

Autoimunost predstavlja reaktivnost prema sopstvenim antigenima. Iako je poznato da je nizak stepen autoreaktivnosti fiziološka pojava (Dighiero i sar., 1999) i da, štaviše, preživljavanje naivnih T i B ćelija na periferiji zahteva njihovo stalno izlaganje autoantigenima (Goldrath i Bevan, 1999), poremećaj osnovnih mehanizama održavanja autotolerancije može da dovede do pojave autoimunskih oboljenja. Razumevanje mehanizama kojim fiziološka autoimunost postaje patološka, što uslovljava nastanak autoimunskih oboljenja, predstavlja jedan od ključnih zadataka kako bazične tako i kliničke imunologije.

U osnovi nastanka autoimunskih bolesti stoje poremećaji u selekciji T i B limfocita, njihovoj regulaciji i smrti potencijalno autoreaktivnih klonova (revijski rad Goodnow i sar., 2001; Marrack i sar., 2001). Autoimunske bolesti nisu redak medicinski fenomen, već, naprotiv, imaju visok morbiditet i mortalitet i predstavljaju treći klinički problem u

razvijenom svetu, odmah posle kardiovaskularnih bolesti i malignih tumora (Nossal, 2001). Autoimunost može da zahvati različite organe, uzrokujući bolesti koje se kreću u rasponu od sistemskih koje obuhvataju više sistema i organa (kao što je sistemski eritemski lupus), pa do onih usmerenih samo na jedan organ, odnosno tkivo (npr. multipla skleroza ili insulin-zavisni dijabetes melitus).

1.7 MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza (MS) je hronično, inflamatorno oboljenje CNS-a koje se karakteriše brojnim, izolovanim područjima u kojima se ispoljavaju zapaljenske promene udružene sa demijelinizacijom i gliozom (citirano prema Hafler, 2004). MS je prvi put opisana 1868 godine od strane francuskog neurologa Jean Martin Charcot-a koji je primetio akumulaciju inflamatornih ćelija u centralnom nervnom sistemu (CNS) pacijenata koji pate od periodičnih epizoda neurološke disfunkcije (citirano prema Hafler, 2004). Godine 1933, Thomas Rivers je pokazao da simptomi, slični onima koji se viđaju kod pacijenata koji boluju od multiple skleroze (MS), mogu biti indukovani kod primata ponavljanim ubrizgavanjem homogenata mozga zeca koji ne sadrže infektivne agense kao adjuvanse (Rivers i sar., 1933). Ova spoznaja zapravo predstavlja početak duge istorije eksperimentalnog autoimunkog encefalomijelitisa (EAE), najviše proučavanog animalnog modela MS. Sličnost između lezija u CNS kod ljudi obolelih od MS i eksperimentalnih životinja sa EAE inicijalno je dovela do hipoteze da bi MS mogla da bude autoimunska bolest usmerena protiv komponenti mijelina (Martin i McFarland., 1995). Ova i niz drugih sličnosti predstavljaju osnovu za proučavanje EAE kao laboratorijskog analoga multiple skleroze (Gold i sar. 2006.).

Kao i druge bolesti za koje se pretpostavlja da su autoimunske prirode, MS je češća kod žena (70% populacije obolelih). i MS je vodeći uzročnik netraumatskih neuroloških deficita kod mlađih osoba. U našoj zemlji MS se javlja sa učestalošću od približno 40 obolelih na 100 000 stanovnika (Pekmezovic i sar., 2001) i mada se retko javlja u formi akutne smrtonosne bolesti, ona ima veliki medicinski i socio–ekonomski značaj.

1.7.1 ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE

Iako etiologija ove bolesti nije jasno definisana, brojne činjenice ukazuju da je MS bolest koja je provocirana faktorima spoljašnje sredine kod genetski predisponiranih individua (Gaudet i sar., 1995). Značaj i priroda faktora spoljašnje sredine koji doprinose razvoju MS još uvek nisu precizno definisani, mada se najčešće pominju infektivni agensi, a među njima virusi. Što se tiče genetske predispozicije pokazano je da su značajni geni u okviru HLA kompleksa (Ibrahim i sar., 2005), ali i geni koji ne pripadaju ovom kompleksu (De Jageret i sar., 2009).

1.7.2 Genetski faktori

Slično drugim autoimunskim bolestima posredovanim T limfocitima, u nastanku MS važni su geni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti i to pre svega HLA-DR i HLA-DQ geni (Hillert i sar., 1993). Rizik za nastanak uglavnom potiče od dva DR alela: DRB5*0101 (DR2a) i DRB1*1501 (DR2b) koje karakteriše neuravnoteženost vezanosti (Gregersen i sar., 2006). Mnogo je manje podataka o doprinosu alela HLA I klase u genetskoj predispoziciji za oboljevanje od MS. Ipak, pokazano je da su HLA-A3 i HLA-B7 više zastupljeni kod obolelih od MS, a HLA-A201 pokazuje protektivni efekat (Fogdell-Hahn i sar., 2000).

Pored dobro poznate činjenice da kod pacijenata obolelih od MS postoji povezanost sa alelima HLA I i II klase, skorašnji rezultati GWAS studija (eng. *genome wide association studies*) nedvosmisleno ukazuju na postojanje višestrukih ne-MHC alelskih lokusa koje leži u osnovi genetske predispozicije (Hafler i sar., 2007). Potvrđena je uloga tri lokusa (CLEC16A, IL2RA i IL7R) u genetskoj predispoziciji/osetljivosti (Rubio i sar., 2008, Matesanz i sar., 2007) dok je nezavisna studija ukazala na vezu TNFRSF1A (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A) alela i genetske predispozicije (De Jageret i sar., 2009).

1.7.3 Faktori spoljašnje sredine

U prilog presudnog uticaja spoljašnje sredine govore brojni epidemiološki podaci, među kojima i činjenica da se ova bolest u 70% slučajeva ne javlja kod oba monozigotna blizanca što samo ukazuje da egzogeni faktori imaju značajan udeo u nastanku ove bolesti (Dyment i sar., 2004). Od faktora spoljašnje sredine u pretpostavljenoj etiologiji MS smatra se da važnu ulogu imaju infektivni agensi, naročito virusi.

Tokom protekle decenije izučavan je veliki broj virusa kao mogućih etioloških faktora u nastanku MS. Pored davno predložene, ali nedokazane povezanosti virusa parainfluence i MS (ter Meulen i sar. 1972), u poslednje vreme se sa nastankom ove bolesti povezuju infekcije prouzrokovane Epstein–Barr virusom (EBV), humanim herpes virusom tip 6 kao i retrovirusima (Kakalacheva, 2011). Među bakterijama, Gram negativna *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) se dovodila u vezu sa MS, ali su današnji podaci kontradiktorni: dok jedna grupa istraživača povezuje Cpn i MS (Sriram i sar. 1999) druga negira postojanje veze (Pucci i sar., 2000). Takođe, pokazano je da i deficijencija vitamina D i pušenje može doprineti nastanku ovog oboljenja (Lauer. 2010).

1.7.4 .Patohistološke karakteristike MS-a

Patohistološkim ispitivanjem moždanog tkiva posle smrti bolesnika sa MS otkriveni su brojni jasno ograničeni plakovi u beloj masi CNS sa predilekcionim mestima na optičkim nervima, u periventrikularnoj beloj masi, moždanom stablu i kičmenoj moždini (Murray, 2006). U aktivnim lezijama prisutan je inflamatorni infiltrat koji se sastoji od CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, makrofaga, B limfocita i plazma ćelija (revijski rad, Frohman i sar., 2006). Pored plakova demijelinizacije, u moždanom tkivu obolelih od MS postoji i difuzno oštećenje u vidu atrofije sive mase i degeneracije nervnih vlakana u naizgled normalnoj beloj masi mozga i kičmene moždine. Još uvek se ne zna da li se neurodegenerativni proces razvija nezavisno od inflamacije ili joj možda predhodi (Hemmer i sar., 2006).

Analizom plakova pokazano je da su obrasci demijelinizacije iako heterogeni između različitih bolesnika, homogeni u multiplim aktivnim lezijama jednog obolelog od MS, što dokazuje da su različiti patogenetski mehanizmi uključeni u destrukciji mijelina.

Opisana su četiri obrasca demijelinizacije (Luchinetti i Lassman 2001):

I obrazac: Makrofagima posredovana demijelinizacija

II obrazac: Antitelima posredovana demijelinizacija

III obrazac: Distalna oligodendrogliopatija posredovana apoptozom, ishemijom i dejstvom toksina

IV obrazac: Primarna degeneracija oligodendroglije (mogući metabolički defekti, genetska predispozicija)

Na osnovu razlika u patohistološkoj slici može se zaključiti da je patogeneza MS heterogena i uključuje kako autoimunske tako i neimunske mehanizme. Od imunskih mehanizama u oštećenju tkiva CNS sudeluju autoreaktivni T limfociti svih subpopulacija, aktivisani makrofagi i njihovi solubilni produkti kao što su proinflamatorni citokini, slobodni radikali kiseonika i azota i različiti enzimi (I obrazac emijelinizacije) kao i antitela i komplement (II obrazac demijelinizacije) (Lassmann i sar., 2001).

1.7.5 Kliničke forme multiple skleroze

Brojna istraživanja ukazuju da postoji određena raznolikost u kliničkom ispoljavanju MS među različitim pacijentima. Tok bolesti je kod 85% bolesnika na početku remitentan, karakterisan obično naglim nastankom neuroloških ispada, koje prati potpun ili delimičan oporavak. Nakon određenog vremena 40% ovih pacijenata razvijaju progresivnu fazu bolesti sa ili bez ataka i koja se naziva sekundarno progresivna MS (Confavreux i sar., 2001; Yang. 2005). Kod 15% pacijenata MS počinje primarno progresivnim tokom, koga karakteriše nagomilavanje kliničkog deficita, a relapsi i remisije su odsutni. Stoga može se zaključiti da se MS odlikuje raznolikom kliničkom slikom, gde su neurološki ispadi sa jedne strane posledica bloka u nervnom sprovođenju usled oštećenja mijelina, a sa druge posledica oštećenja i gubitka aksona.

1.8 EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS

Većina sadašnjih saznanja o patogenezi MS zasnovana je na proučavanju eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE), koji predstavlja animalni model MS, s obzirom da klinički i patološki aspekti ove dve bolesti imaju brojne sličnosti.

EAE je autoimunska inflamatorna bolest CNS, koja se kod osetljivih sojeva eksperimentalnih životinja indukuje imunizacijom homogenatom kičmene moždine ili različitim antigenima mijelina (revijski rad Krishnamoorthy i Wekerle.2009).

1.8.1 Indukcija EAE

EAE se može indukovati na dva načina: a) aktivno, imunizacijom i to homogenatom tkiva CNS, mijelinom ili njegovim proteinskim komponentama (bazni protein mijelina-MBP, proteolipidni protein-PLP, mijelin oligodendrocitni glikoprotein-(MOG), mijelin-asocirani glikoprotein-MAG) koji su emulgovani u pogodnom adjuvansu (revijski rad Krishnamoorthy i Wekerle.2009).b) pasivno, transferom u singene primaoce antigen specifičnih CD4⁺ T limfocita koji potiču iz životinja imunizovanih encefalitogenom (revijski rad Zamvil i Steinman., 1990).

Pored ove dve indukovane forme postoji i *model spontanog EAE* koji se razvija kod miševa čiji limfociti zahvaljujući genetskim manipulacijama ispoljavaju receptore za pojedine antigene mijelina (Goverman i sar., 1993; Krishnamoorthy i sar., 2006; Betelli i sar., 2006).

1.8.1a Aktivna indukcija EAE

Prilikom aktivne imunizacije eksperimentalnih životinja u cilju nastanka EAE najčešće se koriste proteinske komponente mijelina koje su emulgovane u pogodnom adjuvansu.

Najčešće korišćeni proteini su:

- **Proteolipidni protein (PLP)** je najzastupljeniji protein mijelina u CNS (čini 50% proteina mijelina), hidrofobne je prirode i evolutivno je konzerviran. Ima vrlo značajnu ulogu u održavanju strukturnog integriteta i funkcije mijelina (Sospedra i Martin.2005).

Kod miševa postoje dva glavne forme ovog proteina; jedna dužine 276 amino kiselina i druga, DM-20 (kraća za 35 aminokiselina). DM-20 je najzastupljeniji u mozgu i kičmenoj moždini kao i perifernim limfnim organima gde se retko nalazi PLP dužine 276 amino kiselina. PLP je jači encefalitogen u poređenju sa mijelin baznim proteinom (MBP) kod nekih sojeva eksperimentalnih životinja, pre svega kod SJL/J miševa, kod kojih je PLP (139-151) dominantan (Kennedy i sar., 1990; Vanderlugt i sar., 2002).

- **Mijelin bazni protein (MBP)**

Za razliku od proteolipidnog proteina (PLP), mijelin bazni protein (MBP) je prisutan kako u centralnom tako i u perifernom nervnom sistemu. Kod sisara postoji pet izoformi ovog proteina koji se razlikuju po molekularnoj masi (14-21.5kDa). Najzastupljenija je izoforma molekulske mase 18.5 kDa (dužine 170 aminokiselina) i kao takva je najviše proučavana u imunološkim studijama Imunizacija MBP-om u pogodnom adjuvansu dovodi do pojave EAE kod osetljivih sojeva pacova, miševa, zamorčića i kod primata (Wekerle i sar., 1994). Različiti delovi ovog molekula su encefalitogeni epitopi za različite vrste, pa čak i za sojeve u okviru iste vrste. Ako se uporedi EAE kod pacova i primata i specifični imunski odgovor na MBP kod ljudi obolelih od MS, uočava se sličnost između epitopa koji su encefalogeni u animalnom modelu i MBP regiona koji su imunodominantni u MS (Martin i sar., 1991a i 1991b).

- **Mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG)**

Mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG) se sastoji od 218 amino kiselina, transmembranski je glikoprotein, pripada imunoglobulinskoj superfamiliji, manje je zastupljen od drugih proteina mijelina (0,01-0,05%) i ne nalazi se u kompaktnom

mijelinu već na spoljašnjoj površini oligodendrocitne membrane. Zahvaljujući tome MOG je direktno dostupan cirkulišućim antitelima i veruje se da je značajan ciljani protein u nastanku ćelijskog i humoralnog imunskog odgovora u MS (Jaskiewicz, 2004). MOG protein se eksprimira kasno u mijelinizaciji i nalazi se isključivo u mozgu i kičmenoj moždini kao i u retini ali ne u perifernom nervnom sistemu. C57/BL6 miševi su osetljivi na indukciju EAE –a ovim proteinom dok MOG_(35–55) dovodi do hronične nerelapsirajuće bolesti (Mendel i sar., 2005). Kod pacijenata koji su oboleli od MS iz periferne krvi izolovani su MOG specifični T limfociti što upućuje na ulogu ovog mijelinskog proteina i u patogenezi ove bolesti (Raddassi i sar., 2011).

○ **Mijelin-asocirani glikoprotein (MAG)**

Mijelin-asocirani glikoprotein (MAG) je veliki mijelinski glikoprotein, molekulske mase oko 100 kDa, koji se nalazi na unutrašnjoj površini mijelinskog omotača. Čini nešto manje od 1% mijelinskih proteina u CNS a još manje je zastupljen u perifernom nervnom sistemu (Weerth i sar., 1999). Zna se da MAG (97–112) ima encefalogeni potencijal kod ABH (H-2Ag7) miševa dok su u CSF tečnosti obolelih od MS detektovani MAG-specifični T i B limfociti (Andersson i sar. 2002).

Pored predhodno navedenih proteina mijelinskog omotača koji se koriste u imunizaciji poznati su i drugi mijelinski proteini koji u imunopatogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa/multiple skleroze mogu pokrenuti autoimunski odgovor:

○ **2',3'-Ciklična nukleotid 3' fosfodiesteraza (CNPase)**

2',3'-Ciklična nukleotid 3' fosfodiesteraza (eng. *2',3'-cyclic nucleotide-3'phosphodiesterase*) postoji u svoja dva oblika (CNPase I i II, 46 kDa i 48 kDa) i čini 3%–4% ukupnih proteina mijelinskog omotača. Nalazi se kako unutar oligodendrocita i tako i unutar Švanovih ćelija. Kod pacijenata sa MS, C- terminalni kraj CNPase (343–373) predstavlja imunodominantni epitop koji visokim aviditetom biva prepoznat od strane mijelin specifičnih T limfocita (Bielekova i sar., 2004).

○ **Mijelin udruženi oligodendrocitni bazni protein (MOBP)**

Mijelin udruženi oligodendrocitni bazni protein MOBP (eng. *myelin associated oligodendrocytic basic protein*) se nalazi isključivo u oligodendrocitima. MOBP₍₂₁₋₃₉₎ je identifikovan kao imunodominantni region kod pacijenata koji su oboleli od MS (Holz i sar., 2000).

Takođe, za oligodendrocit-specifičan glikoprotein OSP (od eng. *oligodendrocyte-specific glycoprotein*), α -B crystallin (α B-C), S100 β protein, transaldolaze-H (Tal-H) se pokazalo da imaju sopsobnost indukcije autoimunskog odgovora.

Pored mijelinskih antigena opisani su i neki nemijelinski antigeni (Pender. 2003)

U toku hroničnog autoimunskog odgovora na komponente mijelina javlja se fenomen "širenja epitopa/determinanti" (engl. *epitope/determinant spreading*) (Vanderlugt i sar., 1996) koji predstavlja nastanak imunskog odgovora na nove epitope koji se oslobađaju tokom početnog autoimunskog oštećenja CNS. Tako su Yu i sar. (1996) pokazali da u kasnijim stadijumima hronično-relapsirajućeg EAE koji je indukovao PLP peptidom (139-151) dolazi do širenja T ćelijskog odgovora na druge determinante PLP (intramolekulska širenje repertoara) kao i na drugi autoantigen-MBP (intermolekulska širenje repertoara). Ovi podaci bi mogli da objasne teškoće u identifikaciji antigena u MS, pošto postoji mogućnost da različiti autoantigeni imaju ulogu imunopatogeneze različitih stadijuma MS.

U svakom slučaju, svi ovi modeli su od neprocenjivog značaja za rasvetljavanje interakcija koje se dešavaju između ćelija CNS i imunskog sistema.

1.8.1 b Pasivna indukcija EAE

Pored aktivne imunizacije, EAE se može indukovati i transferom antigen-specifičnih CD4⁺ T limfocita (Ben-Nun i sar. 1981). Paterson je prvi pokazao da EAE može biti indukovana ćelijama limfnog čvora pacova koji su predhodno imunizovani homogenatom kičmene moždine u kompletnom Frojndovom adjuvansu (eng. *Complete Freund's adjuvant*, CFA) (Whitacre i Paterson 1977). Međutim, klinički znaci ove bolesti su bili veoma slabi. Kasnije je pokazano da se EAE sa postojećim kliničkim znacima može indukovati transferom limfocita životinja imunizovanih encefalitogenom u singene primaocice, pod uslovom da su ćelije u *in vitro* uslovima bile aktivisane sa konkanavalinom A (Panitch i sar., 1977). Pojava prvih kliničkih znakova, težina i oblik bolesti zavisi od broja ćelija koje su korišćene za pasivni transfer. Paralelni eksperimenti su pokazali da ozračivanje celog tela životinje malim dozama X zračenja i istovremeno davanje *Bordetella pertussis* vakcine u mnogome olakšava indukciju EAE pasivnim transferom (Lando i sar., 1984).

U supernatantu kultura limfocita tokom *in vitro* stimulacije sa konkanavalinom A, koja prethodi transferu, nađen je visok nivo IFN- γ što je ukazalo da je Th1 subpopulacija CD4⁺ T limfocita odgovorna za pasivni transfer EAE (Mustafa i sar., 1991). Međutim, pokazano je da se encefalitogeni potencijal Th1 linije gubi ukoliko se u *in vivo* ili *in vitro* uslovima pod dejstvom odgovarajućih citokina ona prevede u Th2 subpopulaciju (Racke i sar., 1994).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je primena modela zasnovanih na transferu EAE pomoću linija i klonova encefalitogenih T ćelija dobijenih iz životinja obolelih od EAE u mnogome doprinela razumevanju patogeneze neuroinflamacije (Richert i sar., 1985; Zamvil i sar., 1985).

1.8.1c Spontani EAE

Imajući u vidu da je MS spontana bolest bilo je izuzetno značajno uspostaviti analogni eksperimentalni model bolesti koja se razvija bez arteficijelne intervencije kakvu predstavlja klasična indukcija bolesti uz upotrebu adjuvansa ili transfer antigen specifičnih CD4⁺ ćelija. Prvi takav EAE model rezultat je genetskih manipulacija i

dobijen je po ukrštanju dve transgene linije B10.Pl miševa od kojih je jedna ekspimirala α lanac, a druga β lanac T ćelijskog receptora specifičnog za peptid koga čine 1-11 aminokiselinske sekvence baznog proteina mijelina (Goverman i sar., 1993). Kod ovako dobijenih miševa većina T limfocita ekspimirira receptor specifičan za MBP (1 - 11). Bolest se spontano razvijala kod jednog broja ovakvih miševa, a veći procenat obolelih je registrovan kod onih koje su čuvane u konvencionalnim uslovima, dok su životinje gajene u sterilnim uslovima ("pathogen free") značajno manje oboljevale (Goverman i sar., 1993). Ovo ukazuje da i za nastanak EAE veliku ulogu imaju faktori spoljašnje sredine (infekcija) što predstavlja važnu paralelu sa MS (Brabb i sar., 1997). Drugu važnu paralelu u ovom modelu predstavlja i činjenica da se bolest javlja uglavnom kod mladih miševa (Goverman, 1999).

Rezultati dve istraživačke grupe ukazuju na postojanje još jednog modela EAE koji je posledica genetičke manipulacije. Naime, Krishnamoorthy i sar. (2006) i Bettelli i sar. (2006) su razvili model EAE koristeći dvostruko transgene životinje dobijene ukrštanjem miševa IgH^{MOG} i TCR^{MOG}. Prvima je *knock – in* tehnologijom ubačen gen za teški lanac anti-MOG antitela u IgJ region, što je rezultiralo prisustvom B ćelija koje su sekretovale anti-MOG antitela (Litzenburger i sar. 1998). Druga linija miševa (nazvana TCR^{MOG}) ekspimirala je TCR koji specifično prepoznaje MOG protein i takvi miševi razvili su optički neuritis što je najraniji simptom MS (Bettelli i sar., 2003). Soj dobijen ukrštanjem ove dve linije miševa spontano je razvijao posebnu formu bolesti koja je nazvana optikospinalni EAE (OSE). Patoanatomski supstrat, odnosno promene na optičkom nervu i kičmenoj moždini u ovom modelu, odgovara neuromijelitis optica (Devic) koji predstavlja formu MS (Ransohoff i sar., 2006b).

1.8.2 PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE EAE

Histološke promene EAE se manifestuju meningealnom, perivaskularnom i parenhimatoznom mononulearnom i neutrofilnom infiltracijom i različitim stepenom primarne demijelinizacije (gubitak mijelina na *neoštećenim* aksonima). Takođe, prisutno je i oštećenje oligodendrocita, degeneracija aksona i poremećaj prenosa signala kroz njih. Patohistološke lezije unutar CNS zavise od životinjske vrste i oblika bolesti. Inflamatorni infiltrat kod EAE se sastoji uglavnom od mononuklearnih ćelija (limfociti, makrofagi) dok se polimorfonuklearne ćelije ređe nalaze. Edem i ekstravazacija eritrocita se viđa kod akutnog oblika ove bolesti. Hiperakutna forma EAE kod Lewis pacova se karakteriše patohistološkim nalazom u kome dominiraju infiltrati neutrofila, edem, fibrinski depoziti, hemoragije, vaskularna i parenhimatozna nekroza kao i vaskularna tromboza (Levine i Wenk, 1965; Ravkina i sar., 1979). Kod hroničnog oblika EAE inflamatorni infiltrat je prisutan tokom egzacerbacije dok je tokom remisije odsutan (Pender i sar., 1990).

1.8.3 KLINIČKI OBLICI EAE-a

Sam klinički tok EAE u mnogome zavisi od vrste korišćenog antigena, načina imunizacije i vrste životinja u kojima se bolest izaziva. Postoji više kliničkih oblika EAE modela:

1.8.3a Akutni EAE

Neurološka simptomatologija u ovoj formi EAE ima akutni monofazni tok. Bolest najčešće počinje gubitkom telesne težine 10 do 12 dana posle imunizacije, potom se manifestuje smanjenom pokretljivošću, atonijom repa, parezom i paralizom zadnjih ekstremiteta kao i inkontinencijom urina i fecesa, dakle pojavom neuroloških ispada vezanih za niže segmente kičmene moždine (revijski rad Aboul-Enein i sar., 2006). Ukoliko životinja ne ugine na vrhuncu paralitičkog stadijuma, dolazi do spontanog oporavka i štaviše, otpornosti na ponovnu indukciju bolesti.

1.8.3b Hiperakutni EAE

Hiperakutna forma EAE ima kraći latentni period sa rapidnim progresivnim kliničkim pogoršanjem i većim mortalitetom nego akutni EAE. Ova forma bolesti može biti indukovana kod Lewis pacova inokulacijom homogenata kičmene moždine i Pertussis vakcine (Levine i Wenk, 1965).

1.8.3c Hronična relapsirajuća bolest

Imajući u vidu da najveći broj pacijenata koji boluju od MS imaju relapsno-remitentni tok pre nego što bolest pređe u hronični progresivni oblik, a da je većina animalnih modela monofaznog toka, dizajnirani su EAE modeli koji simuliraju remitentni oblik MS. U jednom takvom modelu koriste se Biozzi AB/H miševi (Baker i sar., 1990; Skundric, 2005) imunizovani homogenatom kičmene moždine u adjuvansu bez dodatog toksina bakterije *Bordetella pertussis* koji razvijaju hroničnu remitentnu demijelinizirajuću bolest. Posle imunizacije, životinje prolaze kroz akutnu fazu koja se ogleda u gubitku tonusa repa i paralizi zadnjih ekstremiteta, potom se klinički znaci povlače što odgovara remisiji bolesti, a nakon toga dolazi do egzacerbacije što sve zajedno ukazuje da ovakva bolest u velikoj meri odgovara remitentnom obliku MS kod ljudi.

1.9 Th1/Th17 PARADIGMA

Prema tradicionalnom konceptu EAE i MS su se smatrale bolestima kod kojih su Th1 ćelije patogene efektorske ćelije (Alimi, 1998). Osnovni efektorski citokin Th1 ćelija je interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ se smatra proinflamatornim citokinom pre svega zahvaljujući svojoj izrazitoj sposobnosti aktivacije makrofaga (Goldberg i sar, 1990). Takođe, IFN- γ indukuje povećanu ekspresiju molekula MHC klase I i klase II na različitim ćelijama (Skoskiewicz i sar, 1985). Pored toga, IFN- γ u različitim tipovima ćelija stimuliše proinflamatorne medijatore kao što su: IL-12 (Ma i sar. 1996), IL-15 (Doherty i sar. 1996), faktor nekroze tumora α (TNF α) (Hayes MP, 1995), inducibilnu sintazu azot monoksida (iNOS) (Xie QW, 1993) i kaspazu-1 (Tamura i sar. 1996). Svoje proinflamatorno dejstvo IFN- γ ostvaruje i tako što povećava ekspresiju adhezionih molekula ICAM-1 (May & Ager 1992) i V-CAM (Barten & Ruddle, 1994) na ćelijama endotela i stimuliše transmigraciju limfocita kroz endotel krvnog sudan (May & Ager 1992).

U prilog patogene uloge Th1 i IFN- γ u nastanku EAE i MS govore brojni eksperimentalni dokazi. Antigen-specifične CD4⁺ T ćelije kojima se može indukovati EAE su Th1 fenotipa i nakon aktivacije sekretuju citokine kao što su IFN- γ , TNF- α i/ili LT (Powell 1990). Isti Th1 citokini su produkovani u lezijama CNS-a miševa sa EAE (Kennedy. 1992). Miševima kojima su uklonjeni geni za transkripcione faktore koji su neophodni za Th1 diferencijaciju kao što su T-bet i STAT4 ne produkuju IFN- γ i otporni su na indukciju EAE (Bettelli i sar. 2004).

U lezijama u CNS obolelih od MS-a detektovani su Th1 citokini (Rohowsky-Kochan, 2000) i IFN γ ⁺ ćelije (Traugott 1983). Takođe, primena rekombinantnog IFN- γ kod obolelih od MS dovela je do pogoršanja bolesti (Panitch HS. 1992), a tretman sa antitelima specifičnim za IFN- γ do ublažavanja simptoma (Skurkovich i sar, 2001).

Iako se generalno smatra pro-inflamatornim citokinom, IFN- γ ispoljava i izvesne anti-inflamatorne aktivnosti. Tako IFN- γ inhibira produkciju pro-inflamatornih citokina IL-1 i IL-8, stimuliše ekspresiju članova porodice regulatornih proteina koji suprimiraju prenos signala koji pokreću različiti citokini (SOCS, od engl. *Suppressors of Cytokine Signaling*-), a pokazano je da indukuje apoptozu leukocita (Muhl, Pfeilschifter, 2003).

Na osnovu svega iznetog moglo bi se tvrditi da su MS i njen animalni model EAE Th1 posredovane bolesti. Međutim, eksperiment koji nedvosmisleno potvrđuje da IFN- γ nije neophodan za razvoj EAE-a je ne samo indukcija ove bolesti nego i teža klinička slika kod miševa kojima je uklonjen gen za IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) i njegov receptor (Ferber i sar. 1996). Nakon administracije neutrališućih antitela za IFN- γ klinički tok EAE je bio teži. (Heremans i sar. 1996). Dalje, postoje podaci koji ukazuju da odsustvo IFN- γ čak pogoršava klinički tok bolesti (Chu i sar., 2000). Nakon ovih saznanja pažnja bazičnih imunologa je bila fokusirana na druge potencijalne citokine koji bi bili značajni za razvoj EAE-a. Kao posledica svega navedenog usledeli su eksperimenti koji su još jednom doveli u pitanje ulogu Th1 ćelijske subpopulacije i njihovog glavnog produkujućeg citokina IFN- γ u EAE-u.

Tako su Kua i saradnici koristili životinje kod kojih su uklonjeni geni za p19 (subjedinica IL-23), p35 (subjedinica IL-12) ili p40 (zajednička subjedinica za IL-23 i IL-12). Pokazano je da životinje kojima nedostaje samo IL-12 (IL-12p35 $^{-/-}$) oboljevaju od EAE-a, dok su životinje bez IL-23 (IL-12p19 $^{-/-}$) ili bez IL-12 i IL-23 (IL-12p40 $^{-/-}$) bile u potpunosti otporne na indukciju ove bolesti (Cua i sar., 2003).

Potom su usledili radovi u kojima je potvrđena uloga IL-23 u stvaranju ćelija koje prevažodno produkuju IL-17 i pokazano je da te ćelije predstavljaju novu subpopulaciju CD4 $^{+}$ T-ćelija, koja se razlikuje od Th1, Th2 i regulatornih T-ćelija (Treg) i koja je nazvana Th17 (Harrington i sar., 2005; McKenzie i sar., 2006; Weaver i sar., 2006).

1.10 Th17 POLARIZACIJA

I pored prethodno nesumnjivo dokazane veze IL-23 sa IL-17 u indukciji patogenog procesa, pokazalo se da za polarizaciju, tj. usmerenje naivne T-ćelije ka Th17 ćeliji nije neophodno prisustvo IL-23 (Veldhoen i sar., 2006a; Mangan i sar., 2006; Bettelli i sar., 2006). Naime, razvoj Th17 ćelija nije bio inhibiran u odsustvu IL-23, niti pojačan pri dodavanju egzogenog IL-23. Istovremeno, tri grupe naučnika su nezavisno pokazale da je za polarizaciju Th17 ćelija kod miševa neophodno prisustvo dva citokina, TGF- β i IL-6 (Veldhoen i sar., 2006a; Mangan i sar., 2006; Bettelli i sar., 2006). Druge dve grupe autora (Mangan i sar., 2006; Bettelli i sar., 2006) su potvrdile ove nalaze i pokazale da je TGF- β neophodan za razvoj Th17 ćelija, ali i regulatornih CD4⁺ T-ćelija koje eksprimiraju transkripcioni faktor Foxp3 (tzv. Foxp3⁺ Treg ćelije), što je u skladu sa zapažanjem da TGF- β može da ima različite uloge u imunosti (Wahl, 1994; Li i Flavell, 2008). Oni su takođe dokazali da je presudni činilac koji usmerava diferencijaciju naivnih CD4⁺ T-ćelija u jednom ili drugom smeru baš IL-6. Naime, IL-6 produkovan od strane APC pod dejstvom infektivnih agenasa, odnosno njihovih produkata, kao što su komponente ćelijskog zida gljivica (zimozan) ili mikobakterija, ali i peptidoglikan, LPS, CpG dinukleotidi ili neki produkti virusa (McGeachy i Cua, 2008), inhibira stvaranje Foxp3⁺ Treg ćelija, a promovise nastanak Th17 ćelija (revijski prikazano u Weaver i sar., 2006). U svakom slučaju, kada su i TGF- β i IL-6 prisutni, oni sinergistički deluju na naivne CD4⁺ T-ćelije i usmeravaju njihov razvoj ka Th17 fenotipu kroz ekspresiju inducibilne komponente receptora za IL-23 (IL-23R), čime ove ćelije postaju responsivne za ovaj citokin koji je presudan za kasniju fazu u diferencijaciji Th17 ćelija (Iwakura i sar., 2011). Ovi rezultati dobijeni *in vitro* su kasnije u određenoj meri potvrđeni i u različitim sistemima *in vivo*. Tako je pokazano da životinje kod kojih je uklonjen gen za TGF- β nemaju Th17 ćelije (Mangan i sar., 2006), da blokiranje signala poreklom od TGF- β blokira razvoj EAE-a (Veldhoen i sar., 2006b), a da preterana ekspresija TGF- β kod transgenih miševa dovodi do ekspanzije Th17 ćelija i egzacerbacije EAE-a (Bettelli i sar., 2006).

Pored predhodno opisanih citokina koji su neophodni za Th17 diferencijaciju i transkripcioni faktori imaju veoma važnu ulogu. Tako, transkripcioni faktor ROR γ T (RORC kod ljudi) koji je eksprimiran kod svih ćelija koje proizvode IL-17 predstavlja

regulatorni transkripcijski faktor razvoja Th17 ćelijske subpopulacije. Ukoliko se CD4⁺ T limfociti kultiviraju sa TGF- β i IL-6 nakon 8h eksprimiraju ovaj transkripcijski faktor. Da je on nezaobilazan u diferencijaciji Th 17 ćelija dokazuje i eksperiment u kome se pokazalo da ćelije kojima je uklonjen gen za ROR γ T transkripcijski faktor nemaju mogućnost produkcije IL-17 (Chen i sar. 2011). Takođe, ROR γ T deficijentni miševi su parcijalno rezistentni na razvoj EAE-a. Ova pomenuta parcijalna rezistencija se objašnjava aktivnošću ROR α transkripcijskog faktora koji takođe reguliše Th17 diferencijaciju (Yang i sar. 2008). Nivo ekspresije ovog, za Th17 diferencijaciju, veoma važnog transkripcijskog faktora je regulisana kako citokinima tako i drugim transkripcijskim faktorima. Aktivnost i funkcija ROR γ T transkripcijskog faktora je pored citokina regulisana i STAT3 transkripcijskim faktorom (od eng. *Signaling Transducer and Activator of Transcription*). Već pomenuti citokini koji učestvuju u Th17 polarizaciji (IL-6, TGF- β i IL-23) dovode do njegove aktivacije posle čega se direktno vezuje za STAT vezujuće mesto unutar promotora gena za IL-17 i na taj način indukuje ROR γ T ekspresiju i ekspresiju receptora za IL-23 kod naivnih, dakle, nediferentovanih T limfocita (Hwang. 2010). Njegova neophodnost u diferencijaciji Th17 ćelija se pokazala kroz eksperiment u kome je pokazano da miševima kojima je uklonjen gen za STAT3 transkripcijski faktor (STAT3^{-/-}) nemaju Th17 ćelijsku subpopulaciju (Harris i sar. 2007). Paralelno, STAT3 aktivacija u prisustvu IL-6 dovodi do smanjene ekspresije FoxP3 transkripcijskog faktora koji je važan za diferencijaciju T reg limfocita čime se i objašnjava uloga IL-6 u balansu i plastičnosti Th17/Treg ćelija (Yang i sar. 2008). Dalje, interferon regulatorni faktor 4 (IRF4) u sadejstvu sa IL-1 ima ulogu u ranoj Th17 diferencijaciji. RUNX1 i BATF transkripcijski faktori su neophodni za optimalnu ekspresiju ROR γ T transkripcijskog faktora i produkciju IL-17 (Hu i sar. 2011). Citokini koji imaju ulogu u inhibiciji Th17 diferencijacije su IL-10 i IL-27 (Chaudhry i sar. 2011).

1.11 PLASTIČNOST Th 17 ĆELIJSKE SUBPOPULACIJE

Do skora se smatralo da se Th17 limfociti razvijaju nezavisno od Th1 subpopulacije i time se objašnjavao nastanak EAE kod Th1 deficitarnih miševa (revijski rad Weaver i sar., 2006). Međutim, danas se zna da Th17 ćelije imaju kapacitet produkcije IFN- γ što je potvrđeno *ex vivo* studijom u kojoj je dokazano prisustvo Th17/Th1 limfocita u perifernoj krvi čovjeka i nazvane su Th17/Th1 limfociti (Annunziato i sar. 2007). Takođe, i Th17 i Th17/Th1 limfociti klonovi ne samo da ekspimiraju IL23R već i β 2 subjedinicu IL12R kao i T-bet, transkripcioni faktor koji je neophodan za samu Th1 subćelijsku diferencijaciju (Annunziato i sar. 2007). I najvažnije, stimulacija već diferenciranih Th17 limfocita ljudskog porekla sa IL-12 dovodi do smanjene ekspresije ROR γ T transkripcionog faktora kao i povećane ekspresije T-bet transkripcionog faktora i time omogućava produkciji IFN- γ pored produkcije IL-17. Suprotno tome, jednom diferencirana Th1 ćelijska subpopulacija ni pod kojim uslovima neće imati kapacitet produkcije IL-17 obzirom da je T-bet transkripcioni faktor direktni inhibitor ekspresije ROR γ T transkripcionog faktora koji je ključan u Th17 diferencijaciji (Lazarevic i sar. 2011). Ovi podaci, koji su rezultat dugotrajnog istraživanja, nam vrlo jasno demonstriraju plastičnost Th17 ćelijske subpopulacije i zapravo predstavljaju novi koncept po kome postoji mogućnost preusmeravanja Th17 ka Th1 ćelijskoj subpopulaciji dok obrnuti smer, dakle preusmeravanje Th1 ka Th17 ćelijskoj subpopulaciji nije moguće (Annunziato i sar. 2007).

Ako plastičnost Th17 ćelijske subpopulacije posmatramo u odnosu na T regulatorne ćelije (Treg) postoje podaci koji ukazuju da i one mogu postati IL-17 produkujuće ćelije ukoliko se kultiviraju u prisustvu IL-6 što korelira sa povećanom ekspresijom ROR γ T transkripcionog faktora (Yang i sar. 2008). Postoje i podaci koje ukazuju na prisustvo IL-17 produkujućih ćelija kod miša koje ekspimiraju Foxp3 transkripcioni faktor, za koga se zna da je ekspimiran u T regulatornoj ćelijskoj subpopulaciji (Lochner i sar. 2008)

Mehanizam plastičnosti i reprogramiranja subpopulacija T limfocita uopšte kao i Th17 ćelijske subpopulacije još uvek nije dovoljno razjašnjen. Wei i njegovi saradnici su sprovedeli H3 lizin4 (H3K4) i lizin 27 (H3K27) studiju i došli su do zaključka da su prisutne epigenetske modifikacije Tbx21 gena koje se tiču diferencijacije T limfocita što naravno korelira sa njihovim transkripcionim statusom. Naime gen poseduje binarnu

modifikaciju hromatina što može rezultirati i aktivacijom i inhibicijom transkripcionih faktora koji su bitni za Th17 polarizaciju u zavisnosti od citokinskog miljea u kome se ćelije nalaze (Wei i sar. 2009; Dong.2011).

1.11.1 Biološke funkcije IL-17

Th17 ćelije, $\gamma\delta$ T limfociti sekretuju proinflamatorni citokine IL-17A- IL-17F. Prvo je identifikovan IL-17A kao cDNK transkript kod pacova i nazvan je CTLA8 (Rouvier i sar., 1993). On može pokrenuti sekreciju proinflamatornih citokina i hemokina (Fossiez i sar., 1996) kao što su IL-1 β i TNF- α za koje je pokazano da mogu biti medijatori inflamatornog procesa u mnogim autoimunskim oboljenjima (Suttoni i sar., 2006). IL-17 se smatra proinflamatornim citokinom obzirom da je poznato da ovaj citokin indukuje ekspresiju brojnih medijatora inflamacije u različitim tipovima ćelija. Pošto je IL-17A prototipski citokin porodice IL-17 i najviše eksperimentalnih podataka se odnosi na njega i u daljem tekstu će se, uostalom kao i u većini naučnih radova, pod IL-17 uvek podrazumevati IL-17A, a pod IL-17R receptor za IL-17A, osim ako drugačije nije naglašeno.

IL-17 *in vitro* prevashodno stimuliše produkciju hemokina koji specifično privlače neutrofile i monocite na mesto zapaljenja kao što su IL-8, GRO α (*engl. Growth Related Oncogene α*), GCP-2 (od *engl. Granulocyte Chemotactic Protein 2*), MCP-1 (*engl. Monocyte Chemotactic Protein 1*), CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2 i CCL5 (Miyamoto I sar. 2003, Witowski i sar. 2000), ali i citokina koji regulišu sazrevanje i proliferaciju mijeloidnih ćelija kao što su IL-6, G-CSF (*eng. Granulocyte Colony Stimulating Factor*) i GM-CSF (*eng. Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*) (Jones i Chan. 2002).

IL-17 stimuliše lokalnu inflamaciju tako što indukuje tipične proinflamatorne citokine IL-6, TNF- α i IL-1 β (Yao i sar. 1995), i druge medijatore inflamacije, prostaglandine (PGE2) i azot monoksid (Fossiez i sar. 1996). Važan aspekt proinflamatornog dejstva ovog citokina jeste da vrlo često saraduje sa drugim proinflamatornim citokinima kao što su IL-1 β , TNF- α i IFN- γ (Ruddy i sar. ,2004, Albanesi i sar., 1999).

Obzirom na njegov značaj u započinjanju i održavanju inflamacije, IL-17 predstavlja značajan modulator ranog imunskog odgovora na patogene. Iako do sada nije jasno koja

grupa patogena predominantno indukuje Th17 odgovor pokazano je da raznovrsni mikroorganizmi kao što su Gram-pozitivne bakterije *Propionibacterium acnes*, Gram-negativne bakterije *Citrobacter rodentium* (Mangan et al, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (Ye I sar., 2001), *Borrelia Burgdorferi* (Infante-Duarte i sar., 2000), zatim *Mycobacterium tuberculosis* i gljivica *Candida albicans* indukuju značajan Th17 odgovor. Produkt izveden iz ćelijskog zida gljiva, zimozan ili derivat bakterijskog peptidoglikana kao što je muramildipeptid mogu da promovišu IL-17 produkciju u T ćelijama (van Beelen i sar., 2007). Danas se pouzdano zna da, Th17 ćelijska subpopulacija u fiziološkim uslovima ima ulogu u odbrani od mukozalnih gljivičnih infekcija. Tada, ova ćelijska subpopulacija produkuje hemoatraktante kao što su CXCL1, CXCL5 i IL-8 dovodi do neutrofilne infiltracije za koje se zna da imaju dominantnu ulogu u odbrani od ove vrste infekcija (Conti i Gaffen. 2010).

Prema tome, Th17 odgovori se najverovatnije javljaju kao rani odgovor na brojne patogene koji nisu pokriveni Th1 i Th2 imunskim odgovorima i koji, da bi bili eliminisani, zahtevaju jaku inflamaciju.

1.12 Uloga IL-17 u autoimunskim bolestima

Prekomerna produkcija IL-17 može da izazove inflamatornu reakciju koja doprinosi oštećenju tkiva što je slučaj kod mnogih autoimunskih bolesti i drugih patoloških stanja u čijoj je osnovi hronična inflamacija. Do sada je pokazano da je IL-17 prisutan u serumu i eksprimiran u ciljnim tkivima obolelih od reumatoidnog artritisa (Nakae i sar., 2003), sistemskog eritemskog lupusa (Wong i sar., 2000), psorijaze (Wilson i sar., 2007), inflamatorne bolesti creva (Fujino i sar., 2003) i multiple skleroze (Matusevicius i sar., 1999). U lezijama CNS obolelih od MS je utvrđena povećana ekspresija IL-17 (Lock i sar., 2002), a u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od MS povećane koncentracije IL-17 (Ishizu i sar., 2005). IL-17 stimuliše prolaz T limfocita kroz krvno moždanu barijeru, a receptori za IL-17 su eksprimirani na endotelu MS lezija. Takođe, memorijske T ćelije koje produkuju IL-17 su identifikovane u infiltratima MS lezija (Kebir i sar., 2007). Mnogobrojni dokazi ukazuju da su Th17 ćelije pokretači autoimunskog procesa u EAE-u, a moguće i u MS-u. Postavlja se pitanje da li su Th17 jedine ćelije koje dovode do patoloških promena u ovim bolestima i kakva je uloga Th1

ćelija? Iako navedeni rezultati govore u prilog dominantne uloge Th17 ćelija, nalaz da životinje bez gena za T-bet i STAT4 (dakle bez Th1 ćelija) ne oboljevaju od EAE-a, iako imaju veliki broj Th17 ćelija, govori suprotno (Chitnis i sar., 2001; Bettelli i sar., 2004). Slično proizilazi iz činjenice da životinje koje nemaju Th17 ćelije ipak razvijaju EAE, mada sa blažom kliničkom slikom (Komiyama i sar., 2006; Ivanov i sar., 2006). Verovatno je da su obe ove ćelijske subpopulacije CD4⁺ T-ćelija važne u patogenezi EAE-a i drugih organ-specifičnih autoimunskih bolesti.

1.12.a Efekti glukokortikoida u multiploj sklerozi i u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Iako primena GK ima malog uticaja na dugoročnu prognozu MS, visoke doze glukokortikoida i dalje predstavljaju zlatni standard za lečenje akutnih recidiva i optičkog neuritisa i tada se intravenozno primenjuje 0,5-2 g metilprednizolona pet uzastopnih dana (Pozzilli i sar., 2004).

Svoj povoljan efekat terapiji multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa ostvaruje putem većeg broja mehanizama.

1. Indukcija apoptoze

Fenomen apoptoze indukovane glukokortikoidima je prvi put je opisao Screpanti davne 1989. godine (Screpanti i sar., 1989). U prisustvu glukokortikoida DNK zavisna transkripcija i *de novo* genska ekspresija posledično dovodi do stvaranja pro-apoptotskih proteina kao što su Bim i PUMA (Erlacher i sar., 2005; Wang i sar., 2006; Almawi I sar., 2004) . i apoptoze. Nakon primene glukokortikoida dolazi do aktivacije endogenih i egzogenih kaspaza, oslobađanja katepsina B iz lizozoma, povišenog nivoa H₂O₂ i produkcije ceramida koji predstavljaju preduslov za nastanak apoptoze (Herold i sar., 2006). Indukcija apoptoze T limfocita unutar CNS-a je zapažena kako u EAE modelu tako i kod pacijenata koji su oboleli od multiple skleroze. U fazi remisije kod Lewis pacova u MBP indukovanom EAE zapažena je masivna apoptoza autoreaktivnih T limfocita kičmene moždine prouzrokovani kako egzogenim davanjem (Tabi i sar., 1994) tako i endogeno produkovanim glukokortikoidima (Pender i sar., 1992). Da endogeni glukokortikoidi imaju veoma važnu ulogu u regulaciji neuroinflamacije potvrđeno je činjenicom da pacovi kojima je otklonjena adrenalna žlezda oboljevaju od fulminantnog oblika EAE koji je praćen odsustvom apoptoze (Grauer i sar., 2001; Smith i sar., 1996). Suprotno tome, visoke doze metilprednizolona primenjene u AT-EAE kod Lewis pacova dovode do dozno zavisne apoptoze T limfocita što je praćeno i blažom kliničkom slikom (Schmidt i sar., 2000). Ovaj fenomen je zapažen i kod ljudi i potvrđen je prisustvom apoptoze leukocita periferne krvi poreklom od pacijenata koji su oboleli od MS nakon terapijske aplikacije visokih doza GK (Leussink i sar., 2001). Pokazano je da su CD4+ T limfociti mnogo podložniji DNK fragmentaciji u odnosu na CD8+ T limfocite što se delimično može objasniti različitim nivoom ekspresije pro-apoptotskog Bcl-2 proteina (Migita i sar.,1997). Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da endogeni i egzogeni glukokortikoidi u MS i njenom eksperimentalnom analogu EAE imaju veliku ulogu u indukciji apoptoze T limfocita i to pretežno CD4+ subpopulacije i na taj način u mnogome ublažavaju klinički tok bolesti.

2. Dejstva na krvno-moždanu barijeru i migraciju leukocita

Krvno-moždana barijera predstavlja selektivno propustljivu endotelnu barijeru između krvi i nervnog tkiva. Ova selektivna propustljivost je određena liposolubilnošću supstanci i prisustvom specifičnih transportnih sistema koji sa jedne strane omogućavaju prolazak esencijalnih molekula u moždano tkivo, a sa druge uklanjaju produkte metabolizma iz moždanog tkiva (Pardridge i sar., 1993). Krvno moždanu barijeru u najužem smislu čine endotelne ćelije kapilara mozga. Njihov zid ne sadrži glatke mišićne ćelije ni elastična vlakna, pa se ovi kapilari po tome kao i po svojoj manjoj veličini mogu razlikovati od drugih kapilara sistemske cirkulacije (Goldstein i sar., 1983). Kapilari unutar moždanog parenhima ne propuštaju makromolekule i cirkulišuće ćelije usled jakih interendotelnih veza (engl. tight junction). Ove čvrste veze sprečavaju prolazak leukocita kroz entotel. Transcelularno kretanje ćelija je takođe onemogućeno zbog slabog kapaciteta ćelija endotela za pinocitozu.

U fiziološkim uslovima vaskularne endotelne ćelije ne ekspimiraju adhezione molekule kao što su ICAM-1 and VCAM-1 koji se ekspimiraju u uslovima inflamacije kao odgovor na prisustvo IFN- γ i TNF- α (Sloka i Stefanelli, 2005). Posledično, integrini na encefalogenim T limocitima reaguju sa ICAM-1 I VCAM-1 adhezionim molekulima što uslovljava ekstravazaciju efektorskih T limfocita unutar CNS-a (Engelhardt, 2006).

Poznato je da glukokortikoidi smanjuju nivo integrina na T limfocitima kao i nivo endotelnih adhezionih molekula. Rezultati jedne opsežne kliničke studije su nedvosmisleno pokazali da nakon aplikacije MP dolazi do redukcije solubilnih VCAM-1 i E-selektina u serumu pacijenata koji su oboleli od MS (Elovaara i sar., 2000). Takođe, postoje podaci koji ukazuju na inhibitorno dejstvo GK na okludin i kladin 5 proteine kao i na matriks metaloproteinazu 9 (MMP9)(Blecharz i sar. 2010). Hartmann i njegovi saradnici su pokazali da GK dovode do smanjenja aktivnosti MMP9 tako što dovode do povećanja ekspresije njenih endogenih inhibitora TIMP3 (od eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Hartmann i sar. 2009). U sklopu dejstva GK na krvno-moždanu barijeru može se zaključiti da GK svoj povoljan efekat ostvaruju putem delovanja na međućelijski kontakt i remodelovanje matriksa.

3. Uticaj na aktivaciju T limfocita

U mišijem EAE modelu pokazano je da se manipulacijom B7-CD28/CTLA-4 kostimulatornih molekula može sprečiti nastanak EAE (Karandikar et al. 1998). Vanderheyde i njegova istraživačka grupa su pokazali da metilprednizolon dovodi do smanjene aktivacije T limfocita putem CD86 signalnog sistema, inhibicije sazrevanja dendritskih ćelija putem CD86/80 koreceptorskih molekula i smanjene produkcije TNF- α , IL-6 i IL-12 što rezultira smanjenim inflamacionim odgovorom (Vanderheyde et al. 1999).

2. CILJEVI

Promena koncepta patogeneze EAE-a i MS-a sa Th1 na Th17 ćelijsku subpopulaciju je dovela i do promene fokusa potencijalnih terapijskih pristupa sa komponenti Th1 do Th17 puta (Kleinschek, 2007). Danas se u terapiji multiple skleroze pored novih terapijskih modaliteta i dalje primenjuju glukokortikoidi u cilju kupiranja akutnog relapsa i pogoršanja bolesti. Još uvek nisu poznati svi mehanizmi delovanja glukokortikoida kao ni relativni doprinos pojedinih efekata njihovom povoljnom terapijskom delovanju u multiploj sklerozi i drugim bolestima u kojima se primenjuju. Takođe se ne zna kako deluju na novootkrivene medijatore oštećenja, kakav je u slučaju autoimunskih bolesti centralnog nervnog sistema IL-17. Stoga je cilj ovog rada da ispitamo da li, kako i gde glukokortikoidi, preciznije Metilprednizolon (MP) deluju na ekspresiju i produkciju IL-17.

Da bi se na ta pitanja odgovorilo u ovom istraživanju postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitati dejstvo MP na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ćelija limfnog čvora neimunizovanih DA pacova u *in vitro* uslovima
2. Ispitati dejstvo MP na antigen specifičnu produkciju IFN- γ i IL-17 u *in vitro* uslovima.
3. Ispitati dejstvo MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane prečišćenih T limfocita.
4. Ispitati moguće sinergistično inhibitorno dejstvo IFN- γ i MP na produkciju IL-17 u *in vitro* uslovima.
5. Ispitati dejstvo MP na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ćelija poreklom iz infiltrata kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a
6. Ispitati dejstvo MP na kliničko ispoljavanje EAE-a
7. Ispitati dejstvo MP na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA pacova u *in vivo* uslovima
8. Ispitati mehanizam kojim MP inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 u *in vivo* uslovima
9. Ispitati uticaj MP na ćelijski infiltrat unutar kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

10. Analizirati da li MP svoje dejstvo na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 ostvaruje putem glukokortikoidnog receptora primenom antagonista glukokortikoidnog receptora Mifepristona (RU 486).

3. MATERIJAL I METODE

3.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U ovom istraživanju korišćeni su pacovi oba pola genetski visokosrodnog soja Dark Agouti (DA) i soja AO (Albino Oxford) starosti od 2 do 6 meseci kao i NOD (eng. *Non-obese diabetic*) miševi muškog pola. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog .komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2 INDUKCIJA I EVALUACIJA EAE-A

3.2.1 Imunizacija životinja

Za indukciju EAE-a kod pacova DA soja korišćen je homogenat kičmene moždine pacova (HKM) koji je pripremljen homogenizovanjem tkiva kičmene moždine DA pacova uz dodavanje fiziološkog rastvora sa fosfatnim puferom (PBS, engl. Phosphate Buffer Saline,) u odnosu 1g tkiva prema 1ml PBS-a (50 % težina u odnosu na zapreminu). Kao adjuvansi su u zavisnosti od eksperimenta korišćeni Kompletni Frojndov adjuvans (CFA, Difco Laboratories, SAD, koji sadrži 1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*). EAE je indukovano intradermalnim (i.d) ubrizgavanjem u zadnju šapu pacova 0.1 ml encefalitogene emulzije, napravljene mešanjem istih zapremina homogenata kičmene moždine (KM) pacova i kompletnog Frojnovog adjuvansa (CFA, Difco Laboratories, SAD, koji sadrži 1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*). Kičmena moždina pacova je homogenizovana uz dodavanje puferizovanog fiziološkog rastvora (PBS, engl. Phosphate Buffer Saline,) u odnosu 1g tkiva prema 1ml PBS-a (50 % težina u odnosu na zapreminu).

NOD miševi su imunizovani MOG₃₃₋₅₅ peptidom (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA.) i to 4 mg/ml. Kao adjuvans je korišćen Kompletni Frojndov adjuvans (CFA, Difco Laboratories, SAD) koji sadrži 1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* i Pertusis toksin 50 mg/ml (Sigma, USA) aplikovan na dan imunizacije i nakon 48h. Nakon 48h

od imunizacije imunizovanim životinjama je aplikovan 0.5 ml 200 mg Pertusis toksina i.p.

3.2.2 Evaluacija kliničke slike

Životinje su posmatrane svakodnevno počev od 6. dana po imunizaciji. Dan kada su registrovani prvi znaci bolesti, najčešće atonija repa, označavan je kao početak bolesti. Stepen težine bolesti izražavan je kroz klinički skor prema skali od 0 do 4 na sledeći način: 0, odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 1, atonija repa; 2, pareza zadnjih ekstremiteta; 3, paraliza zadnjih ekstremiteta i 4, moribundno stanje ili smrt životinje. Stepeni 2 i 3 često su bili udruženi sa inkontinencijom urina i fecesa. U slučaju kada su neurološki znaci bili slabije izraženi od tipičnih za određeni stepen, korišćene su i intermedijarne vrednosti

3.3 Tretman Metilprednizolonom

Od prvog dana bolesti DA pacovima je aplikovan MP (Hemofarm, Vršac, Srbija) u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Pored ove grupe životinja jednu grupu smo tretirali sa PBS i predstavljala je kontrolu eksperimentalnu grupu. Nakon trećeg dana životinje su žrtvovane 3h nakon poslednje aplikacije glukokortikoida.

3.3.1 Tretman antagonistom glukokortikoidnog receptora, Mifepristone- RU486

Od prvog dana bolesti DA pacovima je aplikovan antagonista glukokortikoidnog receptora, Mifepriston-RU486 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u dozi od 25 mg/kg zajedno sa MP. Nakon trećeg dana životinje su žrtvovane 3h nakon poslednje aplikacije

3.4 PRIPREMA ČELIJSKIH SUSPENZIJA I KULTIVISANJE ČELIJA

3.4.1 Medijum za pripremu i kultivisanje ćelija

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 (Sigma, SAD) u koji su dodavane sledeće supstance: 20 mM pufer HEPES (Flow Laboratories, V. Britanija), 50 μ M 2-merkaptoetanol (Fluka, Nemačka), 2 mM L-glutamin (US Biochemical Corp., SAD), 10 mM natrijum-piruvat (Sigma), antibiotici penicilin (100 IU/ml), gentamicin (100 μ g/ml) i antimikotik nistatin (svi Galenika, Srbija). Fetalni teleći serum (FCS, PAA laboratories, Austrija) koji je prethodno inkubiran 30 minuta na 56 °C, u cilju inaktivisanja komponenti komplekta, je dodavan medijumu u koncentraciji od 5 % za kultivisanje ćelija. U slučaju stimulacije ćelija specifičnim antigenom korišćen je medijum sa 2 % pacovskog seruma

3.4.2 Izolovanje ćelija limfnog čvora

Eksperimentalne životinje su žrtvovane etarskom anestezijom, nakon čega su sterilnim instrumentima vađeni cervikalni i poplitealni limfni čvorovi i prenošeni u sterilne posude sa medijumom. Tkivo je potom protiskivano kroz sterilnu najlonsku mrežicu i dobijena ćelijska suspenzija je filtrirana kroz istu. Čelije su zatim taložene centrifugiranjem (500 g, 5 minuta), resuspendovane u medijumu i brojane. Iz ćelijskih suspenzija dobijenih ekstrakcijom iz životinja, deo ćelija je resuspendovan u PBS-u sa 0,1% tripan-plavog (BDSL, V. Britanija) i broj ćelija je određivan brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u, pri čemu mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušene građe membrane) nisu brojane. Potom su ćelijske suspenzije podešavane do željene gustine za odgovarajući eksperiment.

3.4.3 Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Životinje su žrtvovane u različitim terminima po imunizaciji. U cilju eliminisanja krvnih ćelija iz kičmene moždine životinje su najpre perfundovane sterilnim rastvorom PBS. Kičmena moždina je izolovana iz perfundovanih životinja sterilnim priborom. Nakon homogenizacije kičmene moždine, dobijena suspenzija je nanošena na gradijent Perkola koji je formiran naslojavanjem različitih koncentracija (70% i 30%) izotoničnog Perkola. Izotonični Perkol je pripreman od 9 ml Perkola + 1ml 10 x koncentrovanog PBS. U konusne epruvete od 15 ml je prvo nanošeno 6 ml 70% Perkola, a potom 3 ml suspenzije ćelija resuspendovanih u 30% Perkolu. Nakon centrifugiranja u trajanju od 60 minuta na 800 g u epruveti sa gradijentom Perkola se mogao uočiti beli prsten mononuklearnih ćelija kičmene moždine (MNČKM) koji se nalazio na granici dva sloja. Interfazni prsten je pažljivo sakupljan i dva puta pran od ostataka Perkola centrifugiranjem u medijumu sa 5% FCS. Određivanje broja ćelija je određivan na predhodno opisan način (opisan u delu *Izolovanje ćelija limfnog čvora*).

3.4.4 Prečišćavanje CD3⁺ T limfocita

Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja etarskom anestezijom, sterilnim instrumentima su vađeni limfni čvorovi (cervikalni, ingvinalni, paraaortalni, poplitealni) i prenošeni u sterilne posude sa medijumom. Tkivo je potom protiskivano kroz sterilnu najlonsku mrežicu i dobijena ćelijska suspenzija je filtrirana kroz istu. Nakon dva pranja u sterilnom PBS-ćelije su inkubirane biotinskim antitelom specifičnim za CD3 površinski receptor (BD Biosciences, San Diego, CA) i to 0,25 µg na 1x10⁶ ćelija u 400 µl PBS 2mM EDTA 0.5% BSA PBS u trajanju od 30 minuta na +4°C. Nakon inkubacionog perioda ćelije su prane dva puta u 200 µl PBS 2mM EDTA i inkubirane u prisustvu metalnih kuglica koje su obeležene streptavidinom (Streptavidin MicroBeads) u 200µl PBS EDTA u trajanju od 30 minuta na na + 4 °C. Nakon inkubacionog perioda ćelije su oprane tri puta u PBS EDTA i obeležene ćelije su resuspendovane 500 µl PBS EDTA i kao takve su nanosene na MACS separacionu kolonu (Miltenyi Biote, Auburn, CA) koja je prislonjena na magnet. Kolonica se ispirala 3 puta sa 500 µl PBS EDTA koji sadrže CD3- ćelije. Nakon ispiranja, skida se sa magneteta, lagano se naliva 1ml PBS

EDTA i tečnost se protiskuje kroz kolonu klipom u novu epruvetu. Protiskivana tečnost sadrži CD3+ ćelije i nakon brojanja istih (detaljno opisano u delu *Izolovanje ćelija limfnog čvora*) CD3+ ćelije su kultivisane (2×10^6 / 500 μ l RPMI 5%FSC) i stimulisane u prisustvu CD3 (1 μ g/ml; eBioscience, San Diego, CA) i CD28 (1 μ g/ml; eBioscience, San Diego, CA) antitela. Pored pomenutih antitela ćelije su tretirane MP (10 ng/ml). CD3- ćelije su kultivisane (4×10^6 / bunaru) sa LPS (1 μ g/ml) i MP (10 ng/ml) u trajanju od 19h.

3.4.5 Ćelijske kulture

Sve ćelije su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 24 ili 96 bazenčića ravnog dna (Sarstedt, Nemačka) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom (Cole Parmer, SAD), na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO₂ od 5 %. Vreme inkubacije i način stimulacije ćelija je varirao u zavisnosti od eksperimenta. Za merenje produkcije citokina, ćelije limfnog čvora su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 24 bazenčića (2.5×10^6 / 1000 μ l/bazenčić) tokom 96 h. Ćelije kičmene moždine su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 96 bazenčića (5×10^5 / 200 μ l/bazenčić) tokom 72 h.

3.5 ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNOG ODGOVORA ĆELIJA

Proliferativni odgovor ćelija limfnog čvora DA pacova je određivan merenjem ugrađivanja timidina obeleženog radioaktivnim ^3H u novosintetisanu DNK ispitivanih ćelija. Ćelije ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ /bazenčić) su kultivisane u pločama za mikrokultivaciju sa 96 bazenčića tokom 96 h u odsustvu (spontana proliferacija) ili prisustvu 10 ng/ml MBP-a (dobijen ljubaznošću prof. Hartmut Wekerle, Max Planck Institute of Neurobiology, Germany) Nemačkoj) (antigen-specifična proliferacija) i 16 sati pre kraja inkubacije u bazenčiću je dodavan ^3H -timidin ($5 \mu\text{Ci/ml}$, Sigma). Po isteku inkubacije, kulture su sakupljane na filtere od staklenih vlakana pomoću poluautomatskog sakupljača ćelija (Titertek Cell Harvester, Norveška). Filteri su sušeni i stavljeni u po 3 ml scintilacione tečnosti koja sadrži 4 g PPO i 0,1 g POPOP u 1 l toluola u bočicama za merenje radioaktivnosti (hemikalije i bočice, NEN, SAD). Radioaktivnost, koja je srazmerna ugradnji ^3H -timidina u novosintetisanu DNK i predstavlja merilo proliferacije ćelija u kulturi, određivana je scintilacionim beta brojačem (Rackbeta Spectral LKB Wallac, Finska). Svaki uzorak je ispitivan u triplikatu, a rezultati su iskazani kao srednje vrednosti broja otkucaja u minutu triplikata. Takođe, uticaj MP na proliferaciju ćelija limfnog čvora (ĆLČ) DA pacova je određivan i smanjenjem inteziteta fluorescencije CFSE boje (CFSE, Sigma). Za potrebe ovog testa ĆLČ DA su bile izložene $5 \mu\text{M}$ CFSE boji u trajanju od 10 minuta i nakon inkubacionog perioda su su tri puta prane u PBS-u i kultivisane narednih 48h u prisustvu Con A ($2.5 \mu\text{g/ml}$) sa i bez MP (10 ng/ml).

3.6. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE I PROTOČNA CITOFUORIMETRIJA

3.6.1 Detekcija membranskih molekula

Fenotipska karakterizacija ćelija drenirajućeg limfnog čvora i mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA pacova vršena je tehnikom direktne i indirektno imunofluorescencije korišćenjem protočnog citofluorimetra (FACSCalibur, Becton

Dickinson, SAD). Ispitivana je ekspresija sledećih površinskih markera: CD3 (marker T limfocita), CD4 (marker Th ćelija), CD62L (marker naivnih ćelija), CD 134 (marker aktivisanih ćelija), CD 11b (marker makrofagno/monocitne loze). Monoklonska i poliklonska antitela korišćena u eksperimentima i njihove koncentracije/razblaženja navedeni su u Tabeli 1. Po dobijanju jednoćelijske suspenzije, ćelije su prebacivane u plastične epruvete (u broju od 2×10^5 do 1×10^6 u zavisnosti od eksperimenta) i istaložene centrifugiranjem (500 g, 3 minuta). Posle centrifugiranja i odlivanja supernatanta dodavana su odgovarajuća antitela u 100 μ l PBS-a sa 2 % FCS-a i ćelije su inkubirane 30 do 45 minuta na 4 °C. Antitela koja su obeležena biotinom (CD62, OX40) dodatno su inkubirana u prisustvu SAV-FITC (engl. *Streptavidin/Peridinin Chlorophyll protein*; BD Biosciences) u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacionog perioda ćelije su prane dva puta (PBS), resuspendovane u 300 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru.

Tabela 1. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju ćelija

Antitelo	Proizvođač	Koncentracija (mg/ml)	Razblaženje	Obeleživač
CD4	BD Biosciences	0,2	1:100	PE
CD62	BD Biosciences	0. 5	1:125	Biotin
OX40	BD Biosciences	0.8	1:150	Biotin
CD25	AbD Serotec	0.5	1:100	FITC
CD11b	AbD Serotec	0.5	1:150	FITC
SAv-PerCP* konjugat	BD Pharmingen	0,1	1:600	PerCP

* od engl. Streptavidin/Peridinin Chlorophyll protein (Sav/PerCP) Conjugate

Antitela koja su konjugovana sa biotinom su kasnije obeležena sa SAV-FITC

FITC – fluorescein izotiocijanat

PE – fikoeritrin

3.6.2 Detekcija unutarćelijskih citokina

Za detekciju unutarćelijskih citokina na protočnom citofluorimetru je primenjena metoda dvostrukog unutarćelijskog bojenja. U tu svrhu, 1×10^6 ćelija resuspendovanih u 400 μ l medijuma u plastičnim epruvetama je stimulisano sa phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 200 ng/ml) i jonomicinom (IO, 400 ng/ml) i inkubirano na 37 °C u trajanju od 5 h. Nakon prvog sata inkubacije je dodavan inhibitor oslobađanja proteina, Brefeldin A (5 μ M). Posle inkubacije, u nekim eksperimentima je sledilo obeležavanje ćelija sa anti-CD4 antitelom (kao što je opisano u prethodnom poglavlju). Potom su ćelije fiksirane 2 % paraformaldehidom u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, oprane u PBS-u i držane na +4 °C u frižideru do permeabilizacije. Za permeabilizaciju je korišćen pufer za permeabilizaciju (PB) koji se sastojao iz 2 % FCS, 0,01% Triton-a i 2% BSA u kome su ćelije inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su centrifugirane i resuspendovane u 100 μ l istog pufera. Ćelije su prvo inkubirane 30 min na +4 °C u prisustvu biotinom obeleženih anti-IFN- γ antitela ili odgovarajuće izotipske kontrole, potom prane dva puta u puferu za permeabilizaciju, resuspendovane u 100 μ l PB i nakon dodavanja anti-IL-17 antitela i odgovarajuće izotipske kontrole i Sav-PerCP konjugata inkubirane 90 minuta na +4 °C. Nakon dva pranja u PB, ćelije su resuspendovane u 300 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru

.Tabela 2. Reagensi korišćeni za unutarćelijsko bojenje

Antitelo	Izotip	Proizvođač	Koncentracija (mg/ml)	Razblaženje	Obeleživač
Pacovsko anti-mišije IL-17A	IgG2a	eBioscience (San Diego, USA)	0,2	1:200	PE
Pacovsko anti-mišje irelevantne specifičnosti	IgG2a	eBioscience (San Diego, USA)	0,2	1:200	PE
Pacovsko anti-mišije IL-17A	IgG2a	eBioscience (San Diego, USA)	0,5	1:200	FITC
Pacovsko anti-mišje irelevantne specifičnosti	IgG2a	eBioscience (San Diego, USA)	0,5	1:200	FITC
Anti-pacovsko/mišje IFN- γ	IgG1 \square	Biosource (San Diego, USA)	0,5	1:500	Biotin
Mišje anti-pacovsko irelevantne specifičnosti	IgG1 \square	eBioscience (San Diego, USA)	0,5	1:500	Biotin
SAv-PerCP* konjugat	/	BD Pharmingen (San Diego, USA)	0,1	1:600	PerCP

3.7 ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE GENA

Relativna ekspresija pojedinih gena u različitim ćelijama poreklom iz imunizovanih DA pacova određivana je korišćenjem kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja (od engl. *Polymerase chain reaction, PCR*). Prethodno je iz ispitivanih ćelija izolovana RNK i reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNK (cDNK).

3.7.1 Izolacija RNK

Uzorci koji su sadržavali 5×10^6 ispitivanih ćelija prenošeni su u epruvete od 2 ml (Sarstedt), centrifugirani (2000 g, 3 minuta) i po odstranjivanju medijuma lizirani su blagim pipetiranjem u 500 μ l reagensa za izolaciju RNK (Total RNA Isolation Kit, Metabion, Nemačka). Potom su dopunjavani sa 100 μ l hloroforma, mešani na mešalici tokom 10 sekundi, ostavljeni 15 minuta na 4 °C i centrifugirani 15 minuta (12800 g, 4 °C). Nakon centrifugiranja i formiranja tri faze u epruveti, vodena faza koja sadrži izdvojenu RNK prenošena je u drugu epruvetu i RNK je precipitirana dodavanjem izopropanola u zapremini koja je bila jednaka zapremini prenete vodene faze (oko 300 μ l). Nakon blagog mešanja, epruvete su ostavljane tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 15 minuta (12800 g, 4 °C). Potom je istaložena RNK ispirana sa 1 ml 75 % etanola uz centrifugiranje od 5 minuta (12800 g, 4 °C). Po završetku ispiranja i odstranjivanja etanola, precipitati su sušeni i rastvarani u 10 μ l demineralizovane H₂O. Takođe je određivana koncentracija izolovane RNK u uzorcima merenjem apsorpcije na 260 nm i poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu, odnosno ispitivan stepen njene čistoće na 280 nm talasne dužine na kojoj je maksimalna moć apsorpcije aromatičnih amino kiselina. (Odnos A_{260nm} / A_{280nm} između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu korišćen je spektrofotometar (GeneQuant pro, Amersham, SAD).

3.7.2 Reverzna transkripcija

Nakon izolacije i merenja, izolovana RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevođena u cDNK. Iz uzoraka je uzimana ona zapremina koja je sadržavala 1 µg rastvorene RNK i dopunjavana je do 15 µl demineralizovanom vodom sa 0,2 µg heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci (Fermentas, Litvanija) i smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas) u količini koja odgovara finalnoj koncentraciji od 1 mM za svaki dNTP. Po mešanju, rastvorena RNK je denaturisana na 70 °C 10 minuta, posle čega su uzorci stavljeni 2 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 µl 5 puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5 x reaction buffer, Fermentas) i 1 µl (200 U) reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas), uzorci su mešani i inkubirani na 25 °C, 15 minuta, a potom na 42 °C, 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70 °C, 10 minuta i 95 °C, 3 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na 4 °C do dalje upotrebe. Reakcija reverzne transkripcije obavljena je u epruvetama od 200 µl (Eppendorf, Nemačka), a inkubacija na različitim temperaturama je obavljena pomoću odgovarajućeg aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf). U cilju provere postojanja kontaminacije, u svakoj reakciji korišćena je i negativna kontrola koja je sadržavala sve reagense osim RNK.

3.7.3 Prajmeri

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji dizajnirani su na osnovu sekvenci dostupnih u bazi podataka ENTREZ korišćenjem odgovarajućeg kompjuterskog programa (Primer Express® software v2.0, Applied Biosystems, SAD). Sekvence i finalne koncentracije prajmera koji su korišćeni za umnožavanje i detektovanje cDNK za GAPDH, β-aktin i citokine navedeni su u Tabeli 3 Svi prajmeri su sintetisani i nabavljeni od strane kompanije Sigma.

Tabela 3. Prajmeri i probe korišćeni u PCR reakciji

Sekvenca (5'-3')	Konc. (nM)
β-aktin	
F – CCCTGGCTCCTAGCACCAT	330
R – GAGCCACCAATCCACACAGA	330
IFN-γ	
F - AACAGTAAAGCAAAAAAGGATGCA	330
R – TGTGCTGGATCTGTGGGTTGT	110
IL-17	
F - CTACCTCAACCGTTCCACTTCAC	330
R – CCTCCCAGATCACAGAAGGATATC	330
IL-23	
F - TCC ACC AAA CTC CCC AGA CA	320
R - CTG TGC ATG CTC TTT GGT TGA T	320
RoryT	
F - GAC AGG GCC CCA CAG AGA	280
R - TTT GTG AGG TGT GGG TCT TCT TT	280
T-bet	
F - CCA ACA ATG TGA CCC AGA TGA T	110
R - CTG GCT CAC CGT CAT TCA	130

F – prajmer komplementaran kodirajućem (sens) lancu DNK

R – prajmer komplementaran nekodirajućem (antisens) lancu DNK

3.7.4 Kvantitativni PCR

Kvantitativni PCR („Real-time“ PCR) korišćen je za analizu relativne ekspresije citokinskih gena kod DA pacova. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bazenčića adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmpTM Optical, Applied Biosystems) i u svaki od bazenčića dodavano je po 10 μ l reakcione smeše, koja se sastojala od 8 μ l 2,5 x koncentrovanog komercijalno pripremljenog „master-miksa“ (2.5 x RealMasterMix-Probe, Eppendorf) i po 1 μ l specifičnih nukleotida za gen od interesa odnosno za β -aktin (smeša je za svaki gen sadržavala par prajmera i obeleženu probu kao što je prikazano u tabeli 2). Potom je u svaki bazenčić dodavano po 10 μ l odgovarajućeg uzorka razblaženog 10 puta (1 μ l uzorka u 9 μ l demineralizovane vode). Koncentracije prajmera i proba za različite gene određene su preliminarnim eksperimentima. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Bunarčići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1000 g, prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7500, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95 °C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95 °C i 1 minut na 60 °C. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom bazenčiću i iskazan kao srednja vrednost duplikata pojedinačnih životinja.

3.8 ELISA i cELISA

Produkcija citokina u supernatantima ćelijskih kultura određivana je ELISA (od engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) metodom. U tu svrhu korišćene su ploče za mikrotitraciju MaxiSorp (Nunc, Danska) i komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje odgovarajućih citokina i to: za IFN- γ i IL-17 (OptEIA Rat IFN- γ , odnosno IL-17 set, BD Biosciences Pharmingen, SAD). Supernatanti kultura su sakupljeni posle inkubacije od 72 h i odvajani od ćelija centrifugiranjem (12000 g, 3 minuta). Potom su zamrzavani i čuvani do analize. Sam postupak izvođenja ELISA metode obavljan je sa reagenasima i rastvorima i prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Tipičan protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa primarnim antitelom (50 μ l/bazenčić, preko noći na 4° C), ispiranje (5 x, 300 μ l/bazenčić), blokiranje (200 μ l/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x, 300 μ l/bazenčić), inkubacija uzoraka (50 μ l/bazenčić, 2 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x, 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (50 μ l/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 x 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa avidin-enzimskim kompleksom (peroksidaza rena) (50 μ l/bazenčić, 30 minuta na sobnoj temperaturi), ispiranje (7 x 300 μ l/bazenčić), inkubacija sa supstratom (tetrametilbenzidin, TMB) (50 μ l/bazenčić, do 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku), zaustavljanje reakcije sa 50 μ l 1M HCl ili H₂SO₄ i očitavanje apsorbancije pomoću spektrofotometra (Titertek) korišćenjem filtra za 450 nm. Svaki uzorak je rađen u duplikatu, a za pojedine citokine (IFN- γ), supernatanti su razblaživani pre analize (najčešće 4 puta). Količina citokina (u pg/ml) određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za rekombinantni citokin koji je prethodno serijski razblažen (dvostruko opadajuće razblaženje u rasponu od 10000 pg/ml do 15,6 pg/ml).

Za potrebe cELISA testa ćelije (4×10^5 u 200 μ l po bazenčiću) su nanese u bazenčiće koji su prethodno obloženi sa Poly-L-lizinom (1:1000). Nakon inkubacije preko noći u RPMI 0.5% FCS ćelije su tretirane sa MP (10 ng/ml) u trajanju od 2h, nakon čega su stimulisane u prisustvu ConA (2,5 μ g/ml) u trajanju od 40 minuta. Nakon pomenutih inkubacija ćelije su fiksirane sa 4% paraformaldehidom i izložene antitelima specifičnim za p-ERK, p-p38, p-JNK, p-JUN i c-Fos (Santa Cruz Biotechnology,CA) i odgovarajućim sekundarnim antitelima (Santa Cruz Biotechnology,CA).

3.9 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija ili standardna greška (SV \pm SD ili SE) dobijene u više nezavisnih eksperimenata ili kao rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta izabranog od nekoliko ponovljenih eksperimenata sa sličnim rezultatima. Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti ekspresije gena i nivoa produkovanih citokina je korišćen Studentov *t*-test. Vrednost parametara *p* manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

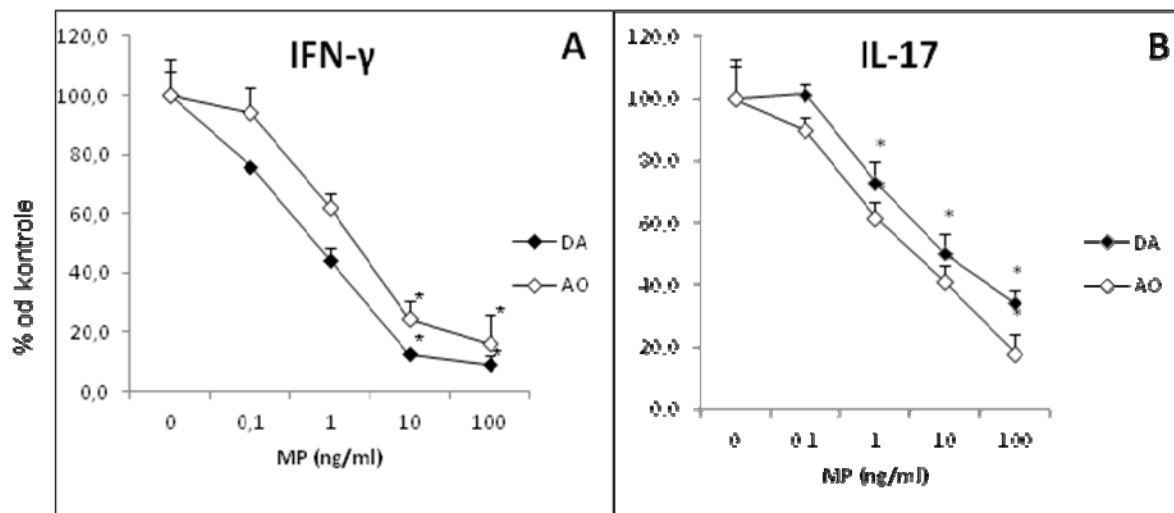
4. REZULTATI

4.1 Uticaj MP na produkciju, proliferaciju ćelija limfnog čvora i ekspresiju gena Th1 i Th17 citokina u *in vitro* uslovima

Obzirom da MP predstavlja terapiju izbora u lečenju relapsa MS naš prvi korak je bio da ispitamo dejstvo MP na produkciju i ekspresiju IFN- γ i IL-17, citokina koji imaju dominantnu ulogu u imunopatogenezi MS i EAE-a.

4.1.1 Uticaj MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane mitogenom aktivisanih ćelija limfnog čvora

U cilju ispitivanja dejstva MP na produkciju IFN- γ i IL-17 kultivisali smo ćelije limfnog čvora (ĆLČ) neimunizovanih AO i DA pacova u prisustvu optimalne koncentracije T ćelijskog mitogena ConA (2.5 ug/ml) bez ili sa MP u različitim dozama (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml). Nakon 48h inkubacije merili smo koncentraciju produkovanih IFN- γ i IL-17 u supernatantima ćelijskih kultura. Sudeći po dobijenim rezultatima (Prilog 1A) inhibicija produkcije IFN- γ pod uticajem MP bila je dozno-zavisna, a doze MP od 10 ng/ml i 100 ng/ml dovele su do statistički značajne inhibicije produkcije ovog citokina. Kada se analizira inhibicija produkcije IL-17 (Prilog 1B) jasno je da je i u ovom slučaju bila prisutna dozno-zavisna inhibicija produkcije, ali diskretnija ukoliko se uporedi sa inhibicijom produkcije IFN- γ . Dalje, kada smo uporedili dejstvo MP na ĆLČ AO i DA pacova (Prilog 1A I B) jasno je da ovaj fenomen nije zavisio od soja pacova iako se vidi da su ĆLČ DA pacova bili nešto osetljiviji na dejstvo MP tj. inhibicija je bila izraženija u poređenju sa stepenom inhibicije oba citokina u slučaju ĆLČ AO pacova.

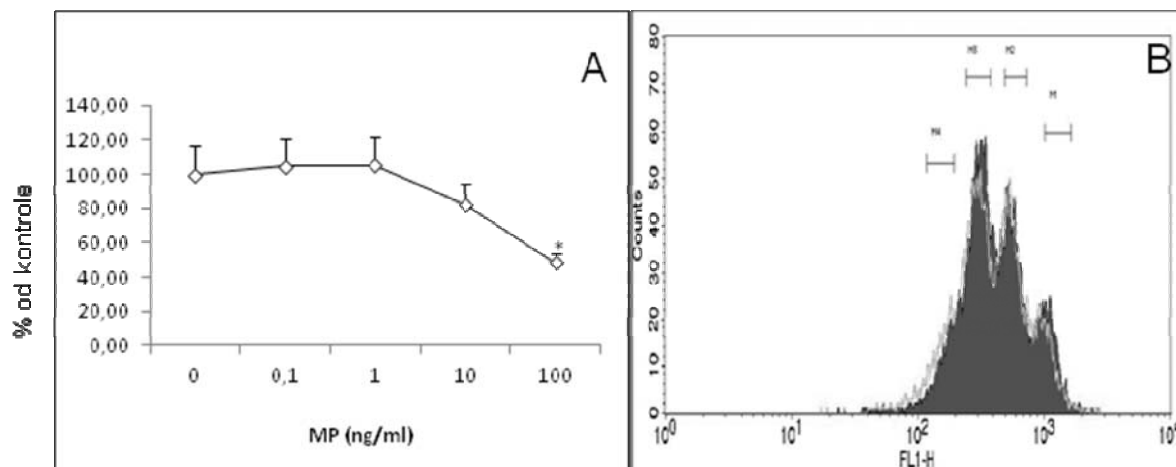


Prilog 1. MP na dozno-zavisni način inhibira produkciju IFN- γ i IL-17 od strane mitogenom aktivisanih ČLČ pacova. ČLČ AO i DA pacova ($2,5 \times 10^6$ /ml) su kultivisane u prisutstvu ConA ($2,5 \mu\text{g/ml}$) bez i sa MP (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) i meren je nivo produkcije IFN- γ i IL-17 u supernatantima kultura nakon 48h inkubacije korišćenjem ELISA metode. Rezultati su izraženi kao procenat produkcije ovih citokina u kulturama sa MP u odnosu na produkciju bez dodatog MP i predstavljaju srednju vrednost (+/-SD) iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.1.2 Uticaj MP na proliferaciju ćelija limfnog čvora DA pacova

Poznato da je jedan od načina kojim MP ostvaruje svoja antiinflamatorna i imunosupresorna dejstva inhibicija proliferacije ćelija imunskog sistema. Kako bismo utvrdili da predhodno pokazani rezultat koji se odnosio na inhibiciju produkcije i IFN- γ i IL-17 nije samo posledica inhibicije proliferacije ćelija ispitali smo uticaj MP na proliferaciju ĆLČ. Koristeći identičan eksperimentalni dizajn kao u predhodnom eksperimentu stimulisali smo ĆLČ DA pacova sa ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) i kultivisali ih u odsustvu ili prisustvu MP u rastućim dozama (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml). Proliferativni odgovor smo određivali merenjem inkorporacije timidina obeleženog radioaktivnim vodonikom (^3H) u novosintetisanu DNK aktiviranih ĆLČ DA pacova. Zapaža se (Prilog 2A) doza od 100 ng/ml dovodi do izražene i statistički značajne inhibicije proliferacije, pa je inhibicija produkcije citokina pri ovoj dozi MP velikim delom posledica smanjenja broja ćelija koje produkuju citokine. Međutim, pošto smo pokazali da doza od 10 ng/ml dovodi do izražene inhibicije produkcije IFN- γ i nešto diskretnije inhibicije produkcije IL-17 (Prilog 1) bilo je značajno videti koji je uticaj MP u toj dozi na proliferaciju ĆLČ kako bi isključili potencijalnu inhibitornu ulogu MP na proliferaciju. Odsustvo značajne inhibicije proliferacije limfocita u prisutvu MP u dozi od 10 ng/ml nedvosmisleno ukazuje da zapažena inhibicija produkcije oba citokina pri ovoj dozi nije posledica smanjenog broja ćelija. Dalje, MP pri manjim dozama (0.1 ng/ml i 1 ng/ml) nije uticao na proliferaciju, ali obzirom da je pri tim malim dozama izostala statistički značajna inhibicija produkcije oba citokina, u daljim eksperimentima ih nismo koristili. Odsustvo inhibicije mitogenom indukovane proliferacije limfocita u prisutvu MP u dozi od 10 ng/ml potvrdili smo analizom smanjenja inteziteta CFSE boje u ovim ćelijama. Naime, poznato je da se CFSE boja vezuje kovalentnim vezama za proteine i da intezitet fluorescence opada nakon svake deobe (Lyons i Parish, 1994). Stoga smo uticaj MP na proliferaciju ispitali i smanjenjem inteziteta fluorescence CFSE boje na protočnom citofluometru i pokazali da MP primenjen u koncentraciji od 10 ng/ml ne inhibira deobu ĆLČ stimulisanu ConA (Prilog 2B). Dakle, i merenjem inkorporacije timidina obeleženog radioaktivnim vodonikom (^3H) u novosintetisanu DNK i određivanjem dilucije CFSE boje jasno je pokazano da MP u koncentraciji od 10

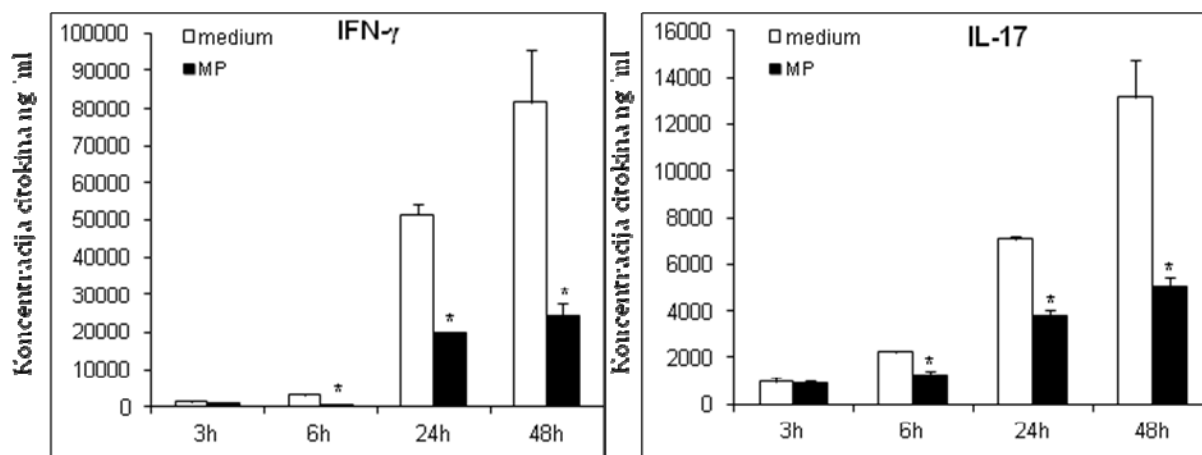
ng/ml nje doveo do značajnijih promena u proliferaciji ČLČ DA pacova. Imajući to u vidu u daljim eksperimentima je korišćena doza od 10 ng/ml.



Prilog 2. Uticaj MP na proliferaciju limfocita pacova. ČLČ su kultivisane u pločama za mikrokultivaciju sa 96 bazenčića ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}/\text{bazenčić}$) tokom 48 h u prisustvu Con A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) i MP ($0,1 - 100 \text{ ng}/\text{ml}$) i 16 sati pre kraja inkubacije u bazenčiće je dodavan ^3H -timidin ($5 \mu\text{C}/\text{ml}$). Za potrebe CFSE bojenja ČLČ DA pacova su kultivisane sa $5 \mu\text{M}$ CFSE boje i inkubirane 10 minuta. Nakon inkubacije ČLČ su tri puta prane u PBS-u i kultivisane narednih 48h u prisustvu Con A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) sa i bez MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$). Nakon isteka inkubacionog perioda ČLČ su analizirane na protočnom citometru. Tamno siva linija predstavlja ČLČ kultivisane sa ConA, svetlo siva linija predstavlja ČLČ kultivisane sa ConA+MP. Rezultati su izraženi kao procenat ConA indukovane proliferacije u kulturama sa različitim koncentracijama MP u odnosu na proliferaciju bez dodatog MP (Prilog 2A). Rezultati CFSE bojenja predstavljaju srednju vrednost dilucije CFSE boje.(B). Prikazani su rezultati jednog od 3 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima. (* $p < 0,05$ predstavlja statističku značajnost razlike procenta inhibicije proliferacije između kultura tretiranih različitim dozama MP).

4.1.3 MP inhibira ekspresiju IFN- γ i IL-17 u ČLČ DA pacova aktivisanim mitogenom

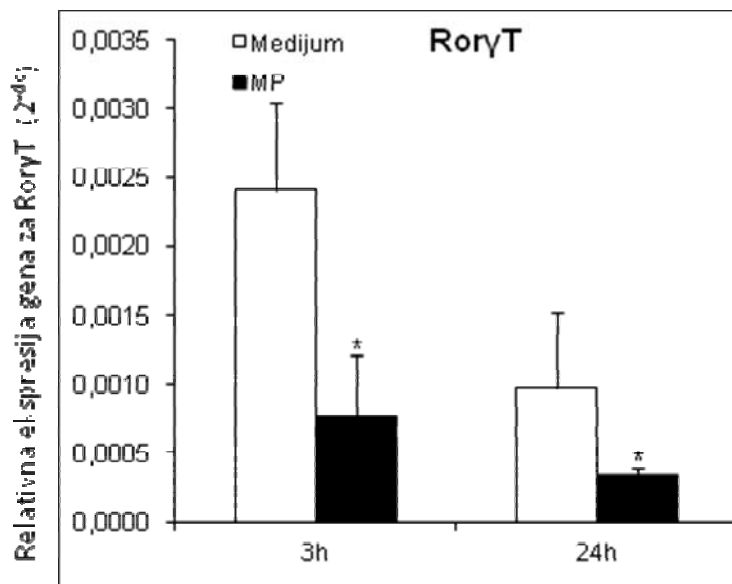
S obzirom da glukokortikoidi svoje efekte ostvaruju kako uticajem na transkripciju gena, tako i negenomskim mehanizmima, u sledećim eksperimentima ispitali smo da li je inhibicija produkcije IFN- γ i IL-17, prethodno ustanovljena pri delovanju MP u dozi koja ne utiče na proliferaciju ćelija, posledica inhibicije ekspresije gena za ove citokine. Stoga smo ispitali da li MP ima inhibitorno dejstvo na ekspresiju gena za IFN- γ i IL-17 u ČLČ neimunizovanih DA pacova. Nakon ConA stimulacije i kultivacije sa MP u različitim vremenskim tačkama (1h, 3h, 6h, 24h) izolovana je RNK iz ČLČ i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za IFN- γ i IL-17 u odnosu na ekspresiju konstitutivno eksprimiranog gena (β -aktin). Sudeći po dobijenim rezultatima (Prilog 3) MP nakon jednočasovne inkubacije nije doveo do inhibicije ekspresije gena za IFN- γ , čak naprotiv, doveo je i do blagog porasta što nije statistički značajno. Međutim, ako pogledamo relativnu ekspresiju gena za IFN- γ posle duže inkubacije (3h, 6h i 24h) vrlo jasno se vidi da je došlo do inhibicije koja je najizraženija nakon 6h. Ovo ukazuje da je predhodno pokazana inhibicija produkcije ovog citokina (Prilog 1) zapravo posledica genomskog mehanizma delovanja MP. Ako se osvrnemo na IL-17 dobijeni rezultat ukazuje da nakon 1h kultivacije nije došlo do inhibicije ekspresije IL-17 (kao i u slučaju IFN- γ), dok je ona bila vrlo diskretna nakon 3h kultivacije. Kada je kultivacija tj. dejstvo MP duže (6h i 24h) vrlo jasno se uočava da je MP doveo do izražene i statistički značajne inhibicije ekspresije gena za ovaj citokin. Imajući u vidu ovaj rezultat možemo zaključiti da MP pored izrazitog inhibitornog dejstva na ekspresiju IFN- γ dovodi i do inhibicije ekspresije gena za IL-17. Sa druge strane, ako uporedimo stepen inhibicije ekspresije gena za IL-17 sa stepenom inhibicije gena za IFN- γ (Prilog 3) jasno se vidi da ona nije tako izražena kao u slučaju IFN- γ posebno nakon 6h što i odgovara nalazu koji ukazuje na različiti stepen inhibicije produkcije oba citokina (Prilog 1).



Prilog 3. MP inhibira ekspresiju gena za IFN- γ i IL-17u ĆLĀ DA pacova. ĆLĀ DA pacova (5×10^6 /ml) su u *in vitro* uslovima aktivirane sa mitogenom ConA ($2.5 \mu\text{g/ml}$) i kultivisani u prisustvu/odsustvu MP (10 ng/ml). U različitim vremenskim tačkama (1h, 3h, 6h i 24h) izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode određena relativna ekspresija iRNK za IFN- γ i IL-17. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) ĆLĀ DA pacova za određeni termin \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije IFN- γ i IL-17 u odnosu na ekspresiju gena u u kulturi bez dodatog MP).

4.1.4 MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ T od strane ČLČ DA pacova aktivisanim mitogenom

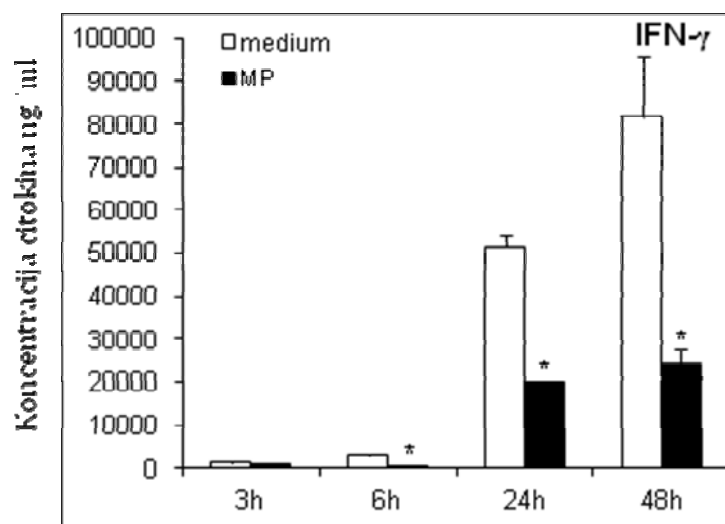
Predhodni rezultati su nedvosmisleno pokazali da MP dovodi do inhibicije i ekspresije (Prilog 3) i produkcije IL-17 (Prilog 1). Dalje je bilo interesanto ispitati uticaj MP na ekspresiju transkripcionog faktora ROR γ t, koji je esencijalan za samu ekspresiju ovog citokina (Ivanov i sar., 2006). Obzirom da smo pokazali da MP dovodi do inhibicije produkcije IL-17 (Prilog 1B) i ekspresije gena za IL-17 (Prilog 3) naš sledeći korak je bio da ispitamo da li je pokazana inhibicija praćena i inhibicijom Ror γ T transkripcionog faktora. Stoga smo Con A aktivisane ČLČ neimunizovanih DA pacova kultivisali u prisustvu ili odsustvu MP (10 ng/ml). Nakon različitih inkubacionih perioda (3h i 24h) izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za Ror γ T u odnosu na ekspresiju konstitutivno ekspimiranog gena (β -aktin). Kao što se može videti (Prilog br 4), MP je doveo do statistički značajne inhibicije ovog transkripcionog faktora već nakon 3h inkubacije što nam, bar delimično, razjašnjava mehanizam inhibicije kako ekspresije tako i produkcije IL-17. Ovaj podatak nam ukazuje da u našem sistemu inhibicija ekspresije Ror γ T transkripcionog faktora zapravo predhodi kasnijoj inhibiciji ekspresije gena za IL-17 i posledičnoj inhibiciji produkcije ovog citokina.



Prilog 4. MP inhibira ekspresiju Ror γ T transkripcionog faktora u ČLČ DA pacova Nakon kultivacije ČLČ limfnog čvora (5×10^6 /ml) neimunizovanih DA pacova u prisustvu Con A (2.5 ug/ml) bez i sa MP (10 ng/ml) i u trajanju od 3 i 24h izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za Ror γ T. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta C_t}$) DA pacova za određeni termin \pm SD. Prikazani su sumirani rezultati iz 2 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima ($p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije Ror γ T transkripcionog faktora u odnosu na ekspresiju gena u u kulturi bez dodatog MP).

4.1.5 Kinetika inhibicije produkcije IFN- γ od strane ČLČ DA pacova aktivisanih mitogenom pod uticajem MP

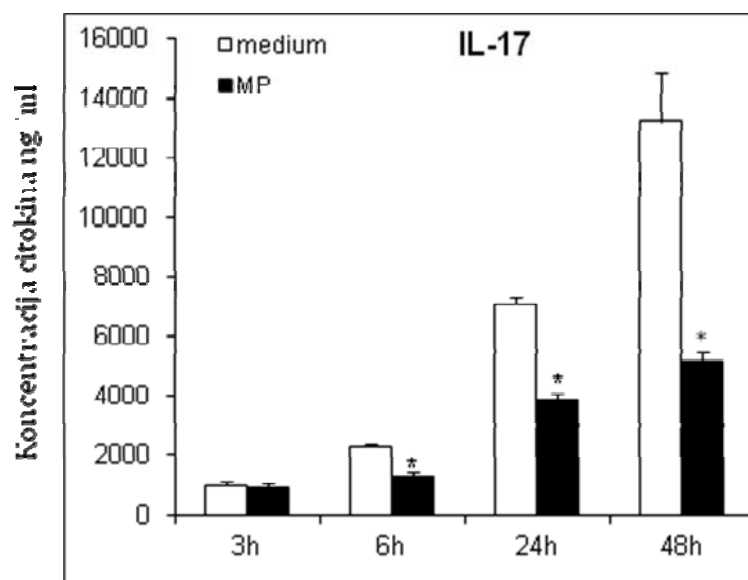
Obzirom da smo predhodno pokazali da MP dovodi do inhibicije ekspresije gena za IFN- γ u različitim vremenskim tačkama (Prilog 3) naš sledeći korak je bio da ispitamo da li je kinetika inhibicije ekspresije praćena istom kinetikom inhibicije produkcije ovog citokina. U tom cilju smo ČLČ iz neimunizovanih DA pacova u *in vitro* uslovima aktivisali sa ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) i kultivisali bez ili sa MP (10 ng/ml). Nakon različitog inkubacionog perioda (3h, 6h, 24h i 48h) merili smo produkciju IFN- γ ELISA metodom. Analizirajući dobijene rezultate (Prilog 5) uprkos veoma niskim koncentracijama produkovanog citokina u kontrolnoj kulturi, vidi se da MP nakon 3h inkubacije nije uticao na ovu produkciju što se podudara i sa njegovim dejstvom na ekspresiju gena za ovaj citokin gde postoji čak i diskretno povećanje relativne ekspresija gena (Prilog 3). U slučaju inkubacije u trajanju od 6h došlo je do statistički značajne inhibicije produkcije IFN- γ što, takođe, odgovara i inhibiciji ekspresije gena za ovaj citokin. Kao što se i moglo očekivati, u dužim inkubacionim periodima (24h i 48h) MP je doveo do statistički značajne inhibicije produkcije IFN- γ što opet u potpunosti odgovara inhibiciji ekspresije gena (Prilog3). Svi ovi nalazi nam, nedvosmisleno, ukazuju da MP svoje dejstvo na produkciju ovog citokina ostvaruje putem genomskih efekata.



Prilog 5. Kinetika inhibicije produkcije IFN- γ pod uticajem MP. Nakon kultivacije ČLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) u prisustvu ConA ($2.5 \mu\text{g/ml}$) i MP (10 ng/ml) meren je nivo produkcije IFN- γ u supernatantima kultura nakon 3h, 6h, 24h i 48h korišćenjem ELISA metode. Rezultati predstavljaju srednju vrednost koncentracije citokina (ng/ml) produkovanih od strane ČLČ DA pacova za određeni termin \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima ($p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.1.6 Kinetika inhibicije produkcije IL-17 od strane ČLČ DA pacova aktivisanih mitogenom pod uticajem MP

Pošto smo pokazali da je MP doveo do inhibicije kako produkcije IFN- γ (Prilog 1A) tako i ekspresije gena za IFN- γ (Prilog 3) i ne tako izražene inhibicije ekspresije gena za IL-17 (Prilog 3) naš sledeći korak je bio da ispitamo kinetiku dejstva MP na produkciju IL-17, kao i da uporedimo stepen inhibicije produkcije ovog citokina u odnosu na IFN- γ . Tako smo kultivisali ČLČ neimunizovanih DA pacova u prisustvu /odsustvu MP (10 ng/ml). Dobijen rezultat je vrlo sličan predhodnom koji se odnosi na inhibiciju produkcije IFN- γ . Dakle, nakon inkubacije sa MP od samo 3h dolazi do vrlo diskretne inhibicije produkcije IL-17 koja nije statistički značajna. U uslovima duže inkubacije (6h, 24h i 48h) dolazi do statistički značajne inhibicije produkcije ovoga citokina što se u potpunosti podudara sa inhibicijom ekspresije gena za IL-17 (Prilog 3). Stoga možemo reći da je predhodno pokazana inhibicija ekspresije gena za IL-17 praćena i inhibicijom produkcije i to u gotovo istom vremenskom obrascu koji se odnosi na odsustvo statistički značajnog dejstva nakon 3h inkubacije i statistički značajnu inhibiciju produkcije nakon dužih inkubacionih perioda. Takođe, ako se ovi rezultati uporede sa rezultatima koji se odnose na kinetiku inhibicije produkcije IFN γ (Prilog 5) uočava se da stepen inhibicije nije isti. Naime, inhibicija produkcije IL-17 je svakako prisutna u dužim inkubacionim periodima ali je ona, i ovoga puta, diskretnija u poređenju sa inhibicijom produkcije IFN- γ (Prilog 5).



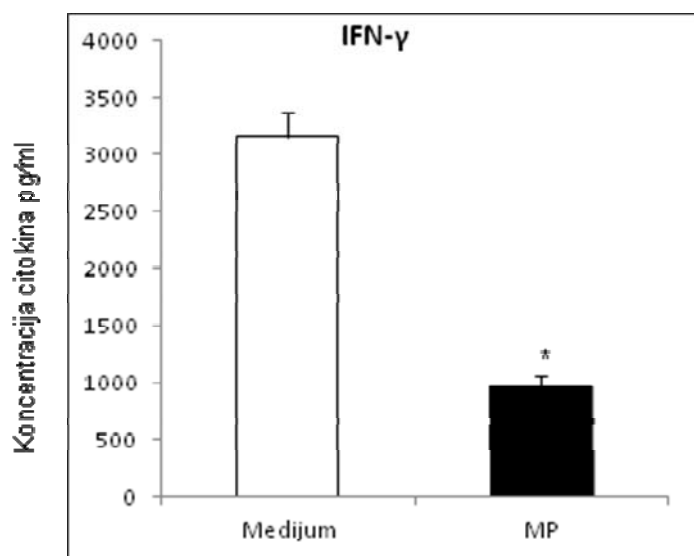
Prilog 6. Kinetika inhibicije produkcije IL-17 pod uticajem MP. Nakon kultivacije ČLČ ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) u prisutstvu ConA ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) bez i sa MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$) meren je nivo produkcije IL-17 u supernatantima kultura nakon 3h, 6h, 24h i 48h korišćenjem ELISA metode. Rezultati predstavljaju srednju vrednost koncentracije citokina (ng/ml) produkovanih od strane ČLČ DA pacova za određeni termin \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima ($p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IL-17 u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.2 Uticaj MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane antigen-specifičnih ćelija

U svim dosadašnjim rezultatima pokazano je da MP, bez izuzetka, inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ĆLĀ neimunizovanih DA pacova. Sa druge strane u imunopatogenezi MS i EAE-a dominantnu ulogu imaju antigen-specifične ćelije unutar CNS-a. Stoga smo u cilju razjašnjavanja potencijalnih mehanizama kojima MP ostvaruje svoja povoljna dejstva u EAE-a ispitali i njegov uticaj na produkciju oba citokina od strane antigen-specifičnih ćelija poreklom iz drenirajućeg limfnog ćvora (DLĀ) i KM DA pacova koji su oboleli od EAE-a.

4.2.1 MP inhibira antigen-specifićnu produkciju IFN- γ od strane ćelija drenirajućeg limfnog ćvora DA pacova koji su oboleli od EAE-a

Prethodni rezultati pokazali su da MP inhibira mitogenom indukovanu produkciju IFN- γ od strane ĆLĀ neimunizovanih pacova DA soja (Prilog 5). S obzirom na naćin aktivacije, u produkciji ispitanog citokina sudelovali su svi T limfociti, ukljućujući i veliki broj naivnih ćelija. Stoga smo u sledećim eksperimentima Źeleli da ispitrano da li MP u istoj dozi ima inhibitorno dejstvo na produkciju IFN- γ od strane ćelija koje su prethodno *in vivo* aktivisane specifićnim antigenom, proliferisale i diferentovale u efektorske ćelije. Stoga je naredni korak bila imunizacija DA pacova homogenatom kićmene moŹdine (HKM) emulgovanim u CFA Źto je uobićajen imunizacioni protokol za koji je poznato da dovodi do indukcije EAE-a kod razlićitih eksperimentalnih Źivotinja (Baxter, 2007). Imajući u vidu da imunski odgovor na antigene CNS koji dovodi do EAE zapoćinje u limfnim ćvorovima koji dreniraju mesto ubrizgavanja encefalitogene emulzije analizirane su ćelije poplitealnih limfnih ćvorova. U tom cilju, Źestoga dana nakon imunizacije ćelije su kultivisane sa specifićnim antigenom-mijelin baznim proteinom (MBP) u dozi 10 $\mu\text{g/ml}$ u odsustvu ili prisustvu MP u dozi od 10 ng/ml . Posle inkubacije u trajanju od 72h u supernatantima kultura merena je kolićina produkovanog IFN- γ korišćenjem ELISA metode. Kao Źto se moŹe videti (Prilog 7) MP je doveo do statistićki znaćajne inhibicije antigen specifićne produkcije IFN- γ od strane ćelija DLĀ imunizovanih pacova. Ovaj nalaz nam, bez sumnje, ukazuje da MP svoje inhibitorno dejstvo tokom primene u MS-u i EAE-u ostvaruje dejstvom i na antigen specifićnu produkciju IFN- γ , glavnog medijatora neuroinflamacije.

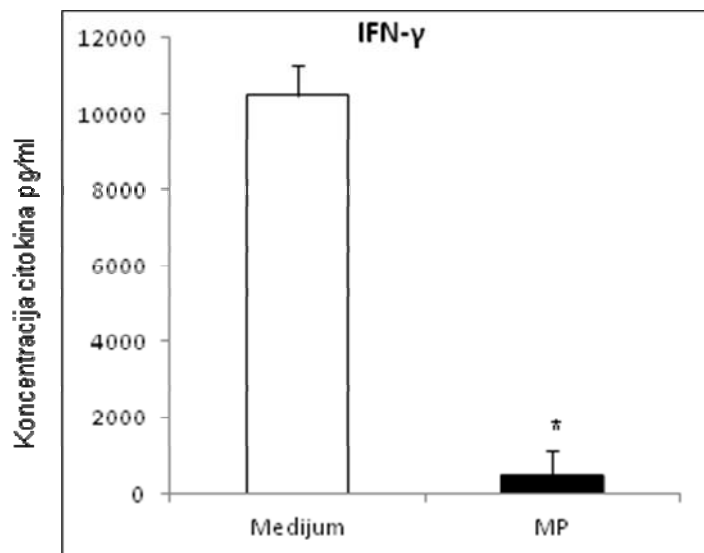


Prilog 7. MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IFN- γ od strane ćelija DLČ imunizovanih DA pacova Ćelije DLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) DA pacova žrtvovanih 6. p.i su kultivisane sa MBP-a ($10 \mu\text{g/ml}$) bez ili sa MP (10 ng/ml). Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 5 urađenih nezavisnih eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike antigen specifične produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.2.2 MP inhibira antigen-specifične produkciju IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

Pored nedovoljnog poznavanja svih mehanizama koji se nalaze u osnovi povoljnog terapijskog delovanja glukokortikoida u autoimunskim bolestima CNS-a, kontradiktorni su i podaci koji se odnose na mesto njihovog delovanja. Dok se po jednim svi efekti ostvaruju isključivo na periferiji (Wüst i sar. 2008), postoje i ubedljivi dokazi koji govore u prilog delovanja glukokortikoida u okviru samog CNS (Sorrells i Sapolsky. 2007). Kako smo predhodnim rezultatima pokazali da MP dovodi do inhibicije i antigen- specifične produkcije IFN- γ od strane ćelija DLČ (Prilog 7) u induktivnoj fazi bolesti naš sledeći korak je bio da ispitamo da li MP deluje i na produkciju IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine (MNČKM) DA pacova u razvijenoj fazi bolesti. Tako je 10-tog dana nakon imunizacije nakon perfuzije izvađena KM obolelih pacova i iz nje su izolovane MNČKM. Nakon izolacije, MNČKM kultivisane su u prisustvu MBP (10 μ g/ml) i odsustvu ili prisustvu MP (10 ng/ml) u trajanju od 72h nakon čega je merena produkcija IFN- γ korišćenjem ELISA metode.

Analizirajući dobijeni rezultat jasno je da je MP pored svog inhibitornog dejstva na produkciju IFN- γ od strane DLČ statistički značajno inhibirao produkciju IFN- γ i od strane MNČKM (Prilog 8). Sve predhodno navedeno nas navodi na zaključak da MP deluje kako u perifernom limfnom tkivu tj. DLČ tako i u CNS-u odnosno da svoje dejstvo ostvaruje kako u pokretanju imunskog odgovora tako i u kasnijoj fazi bolesti.

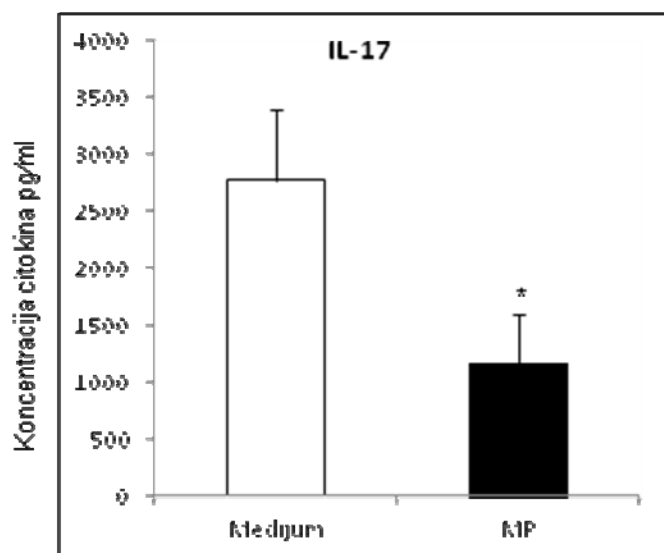


Prilog 8. MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IFN- γ od strane MNČKM DA pacova obolelih od EAE. MNČKM ($0,25 \times 10^6/200\mu\text{l}$) imunizovanih DA pacova žrtvovanih 10. dana p.i. su kultivisane sa MBP-a ($10 \mu\text{g/ml}$) i sa ili bez MP (10 ng/ml). Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 5 urađenih nezavisnih eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike antigen specifične produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.2.3 MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IL-17 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova obolelih od EAE-a

Pošto smo pokazali da MP dovodi do inhibicije antigen specifične produkcije IFN- γ naš sledeći cilj je bio da ispitamo da li MP ostvaruje isto dejstvo na produkciju IL-17 od strane antigen specifičnih ćelija poreklom iz DLČ u induktivnoj fazi bolesti. Stoga smo koristeći indentičan eksperimentalni dizajn iz predhodnog priloga DLČ kultivisali u prisustvu MBP (10 μ g/ml) i prisustvu ili odsustvu MP (10ng/ml) u trajanju od 72h nakon čega je merena produkcija IL-17 korišćenjem ELISA metode.

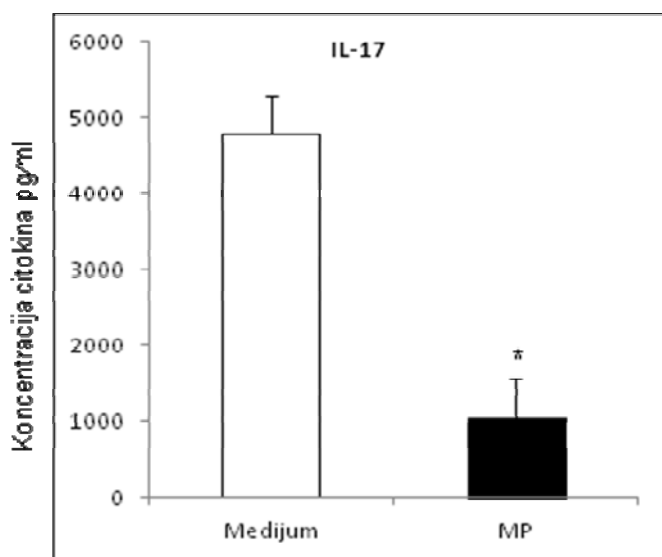
Očigledno je da MP pored inhibicije antigen specifične produkcije IFN- γ dovodi i do inhibicije antigen specifične produkcije IL-17 od strane DLČ na samom početku bolesti (Prilog 9). Međutim, ukoliko i ovoga puta uporedimo stepen inhibicije antigen-specifične produkcije IL-17 od strane ćelija DLČ sa stepenom inhibicije antigen specifične produkcije IFN- γ (Prilog 7) očigledno je ona manje izražena, slično rezultatu koji se tiče inhibicije produkcije IL-17 od strane ČLČ poreklom iz neimunizovanih DA pacova (Prilog 6). Analizirajući ovaj rezultat možemo zaključiti da je IL-17 nešto manje osetljiv na inhibitorno dejstvo MP kako na nivou ekspresije (Prilog 3) i produkcije (Prilog 6) od strane ČLČ DA pacova tako i od strane antigen specifičnih ćelija poreklom iz DLČ na samom početku bolesti.



Prilog 9. MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IL-17 od strane ćelija DLČ imunizovanih DA pacova. Ćelije DLČ ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) DA pacova žrtvovanih 6. p.i su kultivisane sa MBP ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) sa ili bez MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$). Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 5 urađenih nezavisnih eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike antigen specifične produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.2.4 MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

Imajući u vidu već pomenute kontradiktorne podatke iz literature koji se tiču mesta delovanja MP u EAE-u sa jedne strane i dosadašnje rezultate koji nedvosmisleno ukazuju da je IL-17 u nekoj meri manje osetljiv na dejstva MP kako na nivou ekspresije tako i na nivou produkcije od strane ČLČ neimunizovanih DA pacova, bilo je interesantno istražiti dejstvo MP na antigen specifičnu produkciju IL-17 od strane MNČKM DA pacova obolelih od EAE. Tako smo koristeći isti eksperimentalni dizajn nakon izolacije MNČKM kultivisali u prisustvu MBP (10 µg/ml) i prisustvu /odsustvu MP (10ng/ml) u trajanju od 72h nakon čega je merena produkcija IL-17 korišćenjem ELISA metode. Sudeći po dobijenom rezultatu (Prilog 10) MP je doveo do vrlo jasne i statistički značajne inhibicije antigen specifične produkcije IL-17 od strane MNČKM. I ovoga puta inhibicija je bila nešto diskretnija ukoliko se upoređi sa MP uslovljenom antigen-specifičnom produkcijom IFN-γ od strane MNČKM.



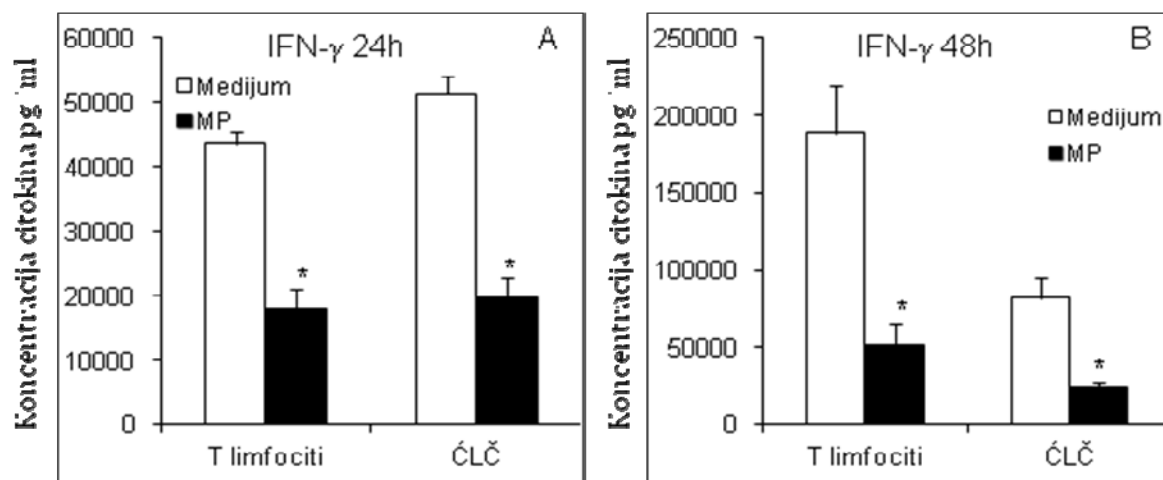
Prilog 10. MP inhibira antigen-specifičnu produkciju IL-17 od strane MNČKM imunizovanih pacova MNČKM ($0,25 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$) imunizovanih DA pacova žrtvovanih 10. dana p.i. su kultivisane sa MBP (10 µg/ml), sa ili bez MP (10 ng/ml). Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 5 urađenih nezavisnih eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike antigen specifične produkcije IFN-γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.3 Dejstvo MP da produkciju IFN- γ i IL-17 od strane T limfocita

Obzirom da postoje brojni mehanizmi koji mogu biti u osnovi različite osetljivost IFN- γ i IL-17 na dejstvo MP naš sledeći cilj je bio da ispitamo da li, i u kom stepenu MP inhibira produkciju IFN- γ i IL-17 od strane prečišćenih T limfocita.

4.3.1 MP inhibira produkciju IFN- γ od strane prečišćenih T limfocita

Pošto smo pokazali da MP dovodi do inhibicije kako ekspresije i produkcije IFN- γ od strane CLC neimunizovanih DA pacova tako i antigen-specifičnu produkciju od strane DLČ i MNČKM DA pacova obolelih od EAE sledeće što se nametnulo kao predmet našeg istraživanja je da li je ova inhibicija posledica direktnog dejstva MP na T limfocite ili je rezultat prethodno opisane inhibicije produkcije citokina koji uslovljavaju diferencijaciju CD4+ T ćelija u pravcu Th1 subpopulacije (Zen i sar., 2011) Prečišćenu populaciju T limfocita dobili smo izdvajanjem CD3+ ćelija iz suspenzije CLC magnetnom separacijom (opisano u poglavlju Materijal i metode). Dobijenu ćelijsku suspenziju prečišćenih T limfocita aktivisali smo kultivacijom sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima u prisustvu ili odsustvu MP. Dobijeni rezultati (Prilog 11A) su pokazali da je MP doveo do inhibicije produkcije IFN- γ od strane prečišćenih T limfocita već nakon 24h, kao i u slučaju CLC neimunizovanih DA pacova . Nakon 48h kultivacije produkcija IFN- γ od strane T limfocita i CLC neimunizovanih DA pacova bila je očekivano veća u odnosu na inkubaciju u trajanju od 24h, dok se stepen inhibicije produkcije ovog citokina nije bitno razlikovao od inhibicije nakon 24h inkubacije (Prilog 11B).

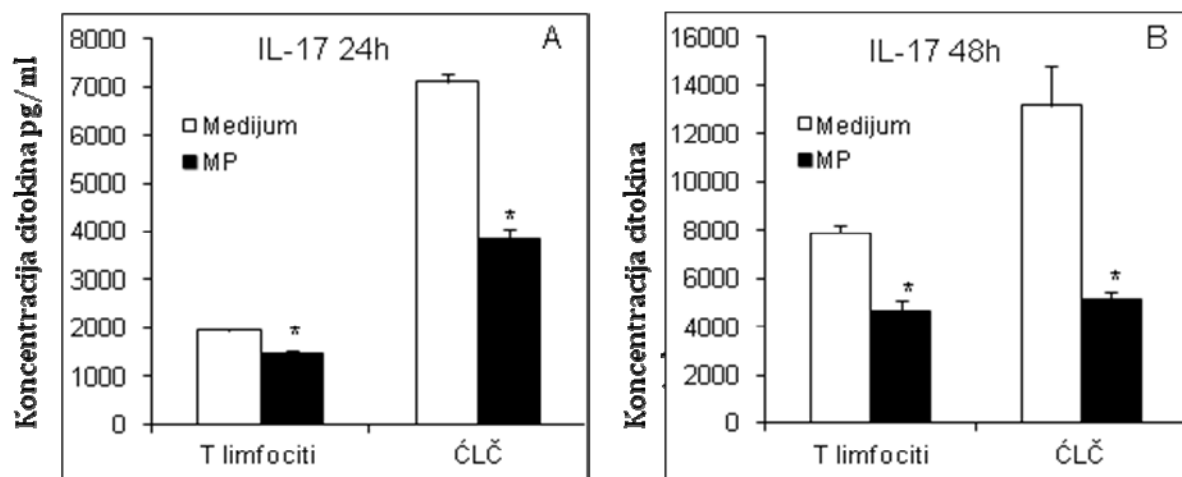


Prilog 11 MP dovodi do inhibicije produkcije IFN- γ od strane prečišćenih T limfocita

Iz poplitealnih, cervikalnih, ingvinalnih i paraaortalnih limfnih čvorova izolovali smo CD3+ ćelije koristeći MACS streptavidin mikrokuglice i MACS separacione kolone. Nakon toga su CD3+ ćelije ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) aktivirane sa anti-CD3 antitelima ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) i anti-CD28 antitelima ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) i kultivisane u osustvu ili prisustvu MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$). Koncentracija IFN- γ u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 24h i 48h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 3 nezavisna eksperimenta, ($p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IFN- γ u odnosu na produkciju citokina u kulturi bez dodatog MP).

4.3.2 MP inhibira produkciju IL-17 od strane prečišćenih T limfocita

Naredni korak je bio da se ispita da li i na koji način MP inhibira produkciju IL-17 od strane prečišćenih T limfocita poreklom iz neimunizovanih DA pacova. Stoga smo, koristeći identični eksperimentalni dizajn kao i u slučaju IFN- γ , dobili rezultate koji ukazuju da MP dovodi do inhibicije produkcije ovog citokina (Prilog 12). Uočljivo je da je u slučaju kultivacije ČLČ sa MP inhibicija produkcije ovog citokina bila izraženija kada se uporedi sa dejstvom MP na prečišćene T limfocite. Ovakav rezultat nas navodi na zaključak da MP ima dvostruko dejstvo na produkciju IL-17: direktno na T limfocite i indirektno na tzv. akcesorne ćelije unutar limfnog čvora gde započinje sam autoimunski proces. Nakon 24h inkubacije inhibicija produkcije ovog citokina bila je manje izražena kako od strane T limfocita tako i od strane ČLČ (Prilog 12A), dok je inhibicija produkcije IL-17 bila izraženija kada je inkubacioni period duži (48h) (Prilog 12B). Takođe, kada se stepen inhibicije produkcije IL-17 uporedi sa inhibicijom produkcije IFN- γ , i ovoga puta, jasno se vidi da je ona mnogo manje izražena kako u slučaju prečišćenih T limfocita tako i u slučaju ČLČ. Uzimajući u obzir ovaj nalaz i predhodno pokazane rezultate koji se odnose na manje izraženu inhibiciju ekspresije gena za IL-17 (Prilog 3), produkcije IL-17 od strane ČLČ (prilog br 6) kao i antigen-specifičnu produkciju IL-17 u odnosu na IFN- γ i od strane DLČ (Prilog 9) kao i od strane MNČKM (Prilog 9) možemo zaključiti da IL-17 i u slučaju dejstva MP na prečišćene T limfocite pokazuje manji stepen osetljivosti na inhibitorno dejstvo MP.

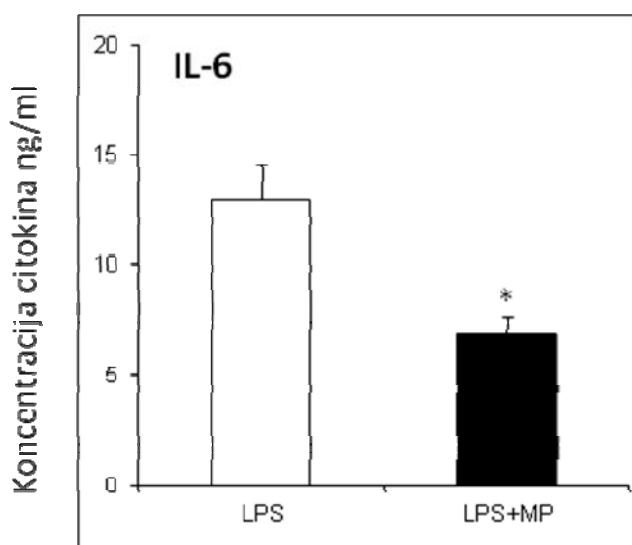


Prilog 12. MP dovodi do inhibicije produkcije IL-17 od strane prečišćenih T limfocita

Iz poplitealnih, cervikalnih, ingvinalnih i paraaortalnih limfnih čvorova izolovali smo CD3+ ćelije koristeći MACS streptavidin mikrokuglice i MACS separacione kolone. Nakon toga su CD3+ ćelije ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) aktivirane sa anti-CD3 antitelima ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) i anti-CD28 antitelima ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) i kultivisane u prisustvu ili odsustvu MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$). Koncentracija IL-17 u supernatantima određivana je ELISA metodom nakon 24h i 48h inkubacije. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracije citokina (pg/ml) iz 3 nezavisna eksperimenta, $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike između MP tretiranih i netretiranih ćelija.

4.3.3 MP inhibira IL-6 produkciju od strane CD3⁻ ćelija

Imajući u vidu razliku u stepenu inhibicije produkcije IL-17 između prečišćenih T limfocita i ukupne populacije ćelija limfnog čvora koja je ukazivala na indirektno delovanje MP, ispitali smo efekte MP na produkciju IL-6 od strane CD3⁻ ćelija. U heterogenoj mešavini CD3⁻ ćelija dobijenih posle prethodno opisanog izdvajanja CD3⁺ T limfocita nalaze se i akcesorne ćelije koje svojim citokinima, uključujući IL-6, omogućavaju polarizaciju ka Th17 odgovoru. Vrlo snažan aktivator ovih ćelija je endotoksin- lipopolisaharid (LPS). Stoga su, CD3⁻ ćelije koje smo dobili prečišćavanjem CD3⁺ ćelija iz limfnog čvora, bile aktivisane sa LPS, i kultivisane u odsustvu ili prisustvu MP. Kao što se može videti (Prilog 13) nakon aktivacije CD3⁻ ćelija limfnog čvora sa LPS u prisustvu MP (10 ng/ml) došlo je do inhibicije produkcije IL-6, citokina koji je važan za Th17 polarizaciju. Dakle, može se zaključiti da je izraženija inhibicija IL-17 u slučaju kultivacije ČLČ sa MP u odnosu na prečišćene T limfocite (Prilog13) bar delimično uslovljena inhibicijom produkcije citokina IL-6 koji ima veoma važnu ulogu u diferencijaciji Th17 ćelijske subpopulacije.



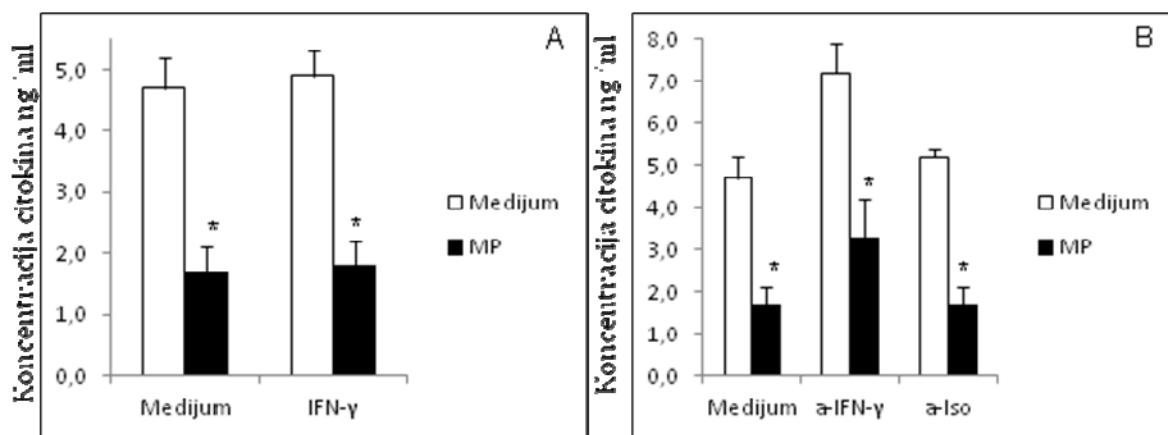
Prilog 13. MP inhibira IL-6 produkciju od strane CD3⁻ ćelija. CD3⁻ ćelije (1.5×10^6 /ml) dobijene negativnom selekcijom ćelija poreklom iz ČLČ neimunizovanih pacova DA soja kultivisane su *in vitro* sa LPS (1 μ g/ml) i u odsustvu ili prisustvu MP (10ng/ml). 48h kasnije je u supernatantima kultura merena je koncentracija IL-6 korišćenjem ELISA metode. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD koncentracije citokina (ng/ml) iz 2 nezavisna eksperimenta. (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike između MP tretiranih i netretiranih ćelija.

4.4 Uticaj endogenog IFN- γ na produkciju IL-17 od strane ćelija limfnog čvora neimunizovanih DA pacova

Do sada je, bez izuzetaka, pokazano da MP inhibira produkciju i IFN- γ i IL-17 kao i da inhibicija produkcije IFN- γ nikada nije potpuna. Takođe, uzimajući u obzir uočenu razliku u osetljivosti IFN- γ i IL-17 na dejstvo MP postavlja se pitanje da li i na koji način uvek prisutan IFN- γ reguliše produkciju IL-17. Stoga smo, u cilju rasvetljavanja njihovog međusobnog odnosa ispitali produkciju IL-17 od strane ĆLĆ neimunizovanih DA pacova u prisustvu egzogeno dodatog rekombinantnog IFN- γ kao i njegovog neutrališućeg antitela.

4.4.1 MP zajedno sa IFN- γ dovodi do inhibicije produkcije IL-17

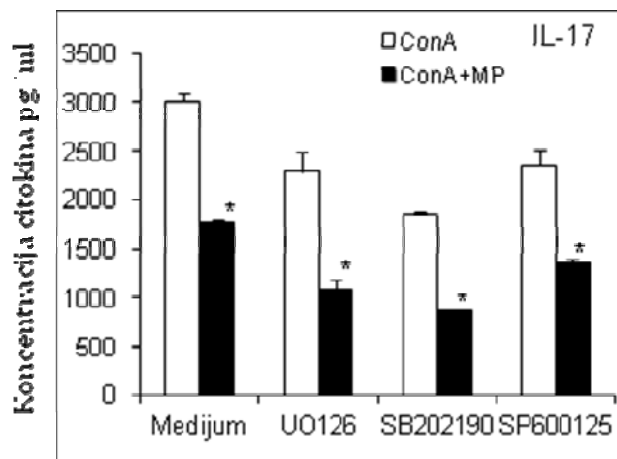
Mnogobrojni podaci ukazuju da IFN- γ inhibira polarizaciju ka Th17 ćelijama i sledstveno smanjuje produkciju IL-17 (Prinz i Kalinke. 2010). Analizirajući IFN- γ kao potencijalni inhibitor Th17 polarizacije i posledične produkcije IL-17 i imajući u vidu pokazanu diskrepancu u stepenu inhibicije produkcije IFN- γ (Prilog 5) i IL-17 (Prilog 6) pod uticajem MP od strane ĆLĆ neimunizovanih DA pacova postavilo se pitanje na koji način uvek prisutan IFN- γ utiče na produkciju IL-17. Stoga, naš sledeći korak je bio da ispitamo da li je manja osetljivost IL-17 na dejstvo MP zapravo posledica eliminacije IFN- γ pod uticajem MP. Za potrebe ovog eksperimenta ĆLĆ neimunizovanih DA pacova smo stimulisali sa ConA i kultivisali sa MP sa ili bez dodatog rekombinantnog IFN- γ (Prilog 14A). Kao što se može videti, egzogeni IFN- γ nije uticao na produkciju IL-17 u kulturi mitogenom stimulisanih ćelija i nije promenio stepen inhibicije ove produkcije pod uticajem MP. Nakon ovakvog rezultata bilo je zanimljivo ispitati posledice neutralizacije preostalog, endogenog IFN- γ specifičnim anti-IFN- γ antitelom. Iz ovih rezultata (Prilog 14B) se može zaključiti da primena antitela koje neutrališe IFN- γ dovodi do statistički značajnog povećanja IL-17 produkcije kako u odsustvu, tako i u prisustvu MP što nije slučaj sa njegovom nespecifičnom izotipskom kontrolom. Stoga, možemo reći da u našem eksperimentalnom modelu endogeni IFN- γ i u malim količinama predstavlja negativan regulator IL-17 produkcije i na taj način učestvuje sa MP u inhibiciji produkcije IL-17 od strane ĆLĆ neimunizovanih DA pacova.



Prilog 14. MP zajedno sa IFN- γ dovodi do inhibicije produkcije IL-17. ČLČ DA pacova ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) su stimulisane sa ConA ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) i inkubirane sa ili bez MP ($10 \text{ ng}/\text{ml}$), IFN- γ (IFN- γ $100 \text{ ng}/\text{ml}$), neutrališućeg IFN- γ antitela (α -IFN- γ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) i njegovom izotipskom kontrolom (α -Iso $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) u trajanju od 24h. Nakon toga su u supernatantima kultura merene koncentracije IL-17 korišćenjem ELISA metode. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracija citokina (ng/ml) iz 2 nezavisna eksperimenta * $p < 0,05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na kontrolne ćelije kultivisane u medijumu

4.4.2. MP svoje dejstvo ne ostvaruje delujući na ERK, P38 ili JNK signalni put kod ConA stimuliranih ćelija limfnog čvora DA pacova

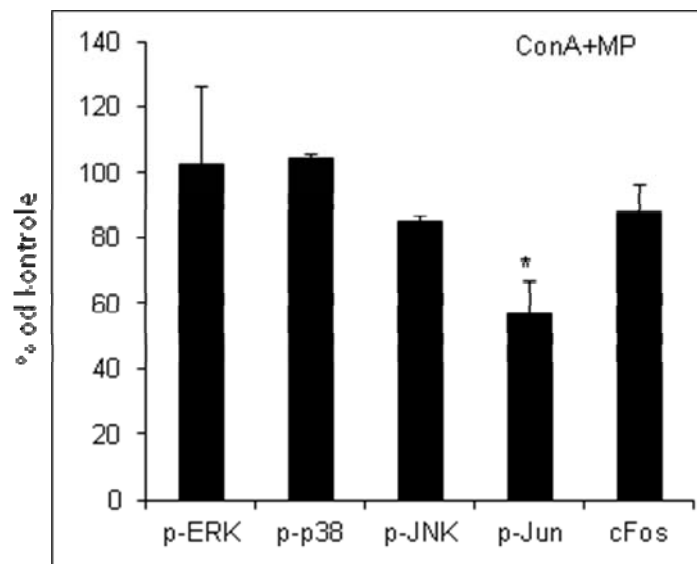
Naši dosadašnji rezultati su pokazali da MP dovodi do inhibicije produkcije IL-17 od strane ČLČ DA pacova (Prilog 6). Imajući u vidu da ovoj inhibiciji produkcije IL-17 predhodi i inhibicija ekspresije gena za ovaj citokin (Prilog 3) može se reći da je ovaj efekat ostvaren putem genomskih mehanizama. Isto tako, poznato je da glukokortikoidi svoja dejstva mogu ostvariti delovanjem na unutraćelijsku signalizaciju. Obzirom da se zna da nakon vezivanja antigena/stimulusa za T ćelijski receptor dolazi do aktivacije MAPK signalnih puteva (*eng.* Mitogen Activated Protein Kinases) (Abram i sar. 2007) naš sledeći korak je bio da ispitamo uticaj MP na ConA indukovani MAPK signalni put kod ČLČ DA pacova. U cilju da saznamo da li i na koji MAPK signalni put MP deluje koristili smo inhibitore MAP kinaza i to: ERK inhibitor (UO126), p38 inhibitor (SB202190) i JNK inhibitor (SP600125) i nakon 40 min merili smo produkciju IL-17 ELISA metodom. Sudeći po dobijenom rezultatu (Prilog 15) svaki od ovih inhibitora pojedinačno, kada se uporedi sa kontrolom (medijum) dovodio je do inhibicije produkcije IL-17. Međutim, kada je bilo koji od inhibitora primenjen u kombinaciji sa MP i dalje je dolazilo do statistički značajne inhibicije produkcije ovog citokina što nam ukazuje da MP svoje inhibitorno dejstvo ne ostvaruje putem ERK, p38 i JNK signalnog puta.



Prilog 15. MP dovodi do diskretne inhibicije ERK, P38 ili JNK signalnog puta kod ConA stimuliranih ćelija limfnog čvora DA pacova. ČLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) DA pacova smo aktivisali sa ConA ($2,5 \mu\text{l/ml}$) i kultivisali u prisustvu/odsustvu MP (10 ng/ml) i ERK inhibitora (UO126, $20 \mu\text{M}$) ili p38 inhibitora (SB202190, $20 \mu\text{M}$) ili JNK inhibitora (SP600125, $40 \mu\text{M}$) i nakon 24h merili smo produkciju IL-17 ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na kontrolnu kulturu u kojima nije dodat MP.

4.4.3 MP svoje inhibitorno dejstvo na IL-17 produkciju ostvaruje putem inhibicije Jun aktivacionog puta

Prethodnim rezultatom smo pokazali da MP dovodi do inhibicije produkcije IL-17 uprkos prisustvu inhibitora ERK, inhibitora p38 i inhibitora JNK i time dokazali da MP ne deluje na ove komponente MAPK signalnog puta. Pored pomenutih MAP kinaza u aktivaciji ćelija imunskog sistema transkripcioni faktor AP-1 ima veoma važnu ulogu. On je sačinjen iz dve subjedinice: p-Jun i Fos proteina i predstavlja vrlo važan, gotovo neizostavni, transkripcioni faktor prilikom aktivacije ćelija imunskog sistema i ćelija uopšte. Uzimajući sve u obzir, naš sledeći korak je bio da ispitamo da li MP ima udela u smanjenju untraćelijskog nivoa pomenutih proteina čije smo inhibitore koristili u predhodnom eksperimentu kao i da proverimo da li deluje na inhibiciju fosforilisanog Jun (p-Jun) i fosforilisanog Fos proteina (cFos) subjedinice AP-1. U tom cilju smo ČLČ DA pacova kultivisali sa MP u trajanju od 2h. Nakon toga smo aktivisali ČLČ sa ConA i nakon 40 min inkubacije smo analizirali unutraćelijski nivo p-ERK, p-p38, p-JNK, p-Jun i cFos proteina cELISA metodom. Dobijeni rezultat nedvosmisleno pokazuje da MP ne deluje na unutraćelijski nivo p-ERK, p-p38, p-JNK MAP kinaza. Ovaj rezultat kao i rezultat koji se odnosi na inhibiciju produkcije IL-17 uprkos prisustva inhibitora UO126, SB202190 i SP600125 (Prilog 15) nam još jednom potvrđuje da MP u našem sistemu ne deluje na aktivnost pomenutih MAP kinaza. Ali ako pogledamo dejstvo MP na unutraćelijski nivo p-Jun proteina jasno je da dolazi do statistički značajnog sniženog untraćelijskog nivoa ove subjedinice AP-1 transkripcionog faktora. Na kraju, ovakav nalaz ukazuje da MP ima inhibitorno dejstvo na p-Jun subjedinicu AP-1 transkripcionog faktora što nam, bar delimično, rasvetljava mehanizam dejstva MP.



Prilog 16. MP svoje inhibitorno dejstvo na IL-17 produkciju ostvaruje putem inhibicije Jun aktivacionog puta. ČLČ DA pacova (4×10^5 /ml) smo inkubirali 2h sa MP (10 ng/ml) pred aktivaciju sa ConA (2,5 μ g/ml) u trajanju od 40 min. Nakon toga smo ispitivali unutraćelijski nivo fosforilisanih ERK, p38 i JNK cELISA metodom. Rezultati cELISA testa su predstavljeni kao % inhibicije u odnosu na kontrolnu grupu bez MP iz 3 nezavisna eksperimenta* $p < 0,05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na kontrolnu kulturu u kojima nije dodat MP.

4.5. Ispitivanje efekata *in vivo* primenjenog MP na kliničko ispoljavanje EAE-a, ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 i T-bet i Ror γ T transkripcionog faktora

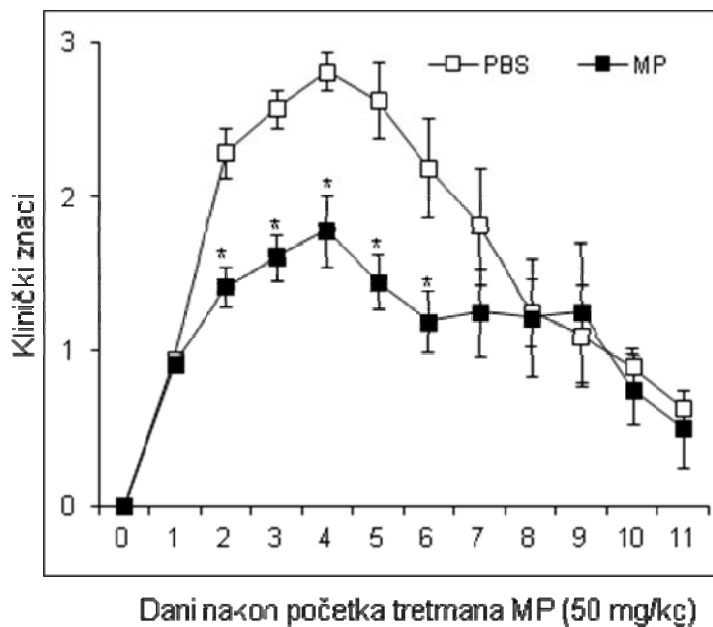
Pošto su dosadašnji rezultati pokazali nedvosmisleni inhibiciju ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17 u *in vitro* uslovima kako od strane ČLČ, DLČ neimunizovanih tako i od strane MNČKM imunizovanih DA pacova, naš sledeći korak je bio da ispitamo uticaj MP u *in vivo* uslovima.

4.5.1 MP ublažava kliničku sliku EAE-a

Na samom početku smo ispitali uticaj MP na klinički tok EAE-a, animalnog modela multiple skleroze. Stoga su DA pacovi imunizovani homogenatom kičmene moždine (HKM) emulgovanim u CFA. U eksperimentima je korišćen homogenat dobijen iz kičmenih moždina AO ili DA pacova.

Počevši od 8. dana posle imunizacije (d.p.i.) koji je na grafiku označen kao dan 1, kod većine DA pacova došlo je do razvoja EAE-a sa izraženom kliničkom slikom koja se manifestovala atonijom repa, parezom ili paralizom zadnjih ekstremiteta. Nakon pojave prvih kliničkih znakova u vidu atonije repa aplikovali smo intraperitonealno MP (50 mg/kg telesne težine) tri naredna dana imitirajući pritom pulsnu terapiju usled egzarcerbacije RR oblika MS.

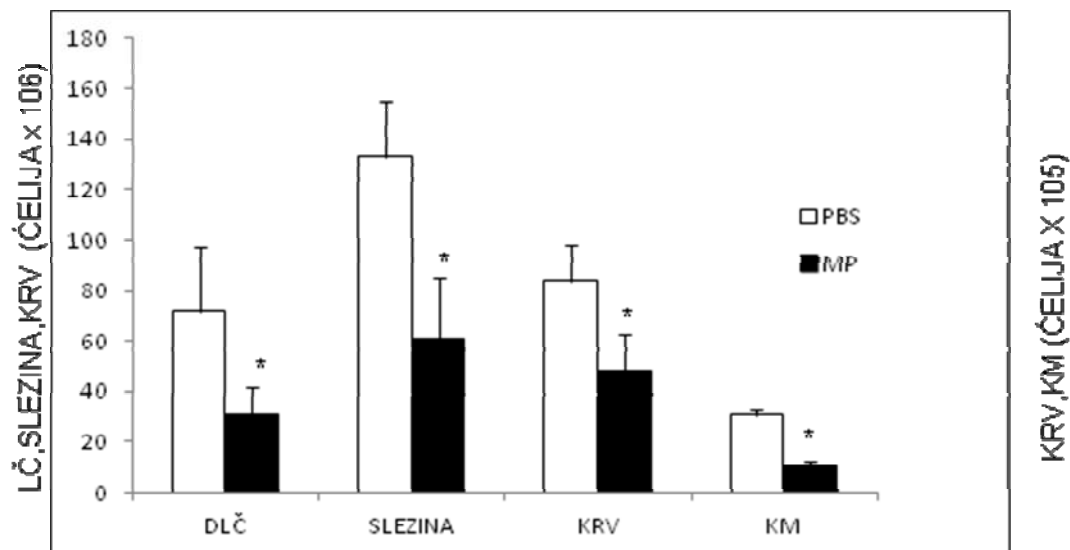
Kontrolna grupa DA pacova tretirana je PBS-om počevši od pojave prvih kliničkih znakova. Dobijeni rezultat (Prilog 17) pokazuje da je primena MP dovela do statistički značajne razlike u kliničkom ispoljavanju bolesti ove dve grupe DA pacova. Kao što se može videti, klinička manifestacija EAE-a u grupi DA pacova koji su tretirani sa MP bila je bitno blaža u poređenju sa kontrolnom grupom pacova.



Prilog 17. Uticaj MP na kliničko ispoljavanje EAE. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA i kod životinja je svakodnevno praćena pojava znakova bolesti. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferezovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Rezultati predstavljaju srednju vrednost kliničkog skora svih životinja u grupi \pm standardna devijacija (SD) koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ oznaćava statistićku znaćajnost razlike u klinićkom ispoljavanju bolesti MP tretirane grupe pacova u odnosu na kontrolnu grupu pacova).

4.5.2 MP smanjuje brojnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora, slezine periferne krvi i kičmene moždine

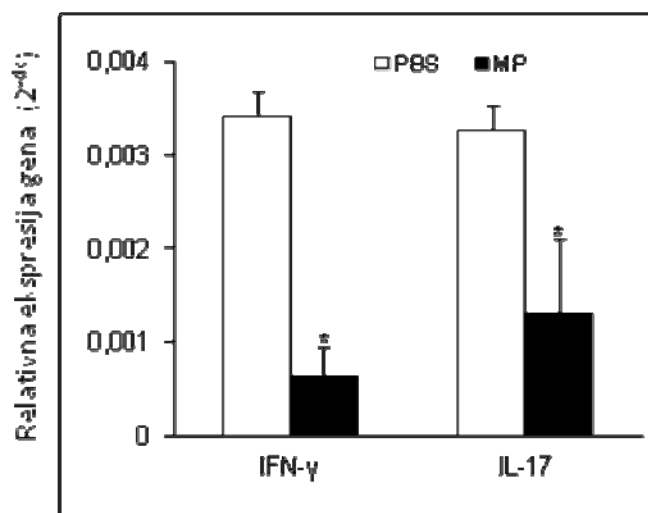
Sledeće što se nametnulo kao cilj je ispitivanje da li je, predhodno pokazana, blaža klinička slika u grupi životinja kojoj je aplikovan MP praćena i smanjenjem brojnosti ćelija unutar organa za koje se zna da imaju važnu ulogu u imunopatogenezi EAE-a. Dalje, znajući da postoje i kontradiktorni podaci koji se odnose da mesto delovanja MP bilo je zanimljivo ispitati da li postoji različiti stepen smanjenja brojnosti ćelija među organima koji se smatraju “periferijom” i KM. Sudeći po dobijenom rezultatu (Prilog 18) nakon trodnevnog *in vivo* tretmana blaža klinička slika u grupi pacova koji su tretirani MP bila je praćena i statistički značajnim smanjenjem broja ćelija kako na nivou DLČ, slezine, periferne krvi tako i na nivou KM. Ovakav podatak nas navodi na zaključak da je MP svoje povoljno dejstvo na kliničku sliku ostvario smanjenjem brojnosti potencijalno patogenih ćelija unutar pomenutih organa. Ovaj podatak ukazuje da MP u EAE-u svoje povoljno dejstvo ostvaruje kako “periferiji” tako i unutar samog CNS-a.



Prilog 18 Broj ćelija DLČ, slezine, periferne krvi i KM imunizovanih DA pacova sa HKM i CFA nakon trodnevnog MP tretmana. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i određen je broj ćelija u DLČ, slezini, 300 μ l krvi i KM. Rezultati predstavljaju srednju vrednost broja ćelija po organu u grupi \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike u brojnosti između MP tretirane grupe pacova u odnosu na kontrolnu grupu pacova).

4.5.3 Uticaj trodnevne *in vivo* aplikacije MP na ekspresiju gena za IFN- γ i IL-17 u ćelijama kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a

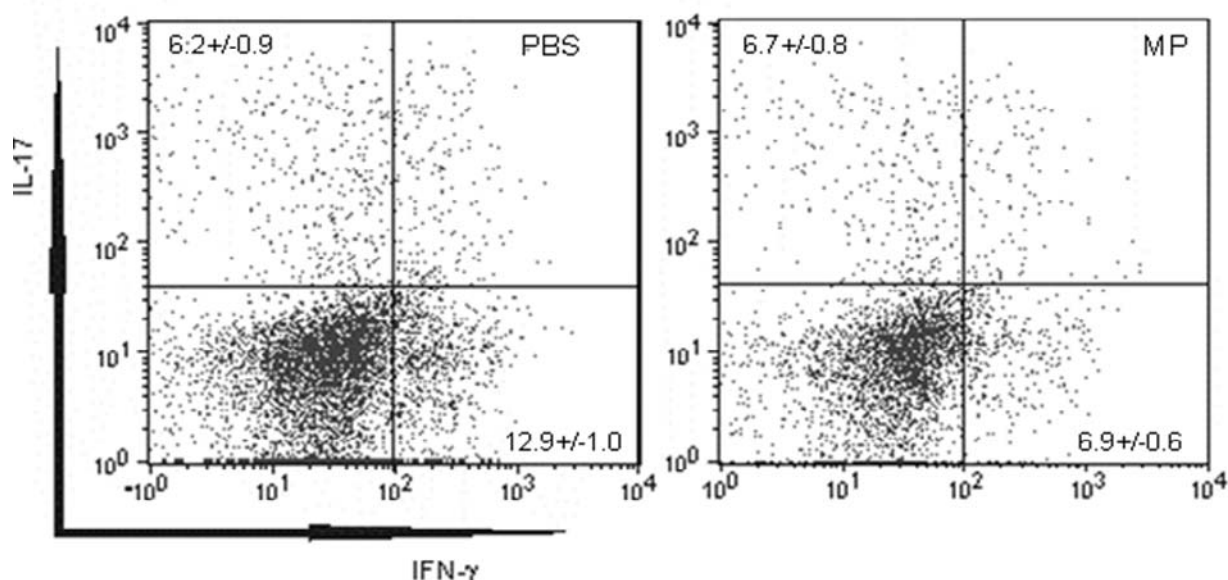
Kako smo pokazali da MP inhibira sam klinički tok EAE-a i smanjuje brojnost ćelija unutar KM, dalje smo želeli da ispitamo da li je ovaj povoljan efekat uslovljen i inhibicijom ekspresije gena za IFN- γ i IL-17. Tri sata nakon poslednje aplikacije MP izolovali smo MNČKM MP-tretiranih i kontrolnih pacova. Iz njih je izolovana RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za IFN- γ i IL-17. Sudeći po dobijenom rezultatu, trodnevni tretman sa MP doveo je do statistički značajne inhibicije ekspresije gena za IFN- γ i IL-17. To ukazuje da povoljno dejstvo MP na kliničko ispoljavanje bolesti može biti posledica ne samo smanjenja broja ćelija u ciljnom tkivu već i inhibicije ekspresije ova dva citokina koji imaju dominantnu ulogu u imunopatogenezi MS i EAE-a. Uporedivši stepen inhibicije ekspresije gena oba citokina zapazili smo da je isti trend koji je bio prisutan i u *in vitro* uslovima. Dakle, ekspresija gena u oba slučaja bila je inhibirana ali ona je, opet, bila nešto izraženija u slučaju IFN- γ u poređenju sa IL-17.



Prilog 19. MP inhibira ex vivo ekspresiju IFN- γ i IL-17 od strane MNCKM posle trodnevnog MP tretmana imunizovanih DA pacova. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Posle izdvajanja MNCKM izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za IFN- γ i IL-17. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta C_t}$) MNCKM DA pacova \pm SD koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije IFN- γ i IL-17 između MP tretirane i PBS tretirane grupe pacova).

4.5.4 Uticaj *in vivo* aplikacije MP na ćelije izolovane iz kičmene moždine koje eksprimiraju unutraćelijski IFN- γ i IL-17

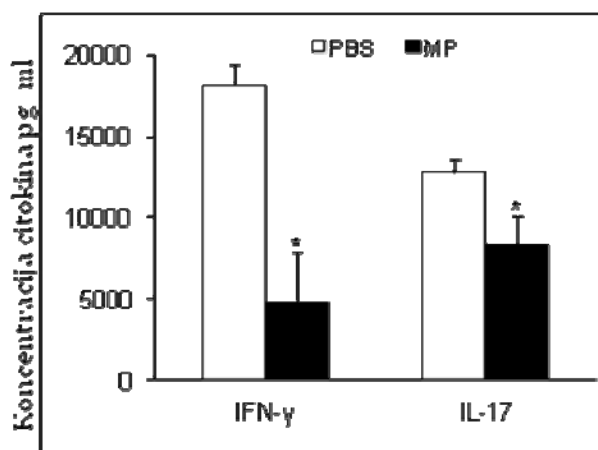
Uporedo sa analizom dejstva MP primenjenog u *in vivo* uslovima na ekspresiju gena za IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM, ispitivano je dejstvo MP na zastupljenost MNČKM koje proizvode ova dva citokina. Tako smo koristeći isti eksperimentalni dizajn koji je prikazan uz prethodni prilog, nakon izolacije MNČKM i njihove stimulacije (PMA+ION) odredili procenat ćelija koje su proizvele IFN- γ i IL-17. Dobijeni rezultati ukazuju (Prilog 20) da je MP značajno inhibirao procenat ćelija koje eksprimiraju unutraćelijski IFN- γ (sa 12.9% na 6.9 %), što odgovara predhodnom nalazu koji se tiče inhibicije ekspresije gena za IFN- γ . Međutim, ako analiziramo dejstvo MP na procenat ćelija sa unutraćelijskim IL-17 vidimo da je čak i nešto povišen (sa 6.2% na 6.7%).



Prilog 20. Uticaj *in vivo* primenjenog MP na procentualno učešće MNČKM koje proizvode IFN- γ i IL-17. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferezovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Nakon izolacije MNČKM su stimulirane kombinacijom PMA (200 ng/ml) +jonomicin (400 ng/ml) i inkubirane 5h nakon čega su fiksirane. Poslednjih 4h inkubacije ćelije MNČKM su tretirane brefeldinom (5 μ M). Nakon toga određivano je procentualno učešće IFN- γ +IL-17+ populacije korišćenjem specifičnih antitela obeleženih fluorohromima metodom protočne citofluorimetrije. Grafikon br. 20 predstavlja reprezentativni prikaz jednog od 4 nezavisna eksperimenta, a brojevi predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti ćelija sa određenim citokinom \pm SD iz 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.5.5 Uticaj *in vivo* aplikacije MP na spontanu produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ćelija izolovane iz kičmene moždine

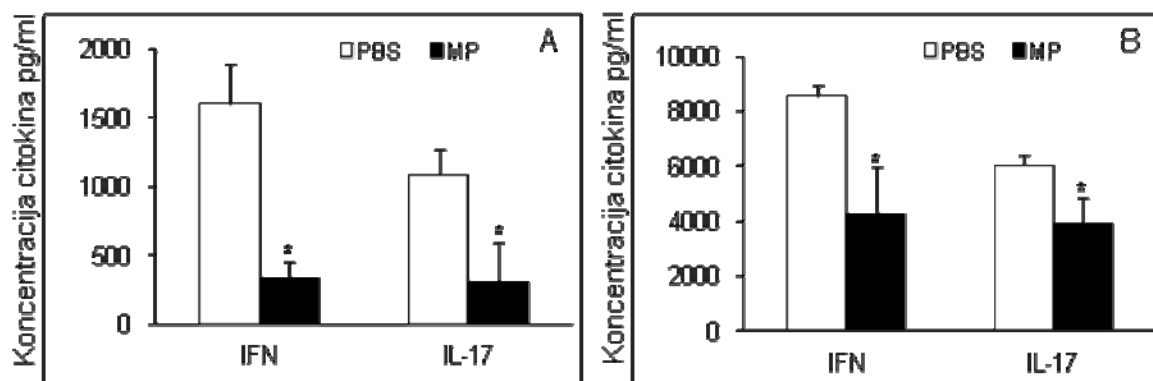
Kako smo do sada pokazali da MP nakon trodnevne aplikacije inhibira ekspresiju gena za IFN- γ i IL-17 u MNČKM i procentualnu zastupljenost ćelija koje proizvode IFN- γ ali ne i IL-17, dalje smo ispitali da li i u kom stepenu MP primenjen pod indentičnim uslovima inhibira spontanu *in vivo* produkciju oba citokina od strane ćelija izolovanih iz KM. Dobijeni nalaz (Prilog 21) pokazuje da je MP statistički značajno inhibirao produkciju oba citokina, ali i ovoga puta inhibicija produkcije IL-17 je bila slabije izražena.



Prilog 21. Uticaj *in vivo* primenjenog MP na spontanu produkciju IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM DA pacova obolelih od EAE. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS) MNČKM ($0,25 \times 10^6/200\mu\text{l}$) imunizovanih DA pacova žrtvovanih tri sata posle poslednje MP aplikacije su kultivisane u medijumu, a nakon 72 h inkubacije određena je koncentracija IFN- γ i IL-17 u supernatantima kultura ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ koncentracija citokina (pg/ml) iz 3 urađena nezavisna eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike spontane produkcije IFN- γ i IL-17 između MP i PBS grupe pacova).

4.5.6 Uticaj *in vivo* aplikacije MP na spontanu i Con A-stimulisanu produkciju IFN- γ i IL-17 iz ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova obolelih od EAE-a

S obzirom na važnu ulogu ćelija DLČ u pokretanju imunskog odgovora na encefalitogen i indukciji EAE-a bilo je bitno ispitati uticaj MP na kapacitet ovih ćelija da produkuju IFN- γ i IL-17. Sa druge strane, uzimajući u obzir uočenu smanjenu brojnost ćelija DLČ imunizovanih DA pacova nakon trodnevne MP aplikacije, postavlja se pitanje da li je ona praćena i smanjenim kapacitetom ćelija DLČ da kako spontano, tako i posle ConA stimulacije, produkuju IFN- γ i IL-17. Dobijeni rezultati (Prilog 22) nam ukazuju da je MP primenjen *in vivo* statistički značajno inhibirao spontanu produkciju IFN- γ . (Prilog 22A) U slučaju ConA stimulacije (Prilog 22B) sama produkcija ovog citokina je očekivano, bila veća, a inhibicija produkcije i u ovom slučaju bila statistički značajna. Ako pogledamo spontanu produkciju IL-17 (Prilog 22A) od strane DLČ ona je bila nešto manja u odnosu na spontanu produkciju IFN- γ (Prilog 22A), a inhibicija produkcije statistički značajna. Sama produkcija IL-17 bila je, očekivano, veća u uslovima ConA stimulacije (Prilog 22B), ali inhibicija produkcije nije bila tako izražena kao u slučaju spontane produkcije. Na osnovu svega iznetog, možemo zaključiti da MP primenjen u *in vivo* uslovima inhibira spontanu produkciju oba citokina od strane MNČKM kao i njihovu spontanu i stimulisanu produkciju od strane ćelija DLČ.



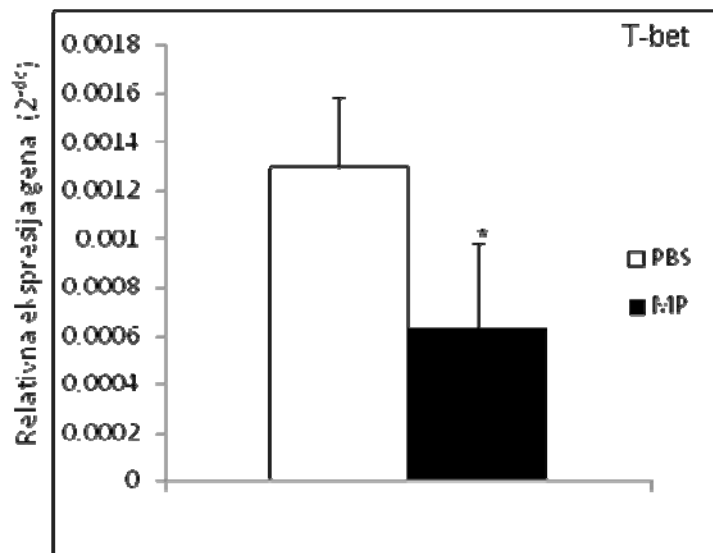
Prilog 22. Uticaj MP na spontanu i ConA stimulisanu produkciju IFN- γ i IL-17 od strane DLČ posle trodnevnog tretmana DA pacova obolelih od EAE-a. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Čelije DLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) DA pacova žrtvovanih tri sata posle poslednje MP aplikacije su kultivisane u prisustvu ConA (2.5 μ g/ml) ili samo u medijumu. Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD koncentracija citokina (pg/ml) iz 3 urađena nezavisna eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike spontane i stimulisane produkcije IFN- γ i IL-17 između MP i PBS grupe pacova).

4.6 Uticaj *in vivo* aplikacije MP na ekspresiju transkripcionih faktora koji definišu Th1 i Th17 diferencijaciju

Obzirom da su rezultati do sada pokazali da MP inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i ne tako izraženu i ekspresiju i produkciju IL-17 nametnulo se pitanje da li MP na različite načine deluje na transkripcione faktore koji su bitni za polarizaciju naivnih CD4⁺ T limfocita kao što su T-bet (za Th1 diferencijaciju) i Ror γ T (za Th17 diferencijaciju).

4.6.1 *In vivo* primenjen MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora T-bet u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a

T-bet predstavlja glavni regulatorni faktor Th1 diferencijacije koji indukuje ekspresiju gena za IFN- γ . Imajući u vidu prethodne rezultate bilo je interesantno ispitati da li i u kom stepenu MP primenjen *in vivo* utiče na nivo ekspresije ovog, za Th1 diferencijaciju važnog, transkripcionog faktora. Takođe, postavilo se pitanje da li je inhibicija ekspresije i produkcije IFN- γ od strane MNČKM imunizovanih DA pacova praćena inhibicijom transkripcionog faktora T-bet. Stoga je određena ekspresija gena za ovaj transkripcioni faktor u ćelijama izolovanim iz KM trodnevnog tretmana MP-om pomoću PCR metode. Iz dobijenog rezultata (Prilog 23) MP primenjen u *in vivo* uslovima svoj inhibitorni efekat na ekspresiju i produkciju IFN- γ ostvaruje inhibicijom transkripcionog faktora T-bet. Dakle, jasno je da se radi o izraženoj inhibiciji ekspresije ovog transkripcionog faktora što u potpunosti korelira sa izraženom inhibicijom i ekspresije i produkcije IFN- γ kao od strane DLČ tako i od strane MNČKM imunizovanih DA pacova.

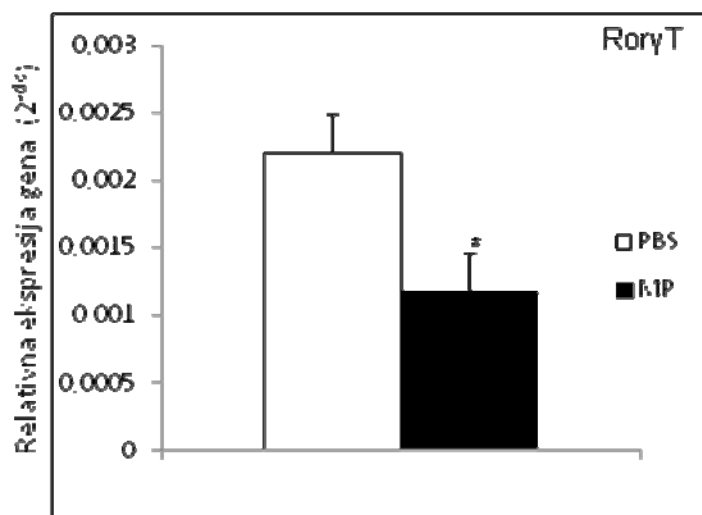


Prilog.23. In vivo tretman MP-om inhibira ekspresiju transkripcionog faktora T-bet od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a

DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Odmah nakon izolacije MNČKM iz obe grupe pacova izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za transkripcioni faktor T-bet. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta C_t}$) \pm SD koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije T-bet između MP tretirane i PBS tretirane grupe pacova).

4.6.2 *In vivo* primenjen MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ -T u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a

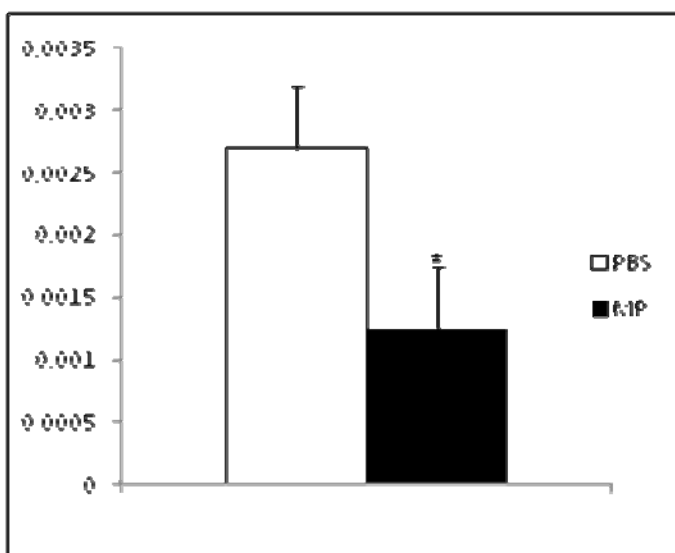
Kako smo prethodno pokazali inhibitorno dejstvo MP na ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ T od strane ČLĆ neimunizovanih DA pacova u *in vitro* uslovima i kako takav sistem ima izvesna ograničenja, naš sledeći cilj je bio određivanje dejstva MP na ekspresiju ovog transkripcionog faktora u *in vivo* uslovima od strane MNĆKM imunizovanih DA pacova. Rezultati dobijeni postupkom koji je prethodno opisan uz analizu uticaja MP na ekspresiju transkripcionog faktora T-bet i prikazani na Prilogu br. 24 pokazuju da MP i u *in vivo* uslovima inhibira ekspresiju ovog važnog transkripcionog faktora. Međutim, ako dobijene rezultate protumačimo u svetlu različite osetljivosti IFN- γ i IL-17 na dejstvo MP i ako opet uporedimo stepen inhibicije ekspresije transkripcionih faktora važnih za IFN- γ , odnosno za IL-17, jasno je i da u ovom slučaju postoje izvesne razlike. Tako, inhibicija ekspresije transkripcionog faktora T-bet je nešto izraženija u odnosu na inhibiciju ekspresije transkripcionog faktora Ror γ T. Ovaj podatak nam, bar delimično, može objasniti manju osetljivost IL-17 na dejstvo MP u poređenju sa delovanjem na IFN- γ .



Prilog24. In vivo tretman MP-om inhibira ekspresiju transkripcionog faktora RorγT od strane MNČKM. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Odmah nakon izolacije MNČKM iz obe grupe pacova izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za transkripcioni faktor RorγT. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta C_t}$) \pm SD koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije RorγT između MP tretirane i PBS tretirane grupe pacova).

4.6.3 Uticaj *in vivo* primenjenog MP na nivo ekspresije gena za IL-23R u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova koji su oboleli od EAE-a

Pokazano je za da je za puni patogeni potencijal diferentovanih Th17 ćelija ključno prisustvo IL-23 (McGeachy i sar., 2007), pri čemu se smatra da kod Th17 ćelija koje su ekspimirale IL-23R, IL-23 dovodi do povećane produkcije IL-17 i da je važan za ekspanziju i preživljavanje ovih ćelija i stabilizaciju njihovog fenotipa (McGeachy i Cua, 2008). Stoga smo u sledećim eksperimentima ispitali i uticaj MP na ekspresiju gena za IL-23R u ćelijama izolovanim iz kičmenih moždina obolelih pacova posle trodnevnog tretmana MP-om. MP je doveo do statistički značajne inhibicije ekspresije IL-23R (Prilog25) što predstavlja još jedan mehanizam dejstva ovog leka na Th17 ćelijsku subpopulaciju i njen glavni citokin IL-17.



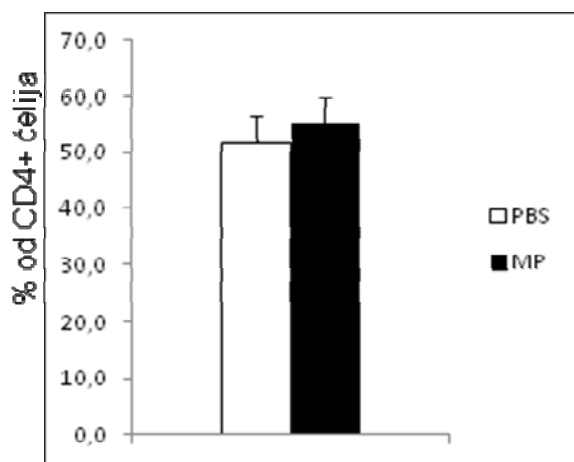
Prilog 25. *In vivo* tretman MP-om inhibira ekspresiju IL23R od strane MNČKM. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Odmah nakon izolacije MNČKM iz obe grupe pacova izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za IL-23R. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta Ct}$) \pm SD koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike ekspresije IL-23R između MP tretirane i PBS tretirane grupe pacova).

4.7 Uticaj *in vivo* primenjenog MP na sastav ćelijskog infiltrata kičmene moždine tokom EAE-a

Među brojnim mehanizmima kojima GK ostvaruju svoja antiinflamatorna i imunosupresivna dejstva u inflamaciji CNS je i uticaj na sam ćelijski infiltrat unutar ciljnog tkiva (Reichardt i sar.,2006). Tako, naš sledeći cilj je bio da ispitamo dejstvo *in vivo* primenjenog MP na fenotip ćelija koje infiltrišu CNS tokom EAE-a.

4.7.1. Uticaj *in vivo* primenjenog MP na procentualno učešće CD4⁺ ćelija unutar kičmene moždine tokom EAE-a

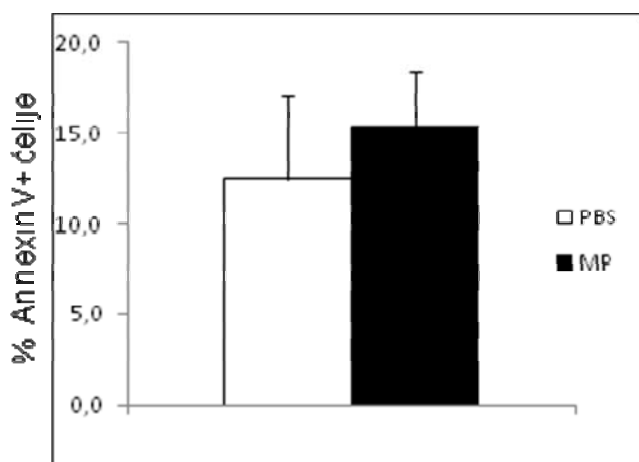
Pošto su prethodni rezultati pokazali da MP smanjuje ekspresiju i produkciju glavnih patogenih citokina IFN- γ i IL-17, nezavisno od smanjena broja svih ćelija koje infiltruju tkivo CNS tokom EAE, koje je takođe posledica ovog tretmana, cilj sledećih eksperimenata bio je da ispitamo da li je efekat na ove citokine posledica smanjenog broja CD4⁺ limfocita koje su njihovi glavni ćelijski izvor. Zato smo primenom imunofluorescentne tehnike pomoću fluorohromom obeleženog anti CD4 antitela ispitali zastupljenost CD4⁺ ćelija u populaciji mononuklearnih ćelija izolovanih iz KM pacova žrtvovanih tri sata posle poslednjeg ubrizgavanja MP, kao što je prethodno opisano i uporedili je sa brojem dobijenim kod kontrolnih pacova. Kao što je prikazano u Prilogu br. 26, *in vivo* tretman metilprednizolonom primenjen u našem eksperimentalnom modelu ne smanjuje procentualno učešće CD4⁺ ćelija u populaciji ćelija koje su infiltrovale tkivo CNS tokom EAE.



Prilog26. Uticaj in vivo primenjenog MP na procentualno učešće CD4⁺ ćelija izolovanih iz KM DA pacova obolelih od EAE-a DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Nakon izolacije MNČKM određivano je prisustvo CD4⁺ i površinskih markera korišćenjem anti CD4 antitela obeleženih fluorohromom pomoću protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti CD4⁺ ćelija ± SD iz 4 nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.7.2 Uticaj *in vivo* primenjenog MP na apoptozu CD4⁺ limfocita kičmene moždine tokom EAE-a

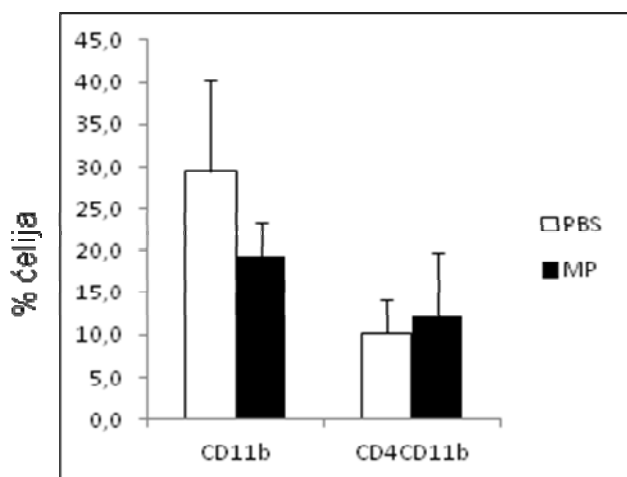
Do sada smo pokazali da MP primenjen u *in vivo* uslovima ublažava kliničku sliku u grupi pacova kojima je aplikovan MP tokom tri dana u odnosu na kontrolnu grupu. Blaža klinička slika je praćena i smanjenjem broja ćelija unutar KM tretirane grupe pacova u poređenju sa grupom tretiranom PBS-om. Dalje, pokazali smo da *in vivo* tretman obolelih pacova smanjuje ekspresiju i produkciju dva glavna medijatora autoimunosti CNS-a, IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu PBS-om. Imajući u vidu ove rezultate, postavilo se pitanje da li MP u *in vivo* uslovima pomenuta dejstva ostvaruje putem apoptoze CD4⁺ T limfocita, glavnih producenata i IFN- γ i IL-17. Tako, nakon Annexin V i Propidijum jodid bojenja odredili smo procenat apoptoze unutar CD4⁺ ćelija. Međutim, u uslovima primenjenim u našem modelu *in vivo* tretman metilprednizolonom nije doveo do povećane apoptoze CD4⁺ T limfocita (Prilog 27). Uzimajući u obzir ovaj rezultat možemo zaključiti da svi pokazani rezultati koji se tiču inhibicije i ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17 nisu posledica apoptoze CD4⁺ ćelija.



Prilog 27. *In vivo* primenjeni MP ne utiče apoptozu CD4⁺ ćelija poreklom iz KM DA pacova obolelih od EAE-a DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferezovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvadene su kičmene moždine. Procenat Aneksin V + ćelija u populaciji CD4⁺ ćelija u izolovanim MNCKM odredjen je korišćenjem specifičnih antitela obeleženih fluorohromima pomoću protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti ćelija sa određenim markerom \pm SD. Prikazani su sumirani rezultati iz 4 uradena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.7.3. Uticaj *in vivo* primenjenog Metilprednizolona na procentualno učešće CD11b⁺ i CD4⁺ CD11b⁺ ćelija unutar kičmene moždine tokom EAE-a

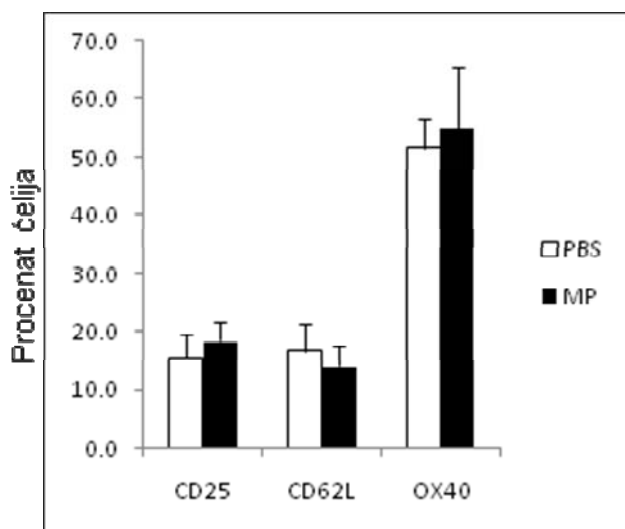
U cilju što boljeg razumevanja mehanizma delovanja MP u EAE-u sledeći korak je ispitivanje uticaja MP na druge potencijalne efektorske ćelije koje infiltriraju KM. Stoga je ispitana je procentualna zastupljenost ćelija makrofagno/monocitne loze (CD11b⁺, CD4⁺CD11b⁺). Primenili smo prethodno opisan postupak dobijanja mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine pacova tretiranih MP-om ili PBS-om i vezivanjem antitela specifičnih za CD11b i CD4, obeleženih različitim fluorohromima odredili procentualnu zastupljenost mikroglije i iako dobijeni rezultati (Prilog 28) pokazuju izvesno smanjenje procenta CD11b⁺ ćelija u populaciji MNČKM MP-tretiranih pacova u odnosu na kontrolu, ta razlika nije statistički značajna. Sa druge strane, procentualno učešće CD4⁺CD11b⁺ ćelija se bitno ne menja pod uticajem *in vivo* datog MP što nam ukazuje da i ćelije ovog fenotipa koje infiltriraju KM nisu meta delovanja ovog glukokortikoida.



Prilog 28. Uticaj *in vivo* primenjenog MP na procentualno učešće CD11b⁺ i CD4⁺CD11b⁺ ćelija poreklom iz KM DA pacova obolelih od EAE-a. DA pacovi su imunizovani ubrizgavanjem emulzije HKM i CFA. MP je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti u dozi od 50 mg/kg telesne težine. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Pacovi su žrtvovani tri sata nakon poslednjeg ubrizgavanja MP i posle perfuzije izvađene su kičmene moždine. Nakon izolacije MNČKM određivano je procenat ćelija koje ekspimiraju CD4 i CD11b molekule korišćenjem specifičnih antitela obeleženih fluorohromima pomoću protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti ćelija sa određenim markerom ± SD iz 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.7.4 Uticaj *in vivo* primenjenog MP na procentualno učešće aktivisanih i naivnih ćelija unutar CD4⁺ populacije tokom EAE-a

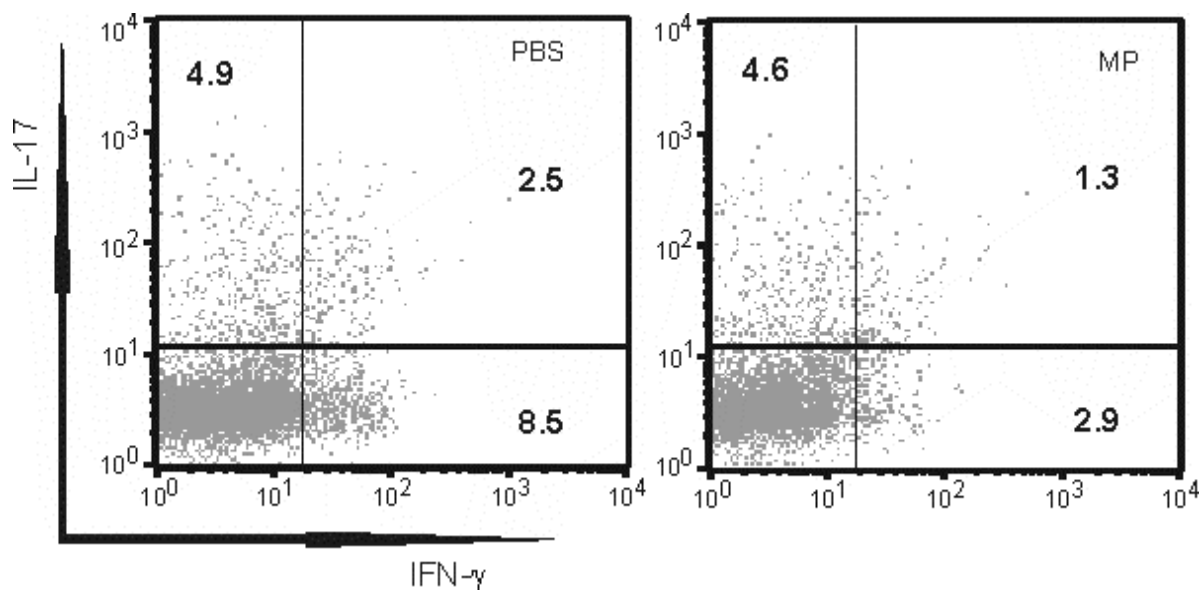
Kako smo pokazali da MP ne utiče na procentualnu zastupljenost CD4⁺ ćelija unutar KM sledeći cilj je bio da ispitamo da li MP menja procentualno učešće naivnih i aktiviranih CD4⁺ T limfocita. Stoga je izvršena fenotipska karakterizacija CD4⁺ T limfocita korišćenjem antitela specifičnih za pojedine površinske markere obeleženih fluorohromima. Metodom protočne citofluorimetrije ispitana je procentualna zastupljenost i to kako naivnih (CD62L⁺) tako i aktiviranih (CD25⁺ OX40⁺) T limfocita unutar CD4⁺ populacije MNČKM DA pacova. Sudeći po dobijenom rezultatu MP primnjen u *in vivo* uslovima diskretno smanjuje procentualnu zastupljenost naivnih, dakle CD62L⁺ T limfocita, što nije statistički značajno. Sa druge strane dejstvo MP u pomenutom eksperimentalnom sistemu diskretno povećava procentualnu zastupljenost aktivisanih T limfocita (CD25⁺ OX40⁺) što takođe nije statistički značajno.



Prilog29. Uticaj *in vivo* primenjenog MP na procentualno učešće CD25⁺, CD62L⁺ i OX40⁺ ćelija unutar CD4⁺ populacije poreklom iz KM DA pacova obolelih od EAE-a DA pacovi su imunizovani u zadnju šapicu sa HKM emulgovanim u CFA. Životinje su svakodnevno praćene i nakon pojave prvih kliničkih znakova u vidu atonije repa aplikovan je MP (50 mg/kg) tokom tri uzastopna dana. Nakon izolacije MNČKM određivano je prisustvo CD25⁺, CD62L⁺ i OX40⁺ ćelija unutar CD4⁺ populacije korišćenjem specifičnih antitela obeleženih fluorohromima metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti ćelija sa određenim markerom ± SD. Prikazani su sumirani rezultati iz 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.7.5 Uticaj *in vivo* primenjenog MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane CD4⁺ limfocita tokom EAE-a

Jedan od prethodnih rezultata je pokazao da MP u *in vivo* uslovima ne utiče na apoptozu CD4⁺ ćelija niti smanjuje procentualno učešće CD4⁺ ćelija unutar MNČKM. Međutim, u ćelijskom infiltratu KM mogu se naći ćelije različitog fenotipa koje takođe mogu proizvoditi oba citokina pa smo dalje analizirali da li je prethodno opisano smanjenje ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17, rezultat smanjene produkcije od strane CD4⁺ T limfocita. Ovo je bilo moguće primenom tehnike imunofluorescentnog unutarćelijskog obeležavanja IFN- γ i IL-17 uz istovremeno detektovanje CD4⁺ ćelija pomoću specifičnog antitela. Posle izolovanja ćelijskog infiltrata iz KM obolelih životinja tretiranih sa MP *in vivo* na prethodno opisan način, ćelije su kratkotrajno aktivisane kombinacijom PMA i jonomicina, pa potom inkubirane sa obeleženim antitelima. Rezultati (prilog 30) pokazuju smanjenje broja CD4⁺ ćelija koje proizvode IFN- γ kod životinja tretiranih sa MP u odnosu na kontrole (sa 8.5% na 2.9) dok je u slučaju IL-17 ono vrlo diskretno, gotovo odsutno (sa 4.9% na 4.6%).



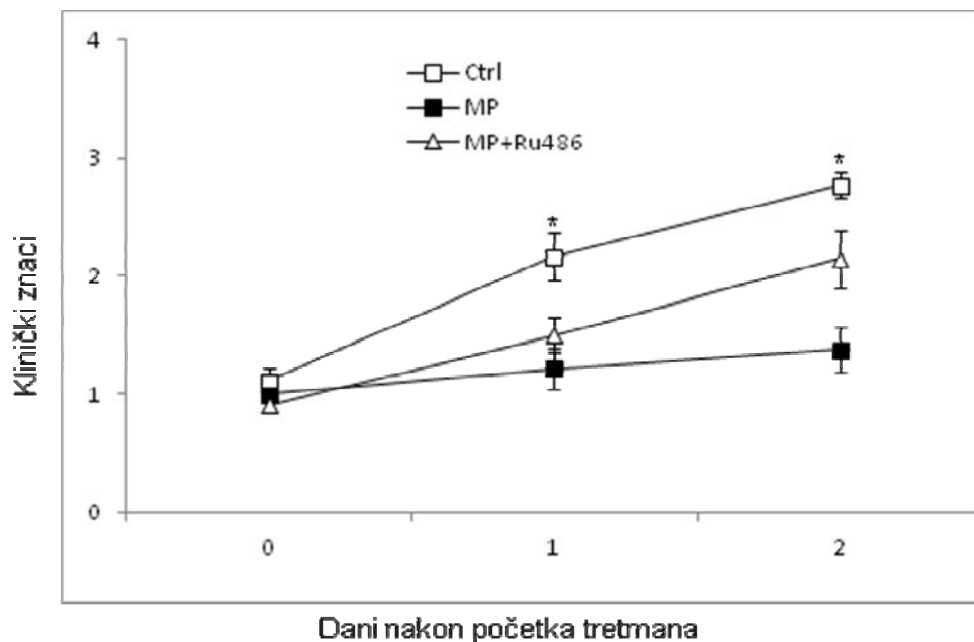
Prilog 30. Uticaj in vivo primenjenog MP na procentualno učešće IFN- γ i IL-17 među CD4+ ćelijama koje infiltriraju KM tokom EAE. DA pacovi su imunizovani u zadnju šapicu sa HKM emulgovanim u CFA. Životinje su svakodnevno praćene i nakon pojave prvih kliničkih znakova u vidu atonije repa aplikovan je MP (50 mg/kg) tokom tri uzastopna dana. Nakon izolacije MNČKM su stimulisane kombinacijom PMA+jonomicin i inkubirane 5h nakon čega su fiksirane. Poslednjih 4h inkubacije ćelije MNČKM su tretirane brefeldinom. Nakon toga određivano je prisustvo CD4+ćelija koje proizvode IFN- γ i IL-17 korišćenjem specifičnih antitela za površinsko (anti CD4) i unutarćelijsko obeležavanje (anti IFN- γ i anti IL-17) metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost procentualne zastupljenosti ćelija sa određenim markerom \pm SD. Prikazani su sumirani rezultati iz 4 urađena eksperimenta sa sličnim rezultatima.

4.8 Mehanizam dejstva MP primenjenog u *in vivo* uslovima tokom EAE-a

Do sada je pokazano da MP u *in vivo* uslovima inhibira i ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 kako od strane DLČ tako i od strane MNČKM DA pacova obolelih od EAE-a. Dalje je bilo interesantno ispitati da li su ovi pomenuti efekti ostvareni putem klasičnog mehanizma tj. vezivanjem za citoplazmatski receptor za glukokortikoide (GR).

4.8.1 Uticaj *in vivo* primenjenog antagonista GR Mifepristona (RU486) na kliničku sliku EAE-a

Pokazano je da MP primenjen tokom tri uzastopna dana ublažava kliničko ispoljavanje EAE-a. Kako se zna da GK svoja dejstva mogu ostvariti vezivajući se za svoj citoplazmatski recetor ili mimo njega nametnulo se pitanje na koji način je MP ostvario svoje povoljno dejstvo na kliničko ispoljavanje EAE-a. Tako smo nakon imunizacije DA pacova po uobičajenom imunizacionom protokolu i nakon pojave prvih kliničkih znakova (na grafikonu obeleženo kao nulti dan) aplikovali MP u jednoj grupi, u drugoj MP zajedno sa antagonistom GR – Mifepristonom (RU 486) dok je treća grupa bila kontrolna i tretirali smo je sa PBS-om. Nakon određivanje stepena težine kliničke ublažio je bolest u poređenju sa kliničkom slikom kontrolne grupe DA pacova. Međutim, eksperimentalna grupa koja pored MP istovremeno primala i antagonist GR-RU 486, nije se značajno razlikovala od kontrole, tretirane PBS-om. Ovakav rezultat nas navodi na zaključak da je svoja povoljna dejstva na klinički tok EAE-a MP ostvario vezivajući se za svoj citoplazmatski receptor.

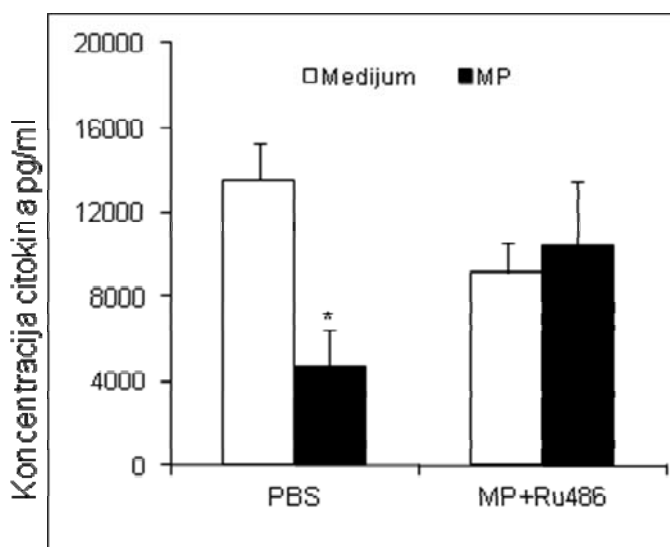


Prilog 31. Indukcija EAE-a kod DA pacova i uticaj MP i RU-486 na kliničko ispoljavanje bolesti. DA pacovi su imunizovani u zadnju šapicu sa HKM emulgovanim u CFA. Nakon pojave prvih kliničkih znakova aplikovani su MP (50 mg/kg) u jednoj grupi, MP+RU486 (25 mg/kg) u drugoj i PBS u trećoj i praćena pojava znakova bolesti. Rezultati predstavljaju srednju vrednost kliničkog skora svih životinja u grupi \pm standardna devijacija (SD) koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike u kliničkom ispoljavanju bolesti MP, MP+ RU486 tretirane grupe pacova u odnosu na kontrolnu grupu pacova).

4.8.2 Antagonist glukokortikoidnog receptora RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IFN- γ u uslovljenu dejstvom MP u *in vitro* uslovima

Na samom početku rezultata ove teze prikazan je rezultat koji se tiče inhibitornog uticaja MP na produkciju IFN- γ od strane ČLČ neimunizovanih DA pacova u *in vitro* uslovima (Prilog 5). Imajući u vidu pomenuto interesantno je ispitati da li MP u *in vitro* uslovima svoja dejstva ostvaruje putem GR ili mimo njega. Tako, nakon izolacije ČLČ neimunizovanih DA pacova i kultivacije sa MP i njegovim antagonistom RU-486 merena je produkcija IFN- γ ELISA metodom.

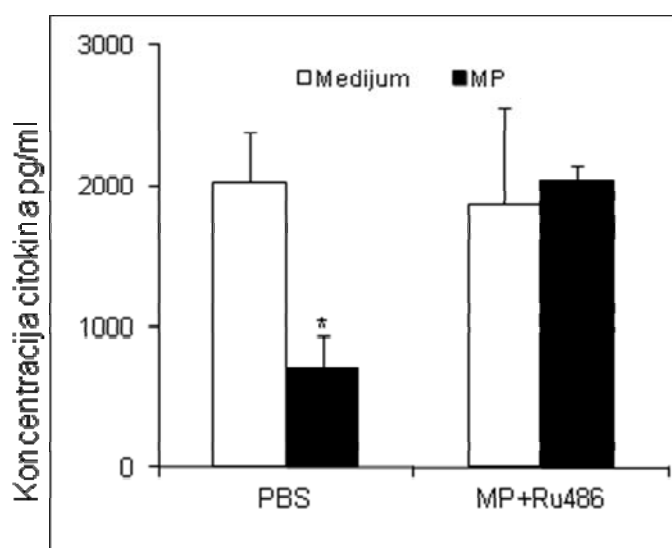
Inhibitorni efekat MP na produkciju IFN- γ izostaje kada je kultivisan u prisustvu RU-486, njegovog antagonista, (Prilog 32). Stoga je očigledno da MP svoj efekat u *in vitro* uslovima na produkciju IFN- γ od strane ČLČ neimunizovanih DA pacova ostvaruje vezivajući se za GR, a navedeni izostanak dejstva se može objasniti nedostupnošću samog GR usled prisustva RU-486, njegovog antagoniste.



Prilog 32. Antagonist glukokortikoidnog receptora RU486 sprečava inhibiciju produkcije IFN- γ uslovljenu dejstvom MP u *in vitro* uslovima. Nakon kultivacije ČLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) u prisustvu ConA ($1 \mu\text{g/ml}$) bez ili sa MP (10 ng/ml), i RU-486 (5 ng/ml) meren je nivo produkcije IFN- γ u supernatantima kultura nakon 24h korišćenjem ELISA metode. Rezultati predstavljaju srednju vrednost koncentracije citokina (pg/ml) produkovanih od strane ČLČ DA pacova \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IFN- γ između u MP i MP+Ru486 grupe).

4.8.3 Antagonist glukokortikoidnog receptora RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IL-17 u uslovljenu dejstvom MP u *in vitro* uslovima

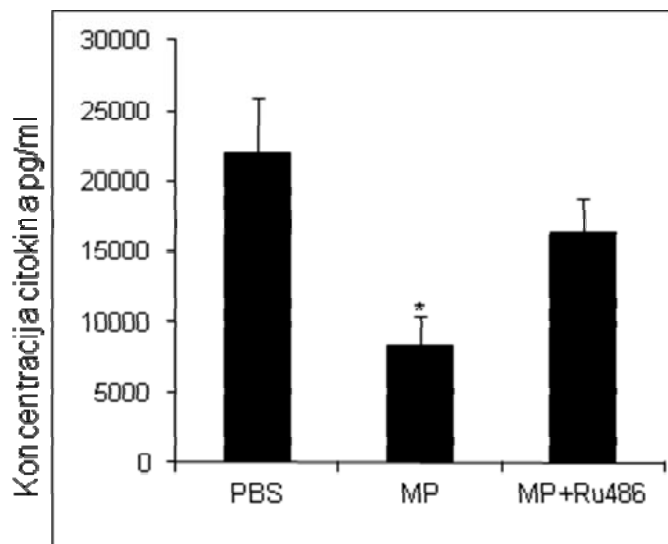
Kako je pokazano u predhodnom prilogu da u slučaju kultivacije MP sa RU-486, antagonistom GK receptora izostaje inhibicija produkcije IFN- γ sledeće je ispitano da li je i inhibicija produkcije IL-17 uslovljena vezivanjem MP za citoplazmatski receptor. Tako, koristeći isti eksperimentalni dizajn merili smo produkciju IL-17 korišćenjem ELISA metode. I kao što je očekivano, i u slučaju IL-17 prisutan je isti trend (Prilog 33). Dakle, MP sam inhibira vrlo izraženo, statistički značajno, produkciju IL-17 od strane ČLČ neimunizovanih DA pacova. Međutim, kada je MP u kombinaciji sa RU-486 izostaje inhibicija produkcije ovog citokina. Ovaj rezultat nam omogućava razumevanje dejstva GK na Th17 ćelijsku subpopulaciju i IL-17.



Prilog 33. Antagonist glukokortikoidnog receptora RU486 sprečava inhibiciju produkcije IL-17 uslovljenu dejstvom MP u *in vitro* uslovima. Nakon kultivacije ČLČ ($2,5 \times 10^6$ /ml) u prisustvu ConA (1 μ g/ml) bez ili sa MP (10 ng/ml) i RU-486 (5 ng/ml) meren je nivo produkcije IL-17 u supernatantima kultura nakon 24h korišćenjem ELISA metode. Rezultati predstavljaju srednju vrednost koncentracije citokina (pg/ml) produkovanih od strane ČLČ DA pacova \pm SD koji su dobijeni iz 4 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IL-17 između u MP i MP+RU486 grupe).

4.8.4 Uticaj *in vivo* primenjenog antagonista GR Mifepristona (RU486) na produkciju IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

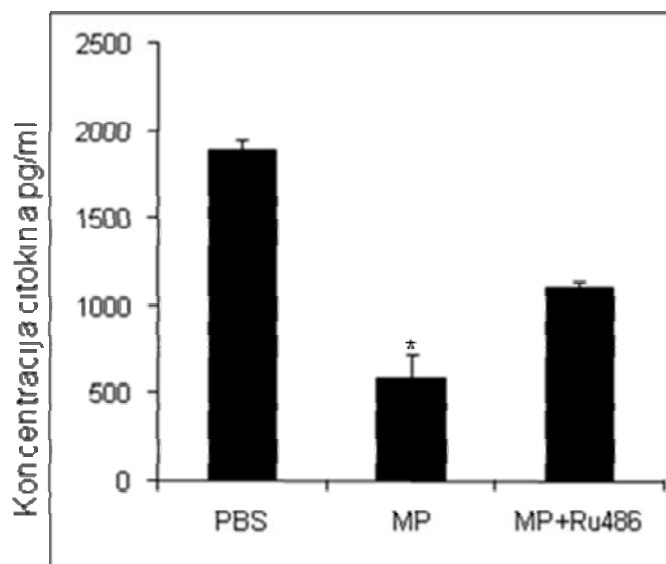
Sa jedne strane smo pokazali da izostaje povoljno dejstvo MP na kliničko ispoljavanje EAE-a u eksperimentalnoj grupi DA pacova koji su oboleli od EAE-a kojima je pored MP aplikovan i RU-486, antagonist GR. Sa druge strane, pokazano je da RU-486 blokira inhibitorno dejstvo MP na produkciju IFN- γ u *in vitro* uslovima. Imajući sve u vidu, postavilo se pitanje na koji način RU-486 sada u *in vivo* uslovima deluje na produkciju IFN- γ od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a a kojima je istovremeno aplikovan i MP i RU-486. Tako, nakon imunizacije po uobičajenom imunizacionom protokolu, pojave prvih kliničkih znakova aplikovan je MP u jednoj grupi, u drugoj MP zajedno sa antagonistom GR-RU 486 dok je treća grupa bila kontrolna i tretirana je sa PBS-om. Nakon izolacije i kultivacije MNČKM poreklom iz sve tri grupe merili smo produkciju IFN- γ ELISA metodom. Rezultat (Prilog 34) koji je dobijen je bio očekivan: statistički značajno smanjena produkcija ovog citokina od strane eksperimentalne grupe životinja kojoj je aplikovan samo MP u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Međutim, kada je MP aplikovan zajedno sa GR antagonistom RU-486 inhibicija produkcije IFN- γ je diskretna, bez statističke značajnosti u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Ovakav rezultat nas, još jednom, navodi na zaključak da MP svoje povoljno dejstvo na kliničku sliku EAE-a ostvaruje delujući preko svog GR.



Prilog 34. Uticaj in vivo aplikovanih MP i RU-486 na ex vivo produkciju IFN- γ od strane MNČKM izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a. DA pacovi su imunizovani u zadnju šapicu sa HKM emulgovanim u CFA. Nakon pojave prvih kliničkih znakova tokom tri dana aplikovani su MP (50 mg/kg) u jednoj grupi, u drugoj MP(50 mg/kg) +RU486 (25 mg/kg) i PBS u trećoj i paralelno praćena je pojava kliničkih znakova. Nakon tri dana od prve aplikacije životinje su žrtvovane. Rezultati predstavljaju srednju vrednost koncentracije citokina (pg/ml) produkovanih od strane ČLČ DA pacova \pm standardna devijacija (SD) koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IFN- γ između u MP i MP+Ru486 grupe).

4.8.5 Uticaj *in vivo* primenjenog antagoniste GR Mifepristona (RU486) na produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

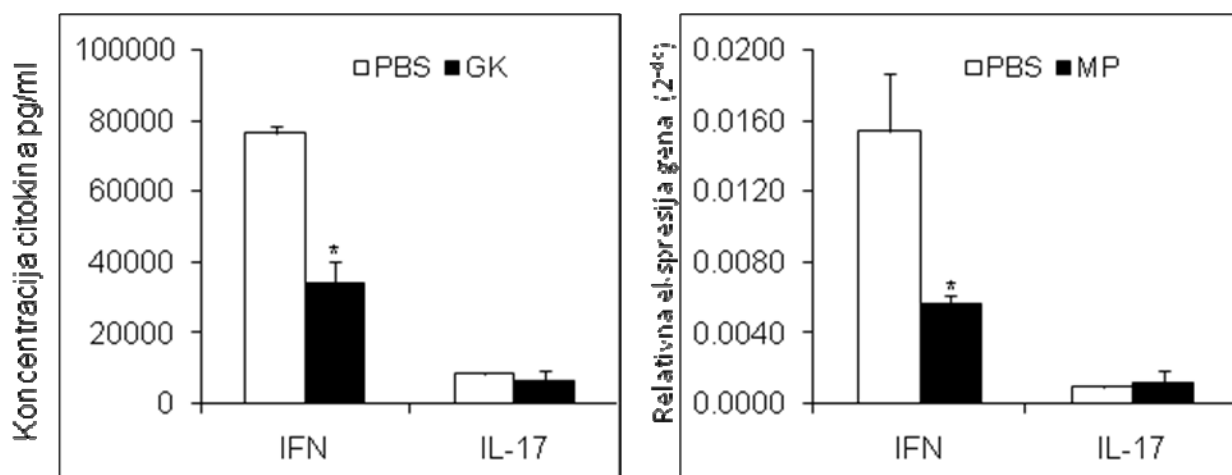
Predhodnim prilogom je pokazano da izostaje izraženo inhibitorno dejstvo MP na produkciju IFN- γ od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a a kojima je istovremeno aplikovan i MP i Ru-486 u *in vivo* uslovima. Obzirom da je pokazano da IL-17 pokazuje izvesni stepen neosetljivosti na dejstvo MP ispitano je da li MP, u *in vivo* uslovima svoje dejstvo na produkciju IL-17 ostvaruje mimo citoplazmatskog GR. Tako, koristeći isti eksperimentalni dizajn nakon izolacije i kultivacije MNČKM meriena je produkcija IL-17 ELISA metodom. Dobijeni rezultat je iovoga puta očekivan: stepen inhibicije produkcije IL-17 od strane MNČKM životinja koje su obolele od EAE-a i koje su tretirane samo sa MP statistički značajno poredivši ga sa kontrolnom grupom životinja. Međutim, inhibicija produkcije IL-17 od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a a kojima je istovremeno aplikovan i MP i RU486 je prisutna, ali nije statistički značajna, ako se uporedi sa kontrolnom grupom. Ako je uporedimo sa MP+RU-486 grupom očigledno je da je produkcija nešto veća. Sve zajedno, možemo zaključiti da i u slučaju IL-17 MP svoje dejstvo na njegovu produkciju ostvaruje putem citoplazmatskog GR.



Prilog 35. Uticaj in vivo aplikovanih MP i RU-486 na ex vivo produkciju IL-17 od strane MNČKM izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a. DA pacovi su imunizovani u zadnju šapicu sa HKM emulgovanim u CFA. Nakon pojave prvih kliničkih znakova tokom tri dana aplikovani su MP (50 mg/kg) u jednoj grupi, u drugoj MP(50 mg/kg) +RU486 (25 mg/kg) i PBS u trećoj i paralelno praćena je pojava kliničkih znakova. Nakon tri dana od prve aplikacije životinje su žrtvovane. Rezultati predstavljaju srednju vrednost kliničkog skora svih životinja u grupi ± standardna devijacija (SD) koji su dobijeni iz 3 urađena nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije IL-17 između u MP i MP+Ru486 grupe).

4.9 MP inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ ali ne i IL-17 od strane od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine NOD miševa obolelih EAE-a

Obzirom da su svi dosadašnji rezultati nedvosmisleno pokazali da MP u *in vitro* i u *in vivo* uslovima na dva različita načina inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 naredni cilj je bio da ispitamo da li je, više puta pokazan, različit stepen inhibicije ekspresije i produkcije oba citokina specifičan za vrstu. Tako, nakon imunizacije *NOD* miševa korišćen je indentičan eksperimentalni dizajn kao u slučaju *DA* pacova (trodnevna aplikacija MP nakon pojave prvih kliničkih znakova). I zaista, MP inhibira i ekspresiju i produkciju IFN- γ dok je pomenuto dejstvo MP izostaje u slučaju IL-17. Preciznije, inhibicija ekspresije gena za IL-17 izostaje što je praćeno sa diskretnom inhibicijom njegove produkcije. Dakle, zapažena diskrepanca u odgovoru na inhibitorno dejstvo MP nije specifično za vrstu i ovakav rezultat nam bar delimično ukazuje da IL-17 u različitim ekperimentalnim postavkama pokazuje izvesni stepen “rezistencije” na dejstvo MP.



Prilog 36. Uticaj in vivo primenjenog MP na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM posle trodnevnog tretmana NOD miševa obolelih od EAE-a. NOD miševi su imunizovani ubrizgavanjem MOG₃₅₋₅₅ peptida emulgovanim u CFA uz dodatak Pertusis toksina. MP (50 mg/kg telesne težine) je ubrizgavan i.p. 3 dana počevši od prve pojave kliničkih manifestacija bolesti. Kontrolna grupa je istovremeno tretirana puferizovanim fiziološkim rastvorom (PBS). Nakon izolacije MNČKM (3×10^6 /ml) izolovana je RNK i reverznom transkripcijom prevedena u cDNK, a potom je korišćenjem odgovarajućih prajmera i PCR metode izmerena relativna ekspresija iRNK za IFN- γ i IL-17. Rezultati predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije gena ($2^{-\Delta C_t}$) DA pacova za određeni termin \pm SD. Koncentracija citokina u supernatantima je određivana ELISA metodom nakon 72 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD koncentracija citokina (pg/ml) iz 2 urađena nezavisna eksperimenata sa sličnim rezultatima (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike produkcije citokina između MP i PBS grupe pacova).

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivano je dejstvo MP na ekspresiju i produkciju dva glavna medijatora autoimunosti: IFN- γ i IL-17 u *in vitro* i u *in vivo* uslovima.

IL-17 kao glavni citokin subpopulacije CD4⁺ Th17 ćelija smatra se jednim od važnih medijatora oštećenja u raznim autoimunskim oboljenjima kao što su: reumatoidni artritis, inflamatorna bolest creva i multipla skleroza (Falcone i Sarvetnick. 1999). Međutim, ranije su se sva navedena oboljenja i odgovarajući animalni modeli smatrani bolestima koji su posredovane Th1 ćelijskom populacijom (Weaver i sar., 2007; Kramer i Gaffen, 2007). Obzirom da odsustvo IFN- γ , kao i molekula koji su značajni za njegovu produkciju i to bilo usled otklanjanja njegovog gena ili usled aplikacije neutrališućih antitela, dovodi do pogoršanja kliničke slike eksperimentalnih modela autoimunskih bolesti (Kramer i Gaffen, 2007) dovela se u sumnju sama uloga IFN- γ u navedenim autoimunskim oboljenjima. Takođe, imajući sve pomenuto u vidu IL-17 je bio prepoznat kao novi medijator organ-specifičnih oboljenja kao što je MS i njen animalni model EAE (Kramer i Gaffen, 2007). Da je IL-17 važan citokin u autoimunskom odgovoru i razvoju EAE-a pokazano je i eksperimentima u kojima su korišćene životinje kojima je knock-out tehnologijom uklonjen gen bilo za sam IL-17 ili za njegov receptor (IL-17R) (Bettelli i sar.,2007). Takođe, kao posledica aplikacije neutrališućih antitela koja su specifična za IL-17 klinička slika bolesti je bila bitno blaža (Kramer i Gaffen, 2007). Prvi nalazi koji su ukazivali na značaj IL-17 u imunopatogenezi autoimunskih bolesti kod ljudi odnose se na povišen broj ćelija koje produkuju IL-17 kao i samog citokina kako u krvi tako i na samome mestu autoimunskog odgovora (Kramer i Gaffen, 2007). Takođe je pokazano da nakon primene imunomodulatorne terapije nivo cirkulišućeg IL-17 značajno opada (Kramer i Gaffen, 2007). Dalje, kod pacijenata koji boluju od MS unutar aktivnih lezija nađena je povećana ekspresija gena za IL-17 kao veći broj CD4⁺ i CD8⁺ćelija koje produkuju ovaj citokin (Tzartos i sar.,2008). Možda još značajniji dokazi o ulozi IL-17 u imunopatogenezi MS-a je i nalaz koji su prezentovali Kebir i njegovi saradnici (2007). Naime, oni su u cilju evaluacije migracione sposobnosti Th17 u odnosu na Th1 ćelijsku subpopulaciju svoje istraživanje sprovedli na *in vitro* modelu krvno-moždane barijere čiju osnovu strukturu čine endotelne ćelije kapilara mozga humanog porekla. Nakon izolacije CD4⁺ limfocita

iz periferne krvi pacijenata koji boluju od MS, njihove polarizacije ka Th1 i Th17 ćelijskim subpopulacijama (u prisustvu IL-12 i IL-23) u *in vitro* uslovima su pokazali da diferentovane Th17 ćelije značajno brže prolaze kroz krvno–moždanu barijeru nego Th1 T limfociti (Kebir i sar.,2007). Takođe, ista grupa istraživača je pokazala da kod pacijenata obolelih od MS endotelne ćelije krvno-moždane barijere unutar lezija eksprimiraju receptor za IL-17 i da IL-17 narušava tkz. tesne veze kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima (Kebir i sar.,2007). Dalje, nađeno je da diferentovani Th17 T limfociti eksprimiraju granzim B čime dovode do smrti neurona. Osim toga, kada prođu kroz krvno-moždanu barijeru posledično dovode do inflamacije unutar CNS-a (Kebir i sar.,2007). Imajući sve ove činjenice u vidu vrlo je jasna patogena uloga Th17 ćelijske subpopulacije i produkovanog IL-17 u imunopatogenezi multiple skleroze.

Danas se pouzdano zna da glukokortikoidi vrlo uspešno inhibišu i ekspresiju i produkciju IFN- γ (Ding i sar., 1989), ali mehanizam njihovog dejstva na ekspresiju i produkciju IL-17 još uvek nije razjašnjen. Tako, postoje podaci koji ukazuju da MP u *in vitro* uslovima samo delimično inhibiše produkciju IL-17 nakon PMA/IO stimulacije limfocita u populaciji zdravih ljudi (Laan i sar., 1999). Opet sa druge strane, ciklosporin A u istim eksperimentalnim uslovima u potpunosti inhibira produkciju IL-17 (Laan i sar., 1999). Uticaj GK na produkciju IL-17 u *in vivo* uslovima ispitivan je na materijalu dobijenom biopsijom bronhija pacijenta koji boluju od astme. Naime, pokazano je da se nakon GK tretmana smanjuje broj IL-17 produkujućih ćelija koji odgovara nalazu zdravih osoba (Chakir i sar., 2003).

Rezultati koji su dobijeni tokom izrade ove doktorske teze ukazuju da MP u *in vitro* uslovima inhibira i ekspresiju i produkciju IL-17 od strane ConA aktivisanih ĆLČ DA pacova. Kada je reč o antigen-specifičnoj produkciji IL-17, MP ne dovodi do tako izražene inhibicije produkcije ovog citokina kao u slučaju ConA stimulisanih ĆLČ DA pacova. U eksperimentalnom sistemu prikazanom u ovoj tezi se, bar delimično, rasvetlio mehanizam dejstva MP na ekspresiju i produkciju IL-17. Naime, pokazano je da je ekspresija i produkcija IL-17 ĆLČ DA pacova praćena i inhibicijom ekspresije Ror γ T transkripcionog faktora. Ovakav rezultat se u potpunosti slaže sa literaturnim podacima. Naime, Liu i saradnici (2009) su objavili da visoke doze MP (1 g/dan u toku pet dana) koje se aplikuju kod egzacerbacije RR-MS inhibiraju produkciju IL-17 od strane mononuklearnih ćelija periferne krvi što je uslovljeno inhibicijom ekspresije

RoryT transkripcionog faktora. Da je pomenuti transkripcioni faktor esencijalan za Th17 ćelijsku subpopulaciju govore u prilog veliki broj publikacija počev od prvih istraživanja u kojima je, pokazano da CD4⁺ T limfociti poreklom iz miševa kojima je uklonjen gen za RoryT ne odgovaraju na stimulaciju sa IL-23 u *in vitro* uslovima što rezultira odsustvom Th17 polarizacije (Ivanov i sar., 2006).

Dalje, kako su i EAE i MS bolesti koje su posredovane T limfocitima, bilo je interesantno ispitati dejstvo MP na produkciju IL-17 od strane prečišćenih T limfocita poreklom iz ČLČ DA pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da inhibicija produkcije IL-17 od strane prečišćenih T limfocita nije tako izražena kao u slučaju ukupne populacije ČLČ DA pacova. Ovakav rezultat ukazuje da svoje dejstvo MP na produkciju IL-17 od strane ČLČ ostvaruje na dva načina: direktnim dejstvom na T limfocite i indirektnim dejstvom na tzv. "akcesorne" ćelije (pre svega dendritske ćelije) koje su prisutne u limfnom čvoru. Dendritske ćelije (DĆ) prisutne u limfnom čvoru imaju ulogu u prezentaciji antigena i aktivaciji naivnih CD4⁺ ćelija te su značajne u pokretanju autoimnskog odgovora (Yamazaki i sar., 2003). Podaci iz literature ukazuju da GK primenjeni u *in vivo* uslovima smanjuju akumulaciju DĆ unutar limfnog čvora i slezine (Moser i sar., 2005), kao i broj cirkulišućih DĆ u krvi (Shodell i sar., 2001). Pored DĆ makrofagi unutar limfnog čvora takođe predstavljaju terapijsku metu za dejstvo GK na nekoliko načina. Zna se da GK imaju uticaja na njihovu diferencijaciju, proliferaciju i fagocitni kapacitet kao i na količinu produkovanih medijatora inflamacije kao što su: TNF α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-8 i IL-12 (Tuckermann i sar., 2005). Pored navedenih citokina, poznato je da GK smanjuju produkciju i IL-6 od strane makrofaga i DĆ, citokina koji je ključan za Th17 diferencijaciju (Almawi i sar., 1996; Tuckermann, i sar., 2005).

Interesantno je pomenuti i istraživanje koje ukazuje da bi dendritske ćelije koje dospevaju u CNS sa periferije mogle imati presudnu ulogu u indukciji relapsa u hroničnom relapsirajućem modelu EAE-a i to kroz produkciju IL-6, i polarizaciju T-ćelija ka Th17 fenotipu, što je pokazano i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima (Bailey i sar., 2007). Nesumnjivi značaj ovog citokina u polarizaciji Th17 ćelija, manje izražena inhibicija ekspresije i produkcije IL-17 u odnosu na IFN- γ kao i različiti stepen inhibicije produkcije IL-17 od strane prečišćenih T limfocita i ČLČ DA pacova su nas naveli da ispitamo uticaj MP na tzv. akcesorne ćelije unutar limfnog čvora. U svetlu

svoga pomenutog smo pokazali da MP inhibira produkciju IL-6 od strane CD3- ćelija poreklom iz ukupne populacije ČLČ DA pacova i time, bar delimično, objasnili različiti stepen inhibicije produkcije IL-17 od strane T limfocita i ČLČ DA pacova. Dalje nas je interesovalo da li MP na isti način deluje i na inhibiciju produkcije INF- γ . U literaturi postoje vrlo ubedljivi i jasni podaci da GK svoje dejstvo na inhibiciju produkcije INF- γ ostvaruje delujući zapravo na IL-12, citokin koji je važan za diferencijaciju Th1 ćelijske subpopulacije (Rentzos i sar., 2008). Mada postoje podaci u literaturi o inhibitornom efektu GK na produkciju INF- γ od strane splenocita (Ding i sar., 1989) i prečišćenih CD4+ ćelija pacova (Ramírez i sar., 1996), ne postoje podaci o komparativnoj analizi dejstva GK na produkciju INF- γ od strane prečišćenih T limfocita i ukupne populacije ČLČ DA pacova. Kako smo dobili različiti stepen inhibicije produkcije IL-17 od strane ČLČ DA pacova i T limfocita očekivali smo isti trend i u slučaju INF- γ . Međutim, u slučaju INF- γ ne postoji razlika u stepenu inhibicije produkcije ovog citokina kako od strane prečišćenih T limfocita tako i od strane ukupne populacije ČLČ DA pacova. Na osnovu ovih rezultata može se reći da MP na dva različita načina inhibira produkciju INF- γ i IL-17. Dakle, inhibicija produkcije INF- γ je uslovljena direktnim dejstvom na ćelije Th1 fenotipa dok je inhibicija produkcije IL-17 zapravo posledica dvojnog dejstva: na ćelije koje proizvode citokine koji definišu Th17 diferencijaciju (kao što je IL-6) kao i direktno na Th17 ćelije, inhibirajući pritom ekspresiju Ror γ T transkripcionog faktora.

Pored pokazanog različitog mehanizma inhibicije produkcije ova dva citokina uočljivo je da, iako uvek izraženija, inhibicija produkcije INF- γ nikada nije potpuna. Ako se osvrnemo na podatke iz literature, postoje radovi koji ukazuju da INF- γ inhibira produkciju IL-17 (Ogita i sar., 2011; Berghmans, i sar., 2011). Qian i saradnici su 2011 godine objavili rad u kome su i opisali mehanizam kojim INF- γ ostvaruje svoja dejstva. Dakle, INF- γ ne deluje direktno na IL-17 već smanjuje produkciju IL-23 od strane dendritskih ćelija i makrofaga i smanjuje stabilnost iRNK za p19 subjedinice (Qian i sar., 2011). Rezultati ove teze pokazuju da se dodavanjem anti-INF- γ neutrališućih antitela eliminiše njegov inhibitorni efekat na produkciju IL-17. Dakle, prisutna manja osetljivost IL-17 na dejstvo MP u odnosu na INF- γ u *in vitro* uslovima se može objasniti sinergističkim dejstvom preostalog INF- γ i MP.

U više navrata u ovoj tezi pokazano je da MP svoja dejstva ostvaruje putem genomskih mehanizama što u potpunosti odgovara podacima iz literature (Tuckermann i sar. 2005). Međutim, sve je više podataka da GK, a među njima i MP svoja antiinflamatorna i imunosupresorna dejstva ostvaruju i mimo genoma (Zen, i sar., 2011; Li i sar., 2011). Tačnije, u različitim eksperimentalnim postavkama pokazano je da GK deluju na aktivaciju i funkciju MAP kinaza (Zen i sar., 2011; Li i sar., 2011). Međutim, u našem eksperimentalnom sistemu MP ne utiče na aktivaciju ERK i p38 proteina kod ĆLĀ DA pacova, dok postoji diskretan, statistički beznačajan efekat na JNK aktivaciju. Dalje, pokazali smo da ERK (UO126), p38 (SB202190) i JNK (SP600125) inhibitori imaju sinergističko dejstvo u inhibiciji produkcije IL-17 sa MP što ukazuje na činjenicu da MP svoje inhibitorno dejstvo na produkciju IL-17 ne ostvaruje delujući na pomenute MAP kinaze. Pomenut sinergizam se može objasniti nekompletnom inhibicijom navedenih signalnih puteva. Međutim, aktivnost MAP kinaza pri višim dozama, kako MP tako i pomenutih inhibitora nismo ispitivali obzirom da oni pri visokim dozama utiču na vijabilitet ĆLĀ DA pacova, pa bi u tom slučaju tumačenje dobijenih rezultata bilo neadekvatno. Ipak, rezultati cELISA testa koji se odnose na ERK i p38 u potpunosti odgovaraju rezultatima ELISA testa što i ovoga puta ukazuje da MP ne deluje na ERK i p38 proteine. Suprotno tome, rezultat koji se tiče JNK nije u potpunosti jasan posebno ako se uzme u obzir da pod istim uslovima MP statistički značajno inhibira c-Jun aktivaciju, ali ne i aktivaciju JNK proteina. Ovakav nalaz je svakako iznenađujući ako se uzme u obzir činjenica da c-Jun može biti fosforilisan i time aktivisan aktivacijom JNK proteina. Ipak, postoje podaci koji ukazuju da se pod dejstvom Dexametazona nivo JNK proteina značajno ne menja, ali se smanjuje njegova enzimaska aktivnost čime bi mogli da objasnimo zapaženu diskrepancu (Hirasawa i sar., 1998). Dakle, diskretnom, redukcijom p-JNK koja nije statistički značajna možemo objasniti značajno smanjenje p-Jun proteina u našim eksperimentalnim uslovima. Takođe, postoje literaturni podaci koji ukazuju da fosforilacija p-Jun proteina može biti nezavisna od JNK aktivacije, što predstavlja još jedan argument za hipotezu da MP ostvaruje inhibitorno dejstvo na p-Jun nezavisno od aktivnosti JNK proteina (Adisheshaiah, i sar., 2006; Besirli i sar., 2003). Obzirom da *in vitro* eksperimentalni sistem koji je primenjen u prvom delu ove teze ima izvesna ograničenja dalje smo ispitali uticaj MP, na prvome mestu, na kliničku sliku EAE-a, *in vivo* modela MS. Naime, u cilju imitacije pulsne terapije MP kod pacijenata

koji boluju od MS sa akutnom egzacerbacijom bolesti, MP je aplikovan u visokoj dozi (50 mg/kg TT) nakon pojave prvih kliničkih znakova u trajanju od tri uzastopna dana. Kako podaci iz literature ukazuju na povoljno dejstvo GK na kliničko ispoljavanje EAE-a (Reichardt i sar., 2006) očekivali smo isti trend i u našim eksperimentalnim uslovima. I zaista, aplikacija MP je rezultirala statistički značajno blažom kliničkom slikom poredivši je sa kontrolnom eksperimentalnom grupom kojoj je, pod indentičnim uslovima, aplikovan PBS. Zapažen inhibitorni efekat MP na kliničku sliku EAE-a je praćen 8 dana nakon aplikacije poslednje doze MP tokom kojih se nisu ponovo pojavili znaci bolesti. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima koje su publikovali Wüst i saradnici (2008) koji su takođe prikazali rezultate koji se odnose na blažu kliničku sliku EAE-a nakon aplikacije Deksametazona u sličnim dozama tokom EAE-a kod C57BL/6 miševa. Međutim, ukoliko se GK aplikuje i.p u nižim koncentracijama (Linker i sar., 2008), *per os* (Chan i sar., 2008) ili se pak, aplikuju duži vremenski period sa naglim prestankom aplikacije (Reider i sar., 1994), dolazi do pogoršanja kliničkog ispoljavanja bolesti, ponovne pojave inflamatornog infiltrata unutar CNS-a kao i reaktivacije T limfocita specifičnih za antigene CNS. Stoga, čini se da način aplikacije GK tokom EAE-a ima veoma važnu ulogu.

Pored nepoznavanja svih mehanizama koji leže u osnovi povoljnog terapijskog delovanja glukokortikoida u autoimunskim bolestima CNS (Lühder i Reichardt. 2009), kontradiktorni su i podaci koji se odnose na mesto njihovog delovanja u autoimunskim bolestima CNS. Dok se po jednim svi efekti ostvaruju isključivo na periferiji (Wüst i sar., 2008) postoje i ubedljivi dokazi koji govore u prilog delovanja glukokortikoida u okviru samog CNS (Sorrells i Sapolsky. 2007). Imajući u vidu ova dva oprečna stava ispitali smo da li je blaža klinička slika u eksperimentalnoj grupi kojoj je aplikovan MP praćena i smanjenjem broja ćelija koje infiltriraju CNS. I zaista, pokazali smo da je broj infiltrišućih ćelija unutar KM tretirane grupe pacova statistički značajno manji u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je tretirana PBS-om. Ovakav rezultat u potpunosti odgovarala rezultatima koji su publikovali Chani i saradnici (2008). Smanjena infiltracija unutar CNS-a nastala kao posledica tretmana sa MP se može objasniti većim brojem mehanizama uključujući, inhibiciju aktivacije i proliferacije pomenutih ćelija unutar limfoidnih organa (Reichardt i sar., 2006), smanjenje ekspresije adhezivnih molekula na leukocitima i endotelnim ćelijama krvno-

moždane barijere kao i poboljšanje njenog integriteta (Engelhardt. 2004) kao i apoptozu encefalotigenih ćelija *in situ* (Pender i sar., 1997).

U našem eksperimentalnom sistemu nakon trodnevne aplikacije MP DA pacovima koji su oboleli od EAE-a nije povećano procentualno učešće apoptopskih ćelija unutar infiltrata KM u poređenju sa PBS tretiranom grupom. Ovakav rezultat je sa druge strane u potpunosti u skladu sa rezultatima istraživačke grupe koje pokazala da visoke doze Deksametazona primenjene u EAE-u rezultiraju apoptozom T limfocita na “periferiji”, ali ne i unutar CNS-a (Wüst i sar., 2008). Postoji mogućnost da se izvesni broj apoptotskih ćelija “izgubio” tokom procedure izolacije infiltrata KM, te stoga naš nalaz ne predstavlja realan *in vivo* broj apoptotskih ćelija unutar CNS-a. Treba naglasiti da nakon trodnevnog tretmana sa MP ne postoji razlika u procentualnom učešću apoptotičnih ćelija unutar infiltrata KM DA pacova koji su tretirani MP u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo odsustvo apoptoze unutar CNS-a tretirane grupe pacova koje su obbolele od EAE-a se može objasniti protektivnom ulogom GK od aktivacijom indukovane apoptoze putem CD95 receptora i to verovatno putem supresije ekspresije Fas liganda (Yang i sar., 1995) i/ili povećanom ekspresijom antiapoptotskog Bcl-2 proteina (Zipp i sar.,2000). Ipak, kako ovde prikazani rezultati ukazuju da je broj ćelija unutar DLČ, slezine i krvi smanjen u eksperimentalnoj grupi DA pacova koji su tretirani sa MP i može se pretpostaviti da je apoptoza pomenutih ćelija u perifernom limfnom tkivu i krvi delimično odgovorna za smanjenje infiltrišućih ćelija unutar CNS-a. Pored pokazane smanjene infiltracije ćelija unutar CNS-a, smanjenje samog proinflatornog potencijala prisutnih infiltrišućih ćelija CNS-a se nameće kako mogući mehanizam supresivnog dejstva MP u EAE-u. Obzirom da se zna da su IFN- γ i IL-17 glavni medijatori u patogenezi EAE-a bilo je logično ispitati da li MP primenjen u *in vivo* uslovima ima uticaja na njihovu ekspresiju i produkciju. Pokazano je da MP pored predhodno pomenutih efekata inhibira i ekspresiju i produkciju oba citokina od MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a. Ovakav rezultat nas navodi na zaključak da MP u našem eksperimentalnom dizajnu svoje povoljno dejstvo ostvaruje unutar CNS-a i to inhibicijom produkcije IFN- γ i IL-17 što se u potpunosti slaže sa rezultatima Kroenke-a i saradnika (Kroenke i sar., 2008). Na osnovu ovakvih nalaza neminovno se nameće pitanje o potencijalnim mehanizmima koji stoje u osnovi inhibitornog dejstva ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17 nakon trodnevnog tretmana

DA pacova koji su oboleli od EAE-a. Kako u literaturi postoje brojni radovi koji ukazuju na značaj transkripcionog faktora T-bet za Th1 diferencijaciju (Falcone i Sarvetnick, 1999) mogli smo da pretpostavimo da je okosnica inhibicije ekspresije i produkcije IFN- γ zapravo inhibicija njegove ekspresije. I zaista, pokazano je da MP nakon trodnevnog tretmana inhibira ekspresiju transkripcionog faktora T-bet što u potpunosti odgovara podacima iz literature. Tako su Liberman i saradnici (2007) pokazali da je inhibicija produkcije IFN- γ od strane T limfocita praćena i inhibicijom ekspresije T-bet transkripcionog faktora (Liberman, i sar.,2007). Takođe, kod pacijenata koji boluju od RR-MS nakon visokih doza GK postoji inhibicija produkcije IFN- γ koja je uslovljena inhibicijom transkripcionog faktora T-bet kod cirkulišućih CD4+ i CD8+ T limfocita (Frisullo i sar.,2007).

Osnovna činjenica od koje se pošlo prilikom planiranja i izrade ove doktorske disertacije je ispitivanje dejstva MP na IL-17 u EAE-u i rasvetljavanja njegovog mehanizma dejstva. Prethodno je pokazano da MP inhibira ekspresiju transkripcionog faktora Ror γ T što predstavlja jedan od njegovih mehanizama inhibicije IL-17 u *in vitro* uslovima. Međutim, kako takvi uslovi imaju svoja izvesna ograničenja, postavilo se pitanje da li MP u *in vivo* uslovima na isti način deluje na transkripcioni faktor Ror γ T. Dobijen rezultat ukazuje da MP primenjen i *in vivo* inhibira ekspresiju Ror γ T transkripcionog faktora od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a.

Poznato je da se receptor za IL-23 (IL-23R) ne nalazi eksprimiran na naivnim T-ćelijama, pa stoga njegovo prisustvo nije potrebno na samom početku diferencijacije (Parham i sar., 2002), ali je neophodan za održavanje već diferencijovane ćelije Th17 fenotipa (Cua i sar., 2003). Kako prikazani rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da MP inhibira ekspresiju i produkciju citokina od strane već diferencijovanih ćelija Th17 fenotipa, inhibicija ekspresije IL-23R je razmatrana kao mogući mehanizam dejstva MP na IL17. Dobijeni rezultat ukazuje da MP inhibira i ekspresiju IL-23R na površini MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a što što je u skladu sa publikacijom u kojoj se navodi da visoke doze MP inhibiraju ekspresiju IL-23R na mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata koji boluju od RR-MS nakon visokih doza MP (Liu i sar., 2009).

Međutim, ako se uzme u obzir da oba citokina proizvode pre svega CD4+ ćelije, postavilo se pitanje da li je smanjena ekspresija i produkcija ovih citokina zapravo

posledica smanjenje procentualne zastupljenosti CD4+ ćelija unutar infiltrata CNS-a. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Wüst i njegovih saradnika (Wüst i sar., 2008), obzirom da je pokazano da MP ne smanjuje procenat CD4+ ćelija unutar infiltrata eksperimentalne grupe koja je tretirana sa MP u poređenju sa kontrolnom grupom. Opet, sa druge strane treba imati na umu i činjenicu da kada CD4+ T limfociti koji proizvode IFN- γ i IL-17 dospeju u CNS dolazi i do aktivacije ćelija prisutnih *in situ* - makrofaga i mikroglije koje na svojoj površini sprimiraju CD11b marker (Murphy i sar., 2010). Nakon aktivacije oni proizvode proinflamatorne citokine (IL-1 β , TNF- α i IL-6) unutar CNS-a što rezultira oštećenjem mijelina i aksona kao i apoptozom oligodendrocita (Murphy i sar., 2010). Još davne 1997 godine opisana je apoptoza upravo pomenutih CD11b+ ćelija unutar CNS-a nakon primene deksametazona u EAE-u (Nguyen i sar., 1997) što čime se zapravo defenisao još jedan mehanizam kojim GK ostvaruju svoja antiinflamatorna dejstva unutar CNS-a. Rezultati koji su dobijeni prilikom izrade ove doktorske disertacije se ne podudaraju sa navodima pomenutih autora obzirom da MP smanjuje ali ne statistički značajno, procentualnu zastupljenost ove populacije među MNČKM.

Iako se procentualna zastupljenost CD4+ ćelija u KM obolelih pacova nije smanjila pod uticajem MP, bilo je potrebno da se ispita odnos naivnih i aktivisanih ćelija izmenjen, s obzirom da su samo autoreaktivne ćelije reaktivisane u CNS, a da oštećena barijera krv-mozak omogućava prodor svih limfocita periferene krvi, uključujući i naivne CD4+ limfocite irelevantne antigenske specifičnosti. CD62 ligand (CD62L) se smatra markerom koji je eksprimiran na naivnim T limfocitima (Ivetić i Ridley. 2004). Stoga, postavilo se pitanje da li MP deluje selektivno samo na reaktivirane T limfocite unutar CNS-a. Rezultati su pokazali da MP unutar CNS-a ne menja značajno zastupljenost kako naivnih (CD62L+) ćelija, tako ni aktivisanih limfocita (CD25+ i OX40+) T limfocita. Stoga sledi da su opisani fenomen ublažavanja kliničke slike EAE ne može objasniti selektivnim delovanjem na aktivisane ćelije već je rezultat delovanja MP na procese koji leže u osnovi ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17

Obzirom da je na samome početku ove teze pokazano da postoji izvesni stepen diskrepance u inhibiciji i ekspresije i produkcije IFN- γ i IL-17 pod dejstvom MP u *in vitro* uslovima interesantno je bilo ispitati da li je ovaj fenomen prisutan i u *in vivo*

uslovima. Tako je pokazano da nakon PMA + IO stimulacije MNČKM DA pacova obolelih od EAE-a i unutraćelijskog bojenja oba citokina, procentualno učešće IFN- γ + ćelija biva smanjeno nakon trodnevnog tretmana MP što nije slučaj sa IL-17+ ćelijama. Kako su u literaturi opisane dvostruko pozitivne (IFN- γ +i IL-17+) ćelije u EAE-u kod DA pacova (Momčilović i sar., 2008) ispitan je i uticaj MP na njihovo procentualno učešće nakon trodnevnog *in vivo* tretmana. Nakon dobijenog rezultata koji ukazuje na odsustvo dejstva MP na ovu populaciju ćelija čini se da su one sličnije Th17 nego Th1 supopulaciji barem u pogledu osetljivosti na *in vivo* tretman MP-om. Sve zajedno ukazuje da MP u *in vivo* uslovima smanjuje i ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 unutar CNS-a. Međutim, i kapacitet produkcije citokina obe ćelijske subpopulacije se menja kada se nakon trodnevnog MP tretmana izoluju MNČKM i stimulišu snažnim, nespecifičnim stimulansima (PMA + IO). U takvim *ex vivo* uslovima, MNČKM imaju kapacitet da produkuju IL-17, ali ne i IFN- γ . Važno napomenuti da isti trend postoji i kada se analiziraju CD4+ ćelije. Moguće je pretpostaviti da nakon PMA + IO stimulacije, dolazi do prelaska Th1 limfocita u Th17 ćelijsku subpopulaciju. Kako još uvek ne postoji jasno objašnjenje za ovaj fenomen preostaje da pretpostavimo da MP ostaruje svoje dejstvo direktno na Th1 ćelijsku subpopulaciju što verovatno nije slučaj sa Th17 ćelijskom subpopulacijom. Sudeći po podacima iz literature astrociti i endotelne ćelije CNS-a u *in vitro* uslovima stimulišu produkciju IL-17 (Miljković i sar., 2007; Momčilović i sar., 2009) te je izvesno da MP u *in vivo* uslovima zapravo deluje indirektno tj. na pomenute ćelije koje bivaju eliminisane nakon izolacije MNČKM te tako u *ex vivo* uslovima inhibitorni efekat MP na produkciju IL-17 izostaje. Takođe, možda postoji razlika u trajanju inhibitornog efekta MP-a na Th1 i Th17 ćelijske subpopulacije u *in vivo* uslovima i PMA + IO stimulacije u *ex vivo* uslovima u trajanju od četiri sata, što je, čini se, dovoljno za ekspresiju citokina od strane T limfocita. Dalje, ne sme se ni zanemariti da je PMA + IO vrlo snažna arteficialna stimulacija i da ona, kao takva, može zamaskirati realne rezultate usled stimulacije encefalogenih ćelija kao i ostalih ćelija koje su prisutne u CNS-u a koje imaju ulogu u autoimunosti. Ostaje da se u budućnosti ispita mehanizam koji je okosnica razlike između *in vivo* i *ex vivo* ekspresije IL-17 od strane MNČKM DA pacova koji su tretirani sa MP.

Obzirom da je sve više radova koji govore u prilog ne-genomskog dejstva GK (Tuckermann i sar., 2005; Zhou i sar., 2011) analizirano je dejstvo antagoniste

glukokortikoidnog receptora RU486. Poznato je da RU486 poništava protektivni uticaj GK na EAE i pogoršava kliničku sliku EAE-a (Bolton i Flower. 1989). Kako postoje podaci da RU486 blokira GR i u *in vitro* uslovima (Yu i sar., 2012) na samome početku ispitali smo dejstvo RU486 koji je kultivisan sa MP na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane ČLČ neimunizovanih pacova. Kako je dobijen očekivan rezultat tj. odsustvo inhibitornog dejstva MP na produkciju oba citokina ispitali smo njegovo dejstvo u *in vivo* uslovima. I zaista, naši rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima iz literature, obzirom da RU486 aplikovan zajedno sa MP ne samo da blokira povoljan efekat MP na kliničku sliku EAE-a već i u *ex vivo* uslovima blokira njegovo inhibitorno dejstvo na produkciju IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM tretirane grupe DA pacova. Dakle, u našem eksperimentalnom sistemu MP svoja dejstva ostvaruje vezivanjem za GR.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. **Metilprednizolon u *in vitro* uslovima inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane limfocita pacova, ali u različitom stepenu.**

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- MP u *in vitro* uslovima u različitom stepenu inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane mitogenom i specifičnim antigenom stimulisanih ČLČ pacova kao i ćelija poreklom iz infiltrata kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE
- MP inhibira produkciju IFN- γ i IL-17 od strane prečišćenih T limfocita na dva različita načina
- IFN- γ predstavlja negativni regulator IL-17 produkcije od strane ČLČ neimunizovanih DA pacova

2. **Metilprednizolon u *in vivo* uslovima ublažava kliničke znake EAE bar delom zahvaljujući inhibiciji efektorskih funkcija limfocita u ciljnom tkivu.**

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- MP primenjen nakon pojave prvih kliničkih znakova u toku tri dana ublažava kliničko ispoljavanje EAE-a
- MP u *in vivo* uslovima inhibira ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 od strane MNČKM DA pacova koji su oboleli od EAE-a
- MP u *in vivo* uslovima ne menja procentualnu zastupljenost CD4⁺ T limfocita unutar infiltrata KM DA pacova koji su oboleli od EAE-a.
- MP u *in vivo* uslovima ostaruje pomenute efekte inhibirajući ekspresiju transkripcionih faktora koji su bitni za Th1 (T-bet) i Th17 (RoryT) diferencijaciju kao i održavanje Th17 ćelijske subpopulacije inhibirajući ekspresiju gena za IL-23 receptor.

3. **Metilprednizolon ostvaruje svoje *in vitro* i *in vivo* efekte na ekspresiju i produkciju IFN- γ i IL-17 delujući preko citoplazmatskog glukokortikoidnog receptora.**

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- Antagonist GR, RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IFN- γ i IL-17 uslovljenu dejstvom MP u *in vitro* uslovima.
- Dat *in vivo* istovremeno sa MP, RU-486 poništava njegov povoljni terapijski efekat na kliničku sliku EAE.
- Dat *in vivo* RU-486 sprečava inhibiciju produkcije IFN- γ i IL-17 od strane ćelija poreklom iz infiltrata kičmene moždine pacova tretiranih metilprednizolonom.

7. LITERATURA

1. Adiseshaiah, Kalvakolanu, Reddy. A JNK-independent signaling pathway regulates TNF alpha-stimulated, c-Jun-driven FRA-1 protooncogene transcription in pulmonary epithelial cells. *J Immunol.* 2006;177:7193-202.
2. Aggarwal, Ghilardi, Xie, de Sauvage, Gurney. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278:1910-4.
3. Albanesi, Cavan, Girolomoni. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes:synergistic or antagonist effect with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999;162:494-502.
4. Alimi, Huang, Brazillet, Charreire. Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) in mice lacking the IFN-gamma receptor gene. *Eur J Immunol.* 1998;28:201-8.
5. Allen, Brankin. Pathogenesis of multiple sclerosis-the immune diathesis and the role of viruses. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993;52:95–105.
6. Almawi, Beyhum, Rahme, Rieder. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol.* 1996;60:563-72.
7. Anderson, Sharpe, Hafle. The B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmune disease of the central nervous system. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 677-83.
8. Andersson,Yu, Söderström, Weerth, Baig, Solders, Link. Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2002;9:243-51.
9. Bailey, Schreine, McMahon, Miller. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* 2007;8:172-180.
10. Bamberger, Bamberger, de Castro, Chrousos. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest.* 1995;95:2435-41.

11. Barten i Ruddle. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1994;51:123-33.
12. Ben-Nun, Wekerle, Cohen. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981;11:195-9.
13. Berg. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell.* 1989;30:57:1065-8.
14. Berghmans, Nuyts, Uyttenhove, Van Snick, Opdenakker, Heremans. Interferon- γ orchestrates the number and function of Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31:575-87.
15. Besirli, Johnson. JNK-independent activation of c-Jun during neuronal apoptosis induced by multiple DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2003;278:22357-66.
16. Bettelli, Carrier, Gao, Korn, Strom, Oukka, Weiner, Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-238.
17. Bettelli, Pagany, Weiner, Linington, Sobel, Kuchroo. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 2003;197:1073-81.
18. Bettelli, Sullivan, Szabo, Sobel, Glimcher, Kuchroo. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2004;200:79-87.
19. Bielekova, Sung, Kadom, Simon, McFarland, Martin. Expansion and functional relevance of highavidity myelin-specific CD4⁺ T cells in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2004; 172: 3893–904.
20. Blecharz, Haghikia, Stasiulek, Kruse, Drenckhahn, Gold, Roewer, Chan, Förster. Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16:293-302.
21. Bolton i Flower. The effects of the anti-glucocorticoid RU 38486 on steroid-mediated suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. *Life Sci.* 1989;45:97-104.

22. Boumpas, Chrousos, Wilder, Cupps, Balow. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993;119:1198-208.
23. Buttgereit i Scheffold. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids.* 2002;67:529-34.
24. Buttgereit, Burmester, Brand. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today.* 2000; 21:192-9.
25. Buttgereit, Straub, Wehling, Burmester. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:3408-17.
26. Carlo Pozzilli, Fabiana Marinelli, Silvia Romano and Francesca Bagnato. Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci.* 2004;223:47-51.
27. Compston i Coles . Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002;359:1221-31.
28. Confavreux, Vukusic, Achiti. Diagnostic criteria of different clinical forms. *Rev Neurol.* 2001;157:907-13.
29. Chakir, Shannon, Molet, Fukakusa, Elias, Laviolette, Boulet, Hamid. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL- 11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:1293-8.
30. Chan, Ban, Chun, Wang, McQualter, Bernard, Toh, Alderuccio F. Methylprednisolone induces reversible clinical and pathological remission and loss of lymphocyte reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity.* 2008;41:405-13.
31. Chaudhry, Samstein, Treuting, Liang, Pils, Heinrich, Jack, Wunderlich, Brüning, Müller, Rudensky. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2011;34:566-78.
32. Chen, Lin, Gao, Li, Zhang, Xing, Deng, Yao, Tsun, Li. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:536-42.
33. Chu, Wittmer, Dalton. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2000;192:123-8.

34. Colgan i Rothman. All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. *Nat Immunol.* 2006; 7:899-901.
35. Conti, Gaffen. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010;12:518-27.
36. Croxtall, Choudhury, Flower. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* 2000;130:289-98.
37. De Bosscher i Haegeman. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2009;23:281-91.
38. De Bosscher, Vanden Berghe, Vermeulen, Plaisance, Boone, Haegeman. Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3919-24.
39. De Jager, Jia, Wang, de Bakker, Ottoboni, Aggarwal, Piccio, Raychaudhuri, Tran, Aubin, Briskin, Romano; International MS Genetics Consortium, Baranzini, McCauley, Pericak-Vance, Haines, Gibson, Naeglin, Uitdehaag, Matthews, Kappos, Polman, McArdle, Strachan, Evans, Cross, Daly, Compston, Sawcer, Weiner, Hauser, Hafler, Oksenberg. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;41:776-82.
40. Dighiero, Rose. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today.* 1999;20:423-8.
41. Ding, Yang, Xu. The inhibitory effect of hydrocortisone on interferon production by rat spleen cells. *J Steroid Biochem.* 1989;33:1139-41.
42. Doherty, Seder, Sher. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol.* 1996;156:735-41.
43. Duma, Jewell, Cidlowski. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102:11-21.

44. Elovaara, Ukkonen, Leppäkynnäs, Lehtimäki, Luomala, Peltola, Dastidar. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch. Neurol.* 2000;57: 546–551.
45. Engelhardt. Role of glucocorticoids on T cell recruitment across the blood-brain barrier. *Z Rheumatol.* 2000;59 Suppl 2:II/18-21.
46. Dietrich. Endothelial cells of the blood-brain barrier: a target for glucocorticoids and estrogens? *Front Biosci.* 2004;9:684-93.
47. Ercolini, Miller. Mechanisms of immunopathology in murine models of CNS demyelinating disease *J. Immunol.* 2006; 176: 3293–8.
48. Erlacher, Michalak, Kelly, Labi, Niederegger, Coultas, Adams, Strasser, Villunger. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood.* 2005; 106: 4131–4138.
49. Falcone i Sarvetnick. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:670-6.
50. Ferber, BrockFe, Taylor-Edwards, Ridgway, Dinisco, Steinman, Dalton, Fathman. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996;156:5-7.
51. Fernández, Fernández, Alonso, Caballero, Luque, Bravo, León, Mayorga , Leyva, de Ramón. DQB1*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 2004;251:440-4.
52. Fogdell-Hahn, Ligers, Grønning, Hillert, Olerup. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2000; 55:140-8.
53. Fossiez, Djossou, Chomarat , Flores-Romo , Ait-Yahia, Maat, Pin, Garrone, Garcia, Saeland, Blanchard, Gaillard, Das Mahapatra, Rouvier, Golstein, Banchereau, Lebecque ST cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:2593-603.
54. Frisullo, Nociti, Iorio, Katia Patanella, Bianco, Caggiula, Sanricca, Tonali, Mirabella, Batocchi. Glucocorticoid treatment reduces T-bet and pSTAT1

- expression in mononuclear cells from relapsing remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2007;124:284-93.
55. Frohman, Racke, Raine. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354:942-55.
 56. Fujino, Andoh, Bamba, Ogawa, Hata, Araki, Bamba, Fujiyama. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52: 65-70.
 57. Gaudet, Hashimoto, Sadovnick, Eber: Is sporadic MS caused by an infection of adolescence and early adulthood? A case - control study of birth order position. *Acta Neurol Scand* 1995; 91: 19–21.
 58. Gilden: Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005; 4: 195–202.
 59. Gold, Lington, Lassmann. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006;129:1953-71.
 60. Goldberg, Belkowski, Bloom. Regulation of macrophage function by interferon-gamma. Somatic cell genetic approaches in murine macrophage cell lines to mechanisms of growth inhibition, the oxidative burst, and expression of the chronic granulomatous disease gene. *J Clin Invest.* 1990;85:563-9.
 61. Goldrath i Bevan. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999; 402:255-62.
 62. Goldstein i Betz. Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann Neurol.* 1983;14:389-95.
 63. Goodnow, Glynne, Akkaraju, Rayner, Mack, Healy, Chaudhry, Miosg, Wilson, Papathanasiou, Loy. Autoimmunity, self-tolerance and immune homeostasis: from whole animal phenotypes to molecular pathways. *Adv Exp Med Biol.* 2001;490:33-40.
 64. Goverman, Woods, Larson, Weiner, Hood, Zaller. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell.* 1993;72:551-60.
 65. Grauer, Offenhäusser, Schmidt, Toyka, Gold. Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations. *Nervenarzt.* 2001; 72: 577–589.

66. Gross i Cidlowski. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19:331-9.
67. Hafler, Compston, Sawcer, Lander, Daly, De Jager, de Bakker, Gabriel, Mirel, Ivinson, Pericak-Vance, Gregory, Rioux, McCauley, Haines, Barcellos, Cree, Oksenberg, Hauser. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007 30;357:851-62.
68. Hafler. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2004 Mar;113:788-94.
69. Harrington, Hatton, Mangan, Turner, Murphy, Murphy, Weaver. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-1132.
70. Harris, Grosso, Yen, Xin, Kortylewski, Albesiano, Hipkiss, Getnet, Goldberg, Maris, Housseau, Yu, Pardoll, Drake. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol.* 2007;179:4313-7.
71. Hartmann, El-Gindi, Lohmann, Lischper, Zeni, Galla. TIMP-3: a novel target for glucocorticoid signaling at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390:182-6.
72. Hayes, Freeman, Donnelly. IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine.* 1995;7:427-35.
73. Hemmer, Nessler, Zhou, Kieseier, Hartung. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2:201-211.
74. Hench i Kendall. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1949;24:181-97.
75. Heremans, Dillen, Groenen, Martens, Billiau. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1996;26:2393-8.
76. Herold, McPherson, Reichardt. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 60–72.
77. Hillert i Olerup. HLA and MS. *Neurology* 1993; 43:2426-7.

78. Hirasawa, Sato, Fujita, Mue, Ohuchi. Inhibition by dexamethasone of antigen-induced c-Jun N-terminal kinase activation in rat basophilic leukemia cells. *J Immunol.* 1998;161:4939-43.
79. Hollenberg, Weinberger, Ong, Cerelli, Oro, Lebo, Thompson, Rosenfeld, Evans. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318:635-41.
80. Holz, Bielekova, Martin, Oldstone. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. *J. Immunol.*2000; 164: 1103–9.
81. Hu, Shen, Crellin, Ouyang. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217:60-76.
82. Hwang. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med J.* 2010;51:484-91.
83. Ibrahim i Gold: Genomics, proteomics, metabolomics: what is in a word for multiple sclerosis? *Curr Opin Neurol* 2005;18:231–235.
84. Infante-Duarte , Horton, Byrne, Kamradt. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 2000;165:6107-6115.
85. Ishizu, Osoegawa, Mei, Kikuchi, Tanaka, Takakura, Minohara, Murai, Mihara, Taniwaki, Kira. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain* 2005;128:988-1002.
86. Ivetic i Ridley. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:1118-21.
87. Iwakura, Ishigame, Saijo, Nakae. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34:149-62.
88. Jacobsen, Cepok, Quak, Happel, Gaber, Ziegler, Schock, Oertel, Sommer, Hemmer. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain.* 2002;125:538-50.
89. Jones i Chan. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:748-53.
90. Kakalacheva, Münz, Lünemann. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 132-40.

91. Karandikar, Vanderlugt, Bluestone, Miller. Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 1998; 89: 10-18.
92. Kebir, Kreymborg, Ifergan, Dodelet-Devillers, Cayrol, Bernard, Giuliani, Arbour, Becher, Prat . Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007;13:1173-1175.
93. Kennedy, Torrance, Picha, Mohler. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol.* 1992;149:2496-505.
94. Kleinschek, Owyang, Joyce-Shaikh, Langrish, Chen, Gorman, Blumenschein, McClanahan, Brombacher, Hurst, Kastelein, Cua. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation *J Exp Med.*2007;204:161-70.
95. Kleinschek, Owyang, Joyce-Shaikh, Langrish, Chen, Gorman, Blumenschein, McClanahan, Brombacher, Hurst, Kastelein, Cua. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2007;204:161-70.
96. Kramer i Gaffen. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol.* 2007;78:1083-93.
97. Krishnamoorthy i Wekerle. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol.* 2009 ;39:2031-5.
98. Krishnamoorthy, Lassmann, Wekerle, Holz. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest.* 2006;116:2385-92.
99. Laan, Cui, Hoshino, Lotvall, Sjostrand, Gruenert, Skoogh, Linden:Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;162:2347-2352.
100. Lassmann, Bruck, Lucchinetti. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001;7:115-21.
101. Lassmann. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol.* 2005;15:217-22.

102. Lauer. Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2010;10:421-40.
103. Lazarevic, Chen, Shim, Hwang, Jang , Bolm, Oukka, Kuchroo, Glimcher. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol.* 2011;12:96-104.
104. Leussink, Jung, Merschorf, Toyka, Gold. Highdose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch. Neurol.* 2001;58:91–97.
105. Li, Zhang, Hussain, Triantaphyllopoulos, Clark, Bhavsar, Zhou, Chung. Inhibition of p38 MAPK-dependent bronchial contraction after ozone by corticosteroids. *Eur Respir J.* 2011;37:933-42.
106. Li, Linan, Stein, Faustman.Reduced expression of peptide-loaded HLA class I molecules on multiple sclerosis lymphocytes. *Ann Neurol.* 1995;38:147-54.
107. Liberman, Refojo, Druker, Toscano, Rein, Holsboer, Arzt. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J.* 2007;21:1177-88.
108. Lin, Chang, Yan, Huang, Lin, Lin.Decreased intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and L-selectin (CD62L) expression on peripheral blood natural killer cells in asthmatic children with acute exacerbation. *Allergy.* 2003;58:67-71.
109. Linker, Weller, Lühder, Mohr, Schmidt, Knauth, Metselaar, Gold. Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: long-term protective effects and enhanced efficacy of methylprednisolone formulations. *Exp Neurol.* 2008;211:397-406.
110. Liu, Hu, Wang, Peng, Yang, Chen, Lu, Zheng. Effect of high-dose methylprednisolone treatment on Th17 cells in patients with multiple sclerosis in relapse. *Acta Neurol Scand.* 2009;120:235-41.
111. Lochner, Peduto, Cherrier, Sawa, Langa, Varona, Riethmacher, Si-Tahar, Di Santo, Eberl. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR γ t+ T cells. *J Exp Med.* 2008;205:1381-93.
112. Lock, Hermans, Pedotti, Brendolan, Schadt, Garren, Langer-Gould, Strober, Cannella, Allard, Klonowski, Austin, Lad, Kaminski, Galli, Oksenberg, Raine, Heller, Steinman. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields

- new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002;8:500-508.
113. Lu i Cidlowski. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:102-23.
 114. Lühder i Reichardt. Traditional concepts and future avenues of glucocorticoid action in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy. *Crit Rev Immunol.* 2009;29:255-73.
 115. Ma, Chow, Gri, Carra, Gerosa, Wolf, Dzialo, Trinchieri. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996;183:147-57.
 116. Marrack, Kappler, Kotzin. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 2001; 7:899-905.
 117. Martin i McFarland. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1995;32:121-82.
 118. Matesanz, Fernández, Alcina. Genomewide study of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2007;357:851-62.
 119. McGeachy i Cua. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 2008;28:445-453.
 120. McGeachy, Bak-Jensen, Chen, Tato, Blumenschein, McClanahan, Cua. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8:1390-1397.
 121. McKenzie, Kastelein, Cua. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006;27:17-23.
 122. Mendel, Kerlero de Rosbo, Ben-Nun. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol.* 1995;25:1951-9.
 123. Michałowska-Wender i Wender. Peripheral blood cell immunomarkers in the course of methylprednisolone treatment of multiple sclerosis relapses. *Folia Neuropathol.* 2008;46:134-8.

124. Migita, Eguchi, Kawabe, Nakamura, Shirabe, Tsukada, Ichinose, Nakamura, Nagataki. Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy. *Transplantation*. 1997;6:583–587.
125. Miljković, Momčilović, Stojanović, Stošić-Grujičić, Ramić, Mostarica-Stojković. Astrocytes stimulate interleukin-17 and interferon-gamma production in vitro. *J Neurosci Res*. 2007;85:3598-606.
126. Miyamoto, Prause, Sjöstrand, Laan, Lötvall, Lindén. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 2003;170:4665-72.
127. Momčilović, Miljković, Popadić, Miljković, Mostarica-Stojković: Kinetics of IFN-gamma and IL-17 expression and production in active experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats. *Neurosci Lett*. 2008;447:148-152.
128. Momčilović, Miljković, Mostarica-Stojković. Murine brain endothelial cells differently modulate interferon- γ and interleukin- 17 production in vitro. *Arch Biol Sci*. 2009; 61:29-36.
129. Moser, De Smedt, Sornasse, Tielemans, Chentoufi, Muraille, Van Mechelen, Urbain , Leo. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*. 1995; 25:2818–24.
130. Mühl i Pfeilschifter. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:1247-55.
131. Murphy, Lalor, Lynch, Mills. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010;24:641-51.
132. Murray. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ*. 2006;332:525-7.
133. Nakae, Nambu, Sudo, Iwakura. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003;171:6173-6177.
134. Nakae, Nambu, Sudo, Iwakura. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003;171;6173-6177.
135. Nguyen,McCombe,Pender. Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with

- experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:58-69.
136. Nossal. A purgative mastery. *Nature* 2001;412:685-686.
 137. Ogita, Tanii, Morita, Suzuki, Tanabe. Suppression of Th17 response by *Streptococcus thermophilus* ST28 through induction of IFN- γ . *Int J Mol Med.* 2011;28:817-22.
 138. Pardridge, Buciak, Kang, Boado. Protamine-mediated transport of albumin into brain and other organs of the rat. Binding and endocytosis of protamine-albumin complex by microvascular endothelium. *J Clin Invest.* 1993;92:2224-9.
 139. Pender, Csurhes, Wolfe, Hooper, Good, McCombe, Greer. Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis. *J. Clin. Neurosci.* 2003;10:63–66.
 140. Pender, McCombe, Yoong, Nguyen. Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J. Autoimmun.* 1992;5:401–410.
 141. Pratt i Toft. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med.* 2003;228:111-33.
 142. Pucci, Taus, Cartechini, Morelli, Giuliani, Clementi, Menzo. Lack of Chlamydia infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2000;48:399-400.
 143. Pugliatti, Rosati, Carton, Riise, Drulović, Vecsei, Milanov. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 2006;13:700-22.
 144. Qian, Ning, Zhang, Hoft, Stumpo, Blackshear, Liu. Posttranscriptional regulation of IL-23 expression by IFN-gamma through tristetraprolin. *J Immunol.* 2011;186:6454-64.
 145. Raddassi, Kent, Yang, Bourcier, Bradshaw, Seyfert-Margolis, Nepom, Kwok, Hafler. Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 2011;187:1039-46.
 146. Ramírez, Fowell, Puklavec, Simmonds, Mason. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol.* 1996;156:2406-12.

147. Reder, Thapar, Jensen. A reduction in serum glucocorticoids provokes experimental allergic encephalomyelitis: implications for treatment of inflammatory brain disease. *Neurology*. 1994;44:2289-94.
148. Reichardt, Gold, Lühder. Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother*. 2006; 6:1657-1670.
149. Rentzos, Nikolaou, Rombos, Evangelopoulos, Kararizou, Koutsis, Zoga, Dimitrakopoulos, Tsoutsou, Sfangos. Effect of treatment with methylprednisolone on the serum levels of IL-12, IL-10 and CCL2 chemokine in patients with multiple sclerosis in relapse. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;110:992-6.
150. Rivers, Sprunt, Berry. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*. 1933;58:39-53.
151. Robertson, Schulman, Karnik, Alnemri, Litwack. Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. *Mol Endocrinol*. 1993;7:1226-39.
152. Rohowsky-Kochan, Molinaro, Cook. Cytokine secretion profile of myelin basic protein-specific T cells in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2000;6:69-77.
153. Rouvier, Luciani, Mattei, Denizot, Golstein. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993;150:5445-56.
154. Rubio, Stankovich, Field, Tubridy, Marriott, Chapman, Bahlo, Perera, Johnson, Tait, Varney, Speed, Taylor, Foote, Butzkueven, Kilpatrick. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes Immun*. 2008; 9:624-30.
155. Ruddy, Wong, Liu, Yamamoto, Kasayama, Kirkwood, Gaffen. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004;279:2559-67.
156. Schäcke, Rehwinkel, Asadullah, Cato. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp Dermatol*. 2006;15:565-73.

157. Screpanti, Morrone, Meco, Santoni, Gulino, Paolini, Crisanti, Mathieson, Frati. Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J. Immunol.*142; 3378–3383.
158. Shodell i Siegal. Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:446–8.
159. Skoskiewicz, Colvin, Schneeberger, Russell. Widespread and selective induction of major histocompatibility complex-determined antigens in vivo by gamma interferon. *J Exp Med.* 1985;162:1645-64.
160. Sloka i Stefanelli. The mechanism of action of methylprednisolone. *Mult Scler.* 2005;11:425-32.
161. Smith, Schmied, Hewson, Lassmann, Cuzner. Apoptosis of T cells and macrophages in the central nervous system. *J Autoimmun.* 1996;9:167-74.
162. Song, Buttgereit. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246:142-6.
163. Song, Gold, Straub, Burmester, Buttgereit. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! *J Rheumatol.* 2005;32:1199-1207.
164. Sorrells i Sapolsky. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007;21:259-72.
165. Sriram, Stratton, Yao, Tharp, Ding, Bannan, Mitchell. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1999;46:6-14.
166. Steinman, Martin, Bernard, Conlon, Oksenberg. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:491-505.
167. Stohlman, Hinton. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 2001;11:92-106.
168. Sutton, Brereton, Keogh, Mills, Lavelle. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006;203:1685-91.
169. Tabi, McCombe, Pender. Apoptotic elimination of V beta 8.2+ cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune

- encephalomyelitis induced by the passive transfer of V beta 8. 2+ encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 2609–2617.
170. Tamura, Ueda, Yoshida, Matsuzaki, Mohri, Okubo. Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:21-6.
171. ter Meulen, Koprowski , Iwasaki, Käckell, Müller. Fusion of cultured multiple-sclerosis brain cells with indicator cells: presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza-type virus. *Lancet.* 1972;2:1-5.
172. Traugott, Reinherz, Raine. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol.* 1983;4:201-21.
173. Tuckermann, Kleiman, McPherson, Reichardt. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2005;42:71-104.
174. Tuckermann, Kleiman, McPherson, Reichardt. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2005;42:71-104.
175. Tzartos, Friese, Craner, Palace, Newcombe, Esiri, Fugger. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008; 172:146-155.
176. Uytendhoe i Van Snick . Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 2006; 36:2868-2874.
177. van Beelen, Zelinkova, Taanman-Kueter, Muller, Hommes, Zaat, Kapsenberg, de Jong. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 2007;27:660-669.
178. Vanderheyde, Verhasselt, Goldman, Willems. Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. *Transplantation.* 1999; 67: 1342-47.
179. Vanderlugt i Miller. Epitope spreading. *Curr. Opin.Immunol.* 1996;8:831–836.

180. Wang, Müller, McPherson, Reichardt. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 1695–1702.
181. Weaver , Hatton, Mangan, Harrington: IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-852.
182. Wei, Wei, Zhu, Zang, Hu-Li, Yao, Cui, Kanno, Roh, Watford, Schones, Peng, Sun, Paul, O'Shea,Zhao K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity.* 2009;30:155-67.
183. Whitacre i Paterson. Transfer of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats using supernates of incubated sensitized lymph node cells. *J Exp Med.* 1977;145:1405-10.
184. Wilson, Boniface, Chan, McKenzie, Blumenschein, Mattson, Basham, Smith, Chen, Morel, Lecron, Kastelein, Cua, McClanahan, Bowman, de Waal Malefyt. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunol.* 2007;8:950-957.
185. Witowski, Pawlaczyk, Breborowicz, Scheuren, Kuzlan-Pawlaczyk, Wisniewska, Polubinska, Friess, Gahl, Frei, Jörres. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol.* 2000;165:5814-21.
186. Wong, Ho, Li, Lam. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000; 9: 589-593.
187. Wüst, van den Brandt, Tischner, Kleiman, Tuckermann, Gold Lühder, Reichardt. Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008;180:8434-43.
188. Xie, Whisnant, Nathan. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1993;177:1779-84.

189. Yamazaki, Iyoda, Tarbell, Olson, Velinzon, Inaba, Steinman. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003.
190. Yang, Merćep, Ware, Ashwell. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med*. 1995;181:1673-82.
191. Yang, Nurieva, Martinez, Kang, Chung, Pappu, Shah, Chang, Schluns, Watowich, Feng, Jetten, Dong. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29:44-56.
192. Yang, Pappu, Nurieva, Akimzhanov, Kang, Chung, Ma, Shah, Panopoulos, Schluns, Watowich, Tian, Jetten, Dong. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008;28:29-39.
193. Yao, Fanslow, Seldin, Rousseau, Painter, Comeau, Cohen, Spriggs. Herepesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to novel cytokine receptor. *Immunity*. 1995; 3:811-821.
194. Ye, Rodriguez, Kanaly, Stocking, Schurr, Schwarzenberger, Oliver, Huang, Zhang, Zhang, Shellito, Bagby, Nelson, Charrier, Peschon, Kolls. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001;194:519–527.
195. Yu, Wei, Stanford, Schmidt, Hong. In vitro effects of RU486 on proliferation and differentiation capabilities of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Steroids*. 2012;77:132-7.
196. Zamvil i Steinman. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:579-6210.
197. Zen, Canova, Campana, Bettio, Nalotto, Rampudda M, Ramonda, Iaccarino, Doria. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*. 2011;10:305-10.
198. Zhou, Li, Sheng, Liu, Li, Wang, Zhou, Jing, Chen, Jiang. A novel strategy for development of glucocorticoids through non-genomic mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:1405-14.

199. Zipp, Wendling, Beyer, Grieger, Waiczies, Wagenknecht, Haas Weller. Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J Neuroimmunol.* 2000;110:214-22.

BIOGRAFIJA

Dr Željka Stanojević (Miljković) rođena je 10.10.1979. u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1998/99 a diplomirala 2005 godine sa prosečnom ocenom 9.00. Još kao student dr Stanojević, učestvuje u naučno-istraživačkom radu iz čega proizilaze radovi prezentovani na studentskim kongresima u zemlji i inostranstvu. Specijalističko-akademske studije iz oblasti Imunologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala školske 2005/06 godine. Specijalističko-akademski rad iz Imunologije pod nazivom "Mogućnosti i ograničenja eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kao modela za proučavanje multiple skleroze" odbranila 23.02.2007. godine pred komisijom u sastavu: Prof. Dr Zorica Ramić-predsednik komisije, Prof. Dr Jelena Drulović i Prof. Dr Marija Mostarica-Stojković-mentor. Od februara 2009. godine zaposlena je na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi a 1.04.2011. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Medicinska i klinička biohemija. Pohađala European School of Neuroimmunology (ESNI) Oxford -Engleska. U periodu od 2005-2010. godine Dr Stanojević je bila saradnik na projektu Ministarstva nauke Republike Srbije br. 145066: "Mehanizmi urođene i stečene imunosti u autoimunskim bolestima i infekciji". Takođe, od 2009. do 2010. godine bila je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj 145058: "Molekularni mehanizmi regulacije ćelijske smrti u fiziološkim i patološkim uslovima". Od 2011. godine Dr Željka Stanojević je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije broj III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske bilans u terapiji tumora i neuro-imuno-enokrinih poremećaja“ kao i na projektu broj III 45016: „Generisanje i karakterizacija nanofotonskih struktura u biomedicini i informatici“. Autor je brojnih naučno istraživačkih radova od kojih je 8 publikovano u časopisima koji su indeksirani u *Current Contents*-u (CC).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Želka Stanojević

Broj upisa 06-DS-MM-6

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Uticaj Metilprednizolona na ekspresiju i produkciju interferona- γ i IL-17 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu”

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 22.06.2012

Ž. Stanojević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Željka Stanojević

Broj upisa 06-DS-MM-6

Studijski program _____

Naslov rada „Uticaj Metilprednizolona na ekspresiju i produkciju interferona- γ i IL-17 u eksperimenta-lnom autoimunskom encefalomijelitisu”

Mentor: prof. dr Marija Mostarica-Stojković

Potpisani Željka Stanojević

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

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 22.06.2012

Ž. Stanojević

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Uticaj Metilprednizolona na ekspresiju i produkciju interferona- γ i IL-17 u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 22.06.2012

Z. Stanojević