



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



др Милош С. Костић

**Интеракција Th-17 имунског одговора и
глутаматске екситотоксичности у патогенези
мултипле склерозе – клиничка и
експериментална студија**

Докторска дисертација

У Нишу, 2014



UNIVERSITY OF NIŠ
MEDICAL FACULTY



MD Miloš S. Kostić

**Interaction Between Th-17 Immune Response and
Glutamate Excitotoxicity in the Pathogenesis of
Multiple Sclerosis – Clinical and Experimental
Study**

PhD Thesis

Niš, 2014



Ментор: **Академик проф. др Миодраг Чолић,**
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
Универзитет Одбране у Београду, Медицински факултет

Чланови комисије: **Проф. др Ивана Стојановић** - председник,
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Академик проф. др Миодраг Чолић – ментор и члан,
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
Универзитет Одбране у Београду, Медицински факултет

Проф. др Слободан Војиновић – члан,
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Проф. др Горан Марјановић – члан,
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Проф. др Драгана Обрадовић – члан,
Универзитет Одбране у Београду, Медицински факултет

Датум одбране: _____ 2014. године



I Аутор	
Име и презиме:	Милош Костић
Датум и место рођења:	20. новембар 1982, Ниш
Садашње запослење:	Сарадник у настави на Медицинском факултету Универзитета у Нишу

II Докторска дисертација	
Наслов:	Интеракција Th-17 имунског одговора и глутаматске екситотоксичности у патогенези мултипле склерозе – клиничка и експериментална студија
Ментор:	Академик проф. др Миодраг Чолић
Број страница:	119
Број слика:	9
Број табела:	3
Број графикона:	15
Број библиографских навода:	239
Установе где је рад изведен:	- Клиника за неурологију Клиничког Центра у Нишу, - Клиника за урологију Клиничког Центра у Нишу, - Центар за биомедицинска истраживања Медицинског факултета Универзитета у Нишу, - Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду.
Научна област:	Медицинске науке – УНО Имунологија
УДК број:	616.831-005

III Оцена и одбрана	
Број решења и датум одобрења теме за израду докторске тезе:	21.05.2014. год. (бр.04-ММ-50/08)
Комисија за оцену подобности теме докторске тезе и кандидата:	- Проф. др Ивана Стојановић, председник комисије - Академик проф. др Миодраг Чолић, ментор и члан - Проф. др Слободан Војиновић, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске тезе:	- Проф. др Ивана Стојановић, председник комисије - Академик проф. др Миодраг Чолић, ментор и члан - Проф. др Слободан Војиновић, члан - Проф. др Горан Марјановић, члан - Проф. др Драгана Обрадовић, члан из Београда



Посебну захвалност дугујем.

Свом ментору, академику проф. др Миодрагу Чолићу и проф. др Војину Савићу, изузетним људима и стручњацима који су ме увели у свет имунологије и научили ме чему треба тежити. Несебична помоћ, разумевање и стрпљење ових људи је била права инспирација због чега им се од срца захваљујем.

Проф. др Ивани Стојановић, на огромној количи одвојеног времена, срдечној помоћи и непроцењивим консултацијама које су ми указале на пут креативности и инвентивности у науци на чему сам јој посебно захванан. Сарадња са проф. Стојановић је била право задовољство, подстрек и надахнуће за будући рад.

Проф. др Горану Марјановићу и проф. др Слободану Војиновићу на подршци, саветима из домена њиховог клиничког рада и помоћи у интерпретацији резултата из клиничког дела ове студије.

Део експерименталне студије је спроведен на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду. Желео бих да се захвалим стручном особљу и посебно др Ђорђу Миљковићу на сарадњи и љубазности као и Славољубу Живановићу из Центра за биомедицинска истраживања Медицинског факултета у Нишу.

Посебну захвалност дугујем и проф. др Душици Павловић, шефу пројекта бр. 41018, без које овај рад неби био могућ, као и својој породици, сестри Емилији и родитељима Слободану и Весни.

др Милош Костић

У Нишу, јули 2014



Интеракција Th-17 имунског одговора и глутаматске екситотоксичности у патогенези мултипле склерозе – клиничка и експериментална студија

Резиме:

Увод: Мултипла склероза (МС) је хронично демиелинизирајуће обољење централног нервног система (ЦНС), које се карактерише епизодним јављањем неуролошких дефеката, који су дисеминовани у времену и неуроанатомској локализацији. Централно место у настанку свих инфламацијских дешавања у МС се данас приписује аутореактивним, мијелин-специфичним CD4⁺ Т лимфоцитима, за које се сматра да регулишу све имунолошке механизме који доводе до оштећења мијелинског омотача неурона. Првобитно је сматрано да ове ћелије припадају популацији Th-1 ћелија, међутим бројна истраживања данас указују на значај Th-17 ћелија у настанку ове болести. Поред демиелинизације која се и даље сматра основном патолошком карактеристиком болести, последњих неколико година посебна пажња у истраживању МС се придаје неуродегенеративним променама, обзиром да је показано да су клинички симптоми болести у директној вези са степеном оштећења и губитка аксонских наставка неурона. Од недавно, глутаматска екситотоксичност се разматра као могући механизам настанка неуродегенерације у МС. То је феномен који настаје када екситацијски неуротрансмитер, глутамат у повећаним концентрацијама, претерано активира своје рецепторе на мембранама неурона и олигодендроцита, што доводи до унутарћелијске акумулације јона Ca²⁺ и последичне смрти ових ћелија.

Циљ истраживања: Испитати повезаност инфламације, посредоване Th-17 ћелијама, и глутаматске екситотоксичности током развоја МС. Утврдити потенцијалне молекулске механизме којима инфламација стимулише глутаматску екситотоксичност и последичну неуродегенерацију са посебним освртом на улогу астроцита.

Материјал и методе: Истраживање је спроведено из два интегрална дела: клиничког, на хуманом материјалу и експерименталног дела на примарној ћелијској култури астроцита пацова. Клинички део истраживања је обухватио укупно 79 испитаника, који су разврстани у две групе: контролна група и група пацијената оболелих од МС.



Присуство Th-17 ћелија у ЦНС испитаника је праћено одређивањем нивоа IL-17A у цереброспиналној (ЦС) течности, ELISA (енг. *Enzyme ImmunoSorbent Assay*) методом; док су ексцитотоксични процеси праћени одређивањем нивоа глутамата HPLC (енг. *High Performance Liquid Chromatography*) методом. Експериментални део истраживања је спроведен на примарној култури астроцита пацова. У циљу испитивања ефеката IL-17A на способност астроцита да преузимају и метаболишу глутамат, културе астроцита су стимулисане растућим концентрацијама рекомбинантног пацовског протеина IL-17A, након чега су прикупљене и коришћене за анализу експресије гена за глутаматске транспортере (GLAST и GLT-1) и ензим глутамин синтетазу, PCR (енг. *Polymerase Chain Reaction*) методом. Испитивање ефеката IL-17A на способност астроцита да врше ослобађање глутамата је спроведено у базалним условима и у условима повишеног и сниженог ванћелијског Ca^{2+} . Ћелијске културе астроцита су стимулисане одговарајућим концентрацијама рекомбинантног пацовског протеина IL-17A, након чега су праћени његови ефекти на глутаматску секрецију одређивањем нивоа глутамата у ћелијским супернатантима HPLC методом.

Резултати: Пацијенти оболели од МС су имали значајно већи ниво IL-17A у ЦС течности у односу на контролне испитанике ($P < 0,005$), који је био у директној вези са нивоом глутамата ($r_s = 0,368$; $P < 0,05$). Ниво IL-17A је такође био директно повезан са бројем неутрофила у ЦС течности ($r_s = 0,426$; $P < 0,05$), поремећајем пропустљивости крвно-мождане баријере ($r_s = 0,440$; $P < 0,05$), док је негативно корелирао са дужином трајања болести ($r_s = -0,466$; $P < 0,01$). У експерименталном делу истраживања је показано да IL-17A у нижим концентрацијама (10, 25, 50 ng/mL) смањује степен испољености гена за глутаматске транспортере и ензим глутамин синтетазу у астроцитима, међутим овај ефекат изостаје када се IL-17A примени у већој дози (100 ng/mL). Интерлеукин 17A није значајно мењао секрецију глутамата у базалним условима, међутим након стимулације астроцита јонима Ca^{2+} и након уклањања Ca^{2+} из култивационог медијума, IL-17A на дозно зависан начин стимулише астроците на ослобађање глутамата.

Закључци: Интерлеукин 17A има значајну улогу у комплексној мрежи проинфламацијских медијатора који посредују у патогенези МС. По први пут је сугерисана повезаност Th-17 имунског одговора и глутаматске ексцитотоксичности, која би могла бити недостајућа карика између инфламацијских и неуродегенеративних процеса у МС. Поред тога, идентификована су три механизма којима би IL-17A,



посредством астроцита, могао стимулирати пораст ванћелијског глутамата и последична ексцитотоксична оштећења. Нађено је да IL-17A умањује способност астроцита да преузимају а затим и метаболишу глутамат; такође је показано да IL-17A стимулише Ca²⁺ зависни пут ослобађања глутамата из астроцита.

Кључне речи: мултипла склероза, Th-17 ћелије, глутамат, ексцитотоксичност, инфламација, неуродегенерација, глутаматски транспортери, глутамин синтетаза.

Научна област: Медицинске науке

Ужа научна област: Имунологија

УДК број: 616.831-005



Interaction Between Th-17 Immune Response and Glutamate Excitotoxicity in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis – Clinical and Experimental Study

Summary:

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS) characterized by episodic neurological defects, disseminated in time and neuroanatomical localization. The central role in the development of inflammatory mediated lesions in MS is now attributed to autoreactive, myelin-specific CD4⁺ T lymphocytes, which are thought to regulate all immune mechanisms that lead to the myelin sheath damage. It was originally thought that these cells belong to the subpopulation of Th-1 cells, however, a number of nowadays studies indicate the importance Th-17 cells in the pathogenesis of the disease. In addition to demyelination, which is still considered to be the main pathological feature of the disease, in the last few years special attention in MS research has been given to neurodegenerative processes, considering that it has been shown that the clinical symptoms of the disease are directly related to the degree of axonal damage and loss. Recently, glutamate excitotoxicity is considered as a possible mechanism of neurodegeneration in MS. This is a phenomenon that occurs when the excessive amount of excitatory neurotransmitter glutamate, overactivates its receptors on the membranes of neurons and oligodendrocytes, which leads to the intracellular accumulation of Ca²⁺ ions and the consequent cell death.

Aims of the Thesis: To examine the association of Th-17 mediated inflammation and glutamate excitotoxicity in the development of MS. To determine the potential molecular mechanisms by which inflammation stimulates glutamate excitotoxicity and the consequent neurodegeneration with special emphasis on the role of astrocytes.

Materials and Methods: The study had two integral parts: a clinical part conducted on the human material and experimental part conducted on the primary cultures of rat astrocytes. The clinical study enrolled 79 patients, divided into two groups: a control group and a group of MS patients. The presence of a Th-17 cells in the CNS of the studied subjects was monitored by IL-17A levels in the cerebrospinal fluid (CSF) determined by ELISA (*Enzyme Immunosorbent Assay*) method; while glutamate level was used to estimate excitotoxic damage by HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) method. The experimental



study was carried out on the primary cultures of rat astrocytes. In order to investigate the effects of IL-17A on astrocyte ability to uptake and metabolize glutamate, cell cultures were stimulated with increasing concentrations of recombinant rat IL-17A protein, and then used for gene expression analysis of glutamate transporter (GLAST and GLT-1) and the enzyme glutamine synthetase, by PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Investigation of IL-17A effect on astrocyte ability to release glutamate, was conducted in basal conditions and under conditions of elevated and reduced extracellular Ca^{2+} . Astrocyte cultures were stimulated with the rising concentrations of recombinant rat IL-17A protein, and then glutamate secretion was followed up by the level of glutamate in the cell supernatants by HPLC.

Results: Patients suffering from MS had a significantly higher level of IL-17A in the CSF compared to the control subjects ($P < 0.005$), which was directly related to the level of glutamate ($r_s = 0.368$, $P < 0.05$). The level of IL-17A was also directly related to the number of neutrophils in the CSF ($r_s = 0.426$, $P < 0.05$) and blood-brain barrier disruption ($r_s = 0.440$, $P < 0.05$), whereas a negative correlation between CSF IL-17A level and disease duration was observed ($r_s = -0.466$, $P < 0.01$). In the experimental study it has been shown that IL-17A in lower concentrations (10, 25, 50 ng/mL) reduces glutamate transporter and glutamine synthetase gene expression in astrocytes, however, this effect was lost when IL-17A was used in higher dose (100 ng/mL). IL-17A did not significantly modify glutamate secretion in basal conditions, but following Ca^{2+} stimulation, and after Ca^{2+} removal from culture medium, IL-17A stimulated glutamate release from astrocytes in dose-dependent manner.

Conclusions: IL-17A plays an important role in the complex cytokine network that mediates MS pathogenesis. For the first time direct relationship between Th-17 immune response and glutamate excitotoxicity is reported, which could be a missing link between inflammatory and neurodegenerative processes in MS. Three mechanisms by which IL-17A stimulates extracellular glutamate increase to excitotoxic levels are postulated. Firstly, IL-17A reduces astrocyte ability to uptake and metabolize glutamate and in addition IL-17A also stimulates Ca^{2+} dependent glutamate release from astrocytes.

Keywords: multiple sclerosis, Th-17 cells, glutamate excitotoxicity, inflammation, neurodegeneration, glutamate transporters, glutamine synthetase.

Scientific field: Medical sciences

Field of scientific expertise: Immunology

UDK number: 616831-005



Садржај

1	УВОД	13
1.1	Мултипла склероза	14
1.1.1	Епидемиолошке карактеристике	14
1.1.2	Етиологија.....	14
1.1.3	Патогенеза	16
1.1.4	Клиничка слика	17
1.1.5	Дијагностика.....	20
1.1.6	Терапија	21
1.2	Имунске основе демјелинизације у мултиплој склерози	22
1.2.1	Антигени које мијелин-специфични CD4 ⁺ Т лимфоцити препознају	23
1.2.2	Активација мијелин-специфичних CD4 ⁺ Т лимфоцита.....	25
1.2.3	Миграција мијелин-специфичних CD4 ⁺ Т лимфоцита у централни нервни систем	27
1.2.4	Диференцијација мијелин-специфичних CD4 ⁺ Т лимфоцита у ефекторске ћелије	29
1.3	Глутаматска ексцитотоксичност и неуродегенеративне промене у мултиплој склерози	32
1.3.1	Узрок повећаног нивоа глутамата у МС	33
1.3.2	Глутаматски рецептори у МС	35
1.3.3	Глутаматски транспортери у МС.....	36
1.3.4	Поремећаји ензима укључених у метаболизам глутамата у МС	38
2	РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ.....	40
3	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	42
4	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	44
4.1	Коришћени реагенси.....	45
4.1.1	Медијими, пуфери и супстанце коришћене у култивисању и третирању ћелијске културе астроцита пацова	45
4.1.2	Антитела и раствори коришћени у имунохистохемијској анализи ћелијске културе астроцита	46
4.1.3	Комплети и граничници („прајмери“) коришћени у анализи генске експресије..	47
4.1.4	Комплети коришћени за одређивање концентрације IL-17A	48
4.1.5	Реагенси коришћени за одређивање концентрације глутамата	49
4.2	Клинички део истраживања	50
4.2.1	Пацијенти и клинички материјал	50



4.2.2	Методe.....	51
4.3	Експериментални део истраживања.....	54
4.3.1	Материјал.....	54
4.3.2	Методe.....	55
4.4	Статистичка обрада података.....	58
5	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	58
5.1	Клинички део истраживања.....	60
5.1.1	Анализа медицинске документације.....	60
5.1.2	Одређивање нивоа IL-17A у ЦС течности.....	61
5.1.3	Одређивање нивоа глутамата у ЦС течности.....	61
5.1.4	Компаративне анализе.....	62
5.2	Експериментални део истраживања.....	66
5.2.1	Испитивање хомогености културе астроцита пацова.....	66
5.2.2	Испитивање способности астроцита да преузимају глутамат	67
5.2.3	Испитивање способности астроцита да метаболишу глутамат	68
5.2.4	Испитивање способности астроцита да секретују глутамат	69
6	ДИСКУСИЈА.....	73
6.1	Пацијенти оболели од МС имају повишен ниво IL-17A у ЦС течности	74
6.2	Ниво IL-17A је у директној вези са нивоом глутамата у ЦС течности пацијената оболелих од МС	79
6.3	Интерлеукин 17A смањује преузимање и метаболизам глутамата у астроцитима	83
6.4	Интерлеукин 17A стимулише егзоцитозу глутамата из астроцита.....	86
7	ЗАКЉУЧАК.....	90
8	ЛИТЕРАТУРА.....	93
9	БИОГРАФИЈА АУТОРА	114
10	ИЗЈАВЕ АУТОРА	116
10.1	Изјава о ауторству.....	117
10.2	Изјава о истовестности штампане и електронске верзије доктората.....	118
10.3	Изјава о коришћењу.....	119

1 Увод



1.1 Мултипла склероза

Мултипла склероза (МС) је хронично демиелинизирајуће обољење централног нервног система (ЦНС) које се карактерише епизодним јављањем неуролошких дефеката, који су дисеминовани у времену и неуроанатомској локализацији (Manji и сар. 2009).

1.1.1 Епидемиолошке карактеристике

Процењује се да данас у свету од МС болује око 2-2,5 милиона људи. Болест се обично јавља у трећој и четвртој декади живота са пиком у 30-ој години, и два пута је чешћа у женској популацији. Епидемиолошки подаци указују да је МС, данас водећи узрок нетрауматске физичке неспособности млађих људи, што заједно са релативно високом преваленцом ове болести, чини МС великим социоекономским проблемом модерног доба (Milo и Kahana 2010). Према подацима из 2011. године преваленца МС у нашој земљи, за регион Централне Србије, износи 65 случајева на 100 000 становника, што су вредности које су у оквирима европског просека (Toncev и сар. 2011).

1.1.2 Етиологија

Мултипла склероза спада у групу обољења чији је прави узрок још увек непознат. Сматра се да настаје у особа специфичне генске конституције под дејством одређених, декланширајућих фактора спољашње средине. Иако МС није херeditарно обољење у ужем смислу те речи, извесне генске варијације ипак увећавају ризик за настанак болести. Тако, се генетска предиспозиција за настанак МС, већ задњих 30 година, везује за одређене молекуле главног комплекса ткивне подударности (енг. *Human Leukocyte Antigens*, HLA) II класе, и то HLA-DR15 и HLA-DQ6. И поред бројних хипотеза тачан механизам којим ови HLA молекули доприносе настанку болести је још увек неразјашњен (Dhib-Jalbut и сар. 2013, Sospedra и Martin 2005). Напретком техника молекуларне биологије



идентификовани су и други генски алели, ван HLA локуса, који су повезани са МС, и они се углавном односе на α ланац рецептора за цитокине IL-7 и IL-2, међутим о значењу овог открића се и даље спекулише (Consortium 2007).

Епидемиолошке студије указују да фактори спољашње средине могу имати изванредан значај у настанку МС, имајући у виду неједнаку географску дистрибуцију болести, која је знатно чешћа у областима удаљених од екватора (Milo и Kahana 2010). Овакву варијацију у распрострањености болести могу објаснити географске разлике у степену изложености сунчевом зрачењу. Наиме, мања експозиција ултравиолетном зрачењу сунца, условљава слабију продукцију витамина Д у кожи, за кога се верује да има протективне ефекте деловања (Ascherio и Munger 2007b). Инфективни агенси су друга група суспектних фактора спољашње средине који се доводе у везу са МС преко тзв. хигијенске и превалентне хипотезе. Према хигијенској теорији, контакт са одређеним агенсом у детињству делује протективно, док сусрет у каснијој доби доприноси настанку болести, због разлика у имунском одговору деце и одраслих. У прилог овој теорији говори чињеница да је МС заступљенија у високо развијеним земљама, где су хигијенски услови напреднији, и где деца немају контакта са различитим инфективним агенсима као што је то случај у неразвијеним земљама. Превалентна теорија има мање присталица. По овој теорији, МС се чешће јавља у областима у којима је заступљенија инфекција одређеним агенсом, која протиче асимптоматски али модулира имунски систем домаћина у правцу настанка аутоимуности (Ascherio и Munger 2007a). Од инфективних фактора, бројни, претежно вирусни агенси се доводе у везу са МС и то се првенствено односи на инфекцију изазвану Епштајн-Баровим вирусом, али и другим врстама херпес вируса као што су Варицела-Зостер вирус, Хумани Херпес вирус 6 као и инфекцију одређеним интрацелуларним бактеријама из рода Хламидија и Микоплазма (Siddharama и Subramaniam 2010). Иако су многи вируси испитивани, а и даље се истражују као потенцијални узрочници МС, још увек не постоји дефинитивни доказ да један вирус може да проузрокује целокупну патологију која је присутна у МС.



1.1.3 Патогенеза

Поред етиологије болести која је и даље у домену хипотеза, патогенетски механизми настанка органског супстрата МС – плакова демиелинизације су такође неразјашњени. Преовладавајући став је да МС представља аутоимунски поремећај у коме аутореактивни Т лимфоцити специфично препознају компоненте мијелинског омотача неурона и покрећу инфламацијски одговор који доводи до оштећења можданог ткива у виду плакова (Sospedra и Martin 2005). Плакови су промене карактеристичне за МС, у којима су евидентни процеси губитка мијелинског омотача – демиелинизацијски процеси, али такође и процеси одумирања и губитка аксона – неуродегенеративни процеси. Хистопатолошки, плак је формација најчешће овалног облика, која се пружа дуж централно постављеног крвног суда, око кога се уочава запаљенски инфилтрат састављен претежно од макрофага, CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, док су $\gamma\delta$ Т лимфоцити, Б лимфоцити, ћелије природне убице и мастоцити присутни, али у знатно мањем броју (Вø и сар. 2012). У зависности од интензитета инфламацијских дешавања и типа ћелијског инфилтрата, плакови демиелинизације се деле на акутне и хроничне, који могу бити активни и неактивни. У акутним плаковима постоји обимна инфилтрација макрофага на целокупној површини лезије, док у хроничним активним плаковима, који су уједно и најчешћи тип лезија у мозгу, инфилтрат макрофага је присутан само на рубовима лезије (van der Valk и De Groot 2000). Детаљније имунохистохемијске анализе су показале значајну хетерогеност акутних плакова демиелинизације, на основу чега су описана четири основна образаца демиелинизације. Инфилтрат Т лимфоцита и макрофага је присутан у свим образцима међутим, најизраженији је у првом, због чега се сматра да је демиелинизација у овом образцу управо посредована Т ћелијама. Други образац демиелинизације је сличног хистопатолошког изгледа, с'тим што је присутна наглашена активација комплемента што указује на значај антитела у настанку лезија овог типа. За разлику од осталих, трећи образац демиелинизације се не развија периваскуларно, и карактерише се израженим губитком олигодендроцита који захвата и наизглед неизмењену белу масу мозга. У четвртом образцу губитак олигодендроцита је везан за уску зону око граница лезије и сматра се последицом примарне дегенерације олигодендроглије. Интересантно је да све активне лезије



једног болесника припадају истом образцу демиелинизације (Lucchinetti и сар. 2000). У кичменој мождини, преовладавају лезије типа хроничних неактивних плакова, у којима је инфилтрат макрофага оскудан или у потпуности одсутан (van der Valk и De Groot 2000). Ремијелинизацијски процеси поновног стварања мијелинског омотача, су такође могући у плаковима демиелинизације. Јављају се рано током процеса формирања плакова, углавном у лезијама са првим и другим образцем демиелинизације. У хроничним лезијама овај феномен је непотпун или у потпуности одсутан. Прекурсорне ћелије олигодендроцита, које су и даље присутне у адултном ЦНС, су одговорне за процесе ремијелинизације, међутим дебљина новонасталог мијелина се никада не може реституисати до првобитног нивоа, због чега је кондуктивност нервних импулса увек мање брзине у ремијелинизованим областима. Репарирани мијелински омотач, поред тога што се разликује од првобитног омотача у дебљини, разликује се и по саставу, јер у себи садржи извесне аберантне протеине за које се сматра да су функционално инсуфицијентни и вулнерабилнији на инфламацију (Chari 2007).

1.1.4 Клиничка слика

Плакови демиелинизације условљавају клиничке симптоме којима ће се МС испољити. У раном стадијуму болести, плакови се могу спонтано санирати и поново појављивати, што условљава дисеминацију клиничких симптома у времену. Такође, плакови се могу појављивати на различитим местима у мозгу и кичменој мождини што условљава дисеминацију симптома у неуроанатомској локализацији. Од локализације плакова зависи клиничка слика којом се болест манифестује. Најчешће су захваћени оптички нерв, перивентрикуларне регије, мождано стабло, мали мозак и вратни део кичмене мождине. Сходно томе, клинички симптоми МС су изузетно хетерогени и обухватају широк спектар моторних, сензитивних, визуелних манифестација, као и знакова оштећења малог мозга и можданог стабла. Најчешћи иницијални симптоми МС се јављају услед развоја демиелинизацијских промена на оптичком пута и у виду су редуковане оштрине вида, оштећења колорног вида, као и поремећаја у видном пољу. Моторни симптоми произилазе из захваћености кортикоспиналног и кортикобулбарног тракта, церебеларних и

сензитивних путева и претежно су у виду слабости и спастицитета који се могу јавити у сва четири екстремитета. Поремећаји сензибилитета су такође доста чести, и могу бити у било којој анатомској дистрибуцији и са било којом комбинацијом оштећења сензибилитета за бол, температуру, фини додир и поремећаја вибрационог и дубоког положајног сензибилитета. Оболели обично имају субјективне сензације у виду парестезија, хипер/хипоестезија а карактеристичан је Лермитеов (енг. *Lhermitte*) знак кога пацијенти описују као осећај „електрицитета” који се спушта низ леђа и ногу, након флексије врата. Поремећаји који настају као последица оштећења малог мозга се манифестују атаксијом хода, трупа, екстремитета, окуларном и булбарном атаксијом, као и интенционим тремором. Клинички, симптоми и знаци оштећења можданог стабла се презентују поремећајима очних покрета, сензибилитета, слабошћу мимичке мускулатуре, вртоглавицама, сметњама слуха, дизартријом и дисфагијом. Често су присутни и когнитивни поремећаји у виду поремећаја пажње, брзине обраде информација, афективно понашање и депресија, док поремећаји функције мокраћне бешике и црева су међу најонеспособљавајућим карактеристикама МС (Слика 1.) (Compston и Coles 2008).

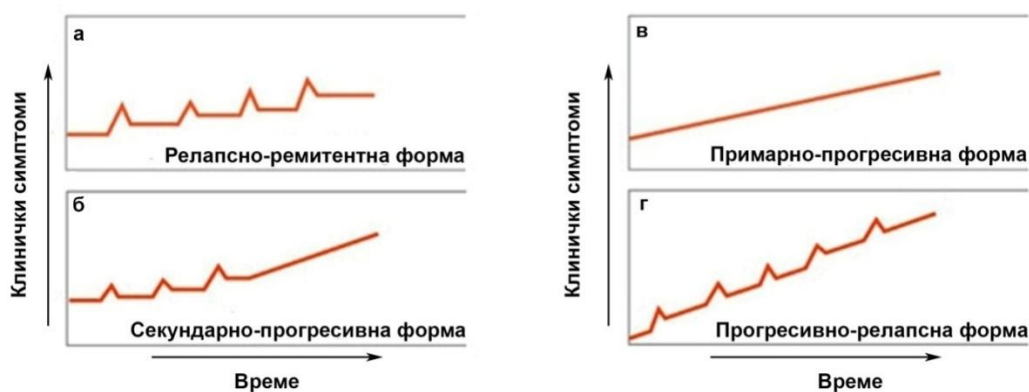


Слика 1. Клиничка презентација МС

У зависности од клиничког тока болести разликују се четири основне форме МС (Lublin и Reingold 1996).

Највећи број пацијената (око 85%) развија *релапсно-ремитентну форму* болести у којој се смењују периоди релапса и ремисије (Слика 2.а). Период релапса се карактерише појављивањем нових или погоршањем старих, већ присутних симптома, док ремисија подразумева период опоравка, у коме су симптоми блажи или уопштности одсутни. Релапси се могу разликовати у тежини клиничке презентације, као и у дужини трајања што исто важи и за периоде ремисије који могу трајати по неколико месеци па и година.

Највећи број пацијената са релапсно-ремитентном формом болести временом развија *секундарно-прогресивну форму* у којој постоји прогресивно погоршање клиничких симптома, без јасно препознатљивих периода ремисије (Слика 2.б). Процењује се да око 65% пацијената са релапсно-ремитентном формом у првих 15 година болести развија секундарно-прогресивни тип МС (Koch и сар. 2008).



Слика 2. Клиничке форме МС

Следећи значајан тип болести је *примарно-прогресивна форма* у којој се иницијални клинички симптоми болести стално погоршавају без јасних периода ремисије (Слика 2.в). Овај тип МС се јавља у око 15% пацијената оболелих од МС, и за разлику од претходних, чешћи је у мушкој популацији (Miller и Leary 2007).

Најређи клинички тип МС је *прогресивно-релапсна форма* у којој постоји прогресивно погоршање почетних клиничких симптома болести, међутим, и поред тога могу се идентификовати периоди релапса (Слика 2.г) (Lublin и Reingold 1999).



1.1.5 Дијагностика

Дијагностички критеријуми за МС обухватају бројна клиничка испитивања која се спроводе у циљу доказивања плакова демиелинизације и њихове дисеминације у времену и простору.

Табела 1. McDonald дијагностички критеријуми за МС

Број напада	Број лезија	Додатни критеријуми
2 или више напада	Објективни клинички знаци 2 или више лезија	Нису потребни
2 или више напада	Објективни клинички знаци 1 лезије	Дисеминација лезија у простору доказана НМР техником*
1 напад	Објективни клинички знаци 2 или више лезија	Дисеминација лезија у времену доказана НМР техником**
1 напад	Објективни клинички знаци 1 лезије	Дисеминација лезија у простору и времену доказана НМР техником
нема напада, прогресија од почетка болести		Болест је у прогресији дуже од 1 године и испуњена су 2 од 3 наведена критеријума: 1. Дисеминација лезија у времену, у мозгу 2. Дисеминација лезија у времену, у кичменој мождини 3. Позитивна цереброспинална течност на олигоклонске траке

*Дисеминација лезија у простору доказана НМР, подразумева присуство једне или више лезија у бар две од четири типичне МС локализације у ЦНС: перивентрикуларно, јукстакортикално, инфратенторијално или у кичменој мождини.

**Дисеминација лезија у времену се односи на детекцију симултаних асимптоматских лезија од којих једна везује, а друга не везује гадолинијум или откриће нове лезије током контролног НМР.

Иако се дијагноза МС може поставити само на основу клиничке презентације, радиолошке (енг. *Neuroimaging*) методе као што су нуклеарна магнетна резонанца (НМР) и извесне лабораторијске претраге нпр. детекција олигоклонских трака у цереброспиналној (ЦС) течности пацијената, умногоме олакшавају и убрзавају процес дијагностике. То је од посебног значаја јер омогућава благовремени почетак лечења пацијента и примену адекватног терапијског протокола. Посебан напредак у дијагностици и истраживању МС је постигнут развојем НМР, обзиром да ова метода, омогућава неинвазивну



визуелизацију демијелинизацијских лезија у мозгу и кичменој мождини пацијената. Осим тога, интравенска примена контрастног средства, гадолинијума 5-10 минута пре снимања, омогућава разликовање активних плакова демијелинизације, који везују контраст, од неактивних плакова у којима то није случај (Тас и сар. 1995).

Данас се у дијагностици МС примењују *McDonald* дијагностички критеријуми ревидирани 2010. године, који у обзир узимају број напада, клиничке знаке лезија, налазе НМР мозга/кичмене мождине и изоелектрично фокусирање ЦС течности (*Табела 1.*) (Polman и сар. 2011). Процењује се да је применом ових критеријума у свакодневној пракси умногоме поједностављена и убрзана дијагностика МС, док је истовремено унапређена дијагностичка сензитивност и специфичност у односу на до сада коришћене дијагностичке протоколе (Patrusso и сар. 2013).

1.1.6 Терапија

Имајући у виду, недовољно познату етиопатогенезу, хетерогеност клиничких манифестација и значајне индивидуалне варијације у терапијском одговору, ефикасно лечење МС је прави изазов. И поред бројних клиничких студија које се баве испитивањем терапијских могућности ове болести, Америчка агенција за храну и лекове (енг. *Food and Drug Agency, FDA*) је до сада званично одобрила употребу свега 8 препарата (Pappas и Oksenberg 2010). Данашњи терапијски приступ у МС зависи од фазе болести. Тако се интравенска примена „пулсних” доза кортикостероида, пре свега метилпреднизолонa сматра златним стандардом лечења релапса МС, због његових биолошких ефеката који обухватају опоравак функције крвно-мождане баријере, антиинфламацијска и имуномодулаторна својства. Уколико оваква терапијска стратегија не доведе до побољшања препоручује се примена плазмаферезе (терапијска измена плазме), међутим у пракси се употребљавају и други имуносупресивни лекови, циклоспорина, циклофосамида, микофенолат-мофетила, азатиоприма чија ефикасност још увек није дефинитивно потврђена на већим клиничким студијама. Имајући у виду да је број релапса у прве две године МС, фактор који указује на неповољни клинички ток болести и развој тешке онеспособљености болесника, у



терапији МС се користе и тзв. лекови који модификују природни ток болести са циљем продужења периода ремисије и редукције броја релапса. Лекови прве терапијске линије овог типа су интерферон- β 1а и 1б, и глатирамер ацетат. Обзиром, да ови препарати не дају повољне резултате код свих болесника, данас се примењују и лекови друге терапијске линије, где спада митоксантрон, финголимод, диметил фумарат, терифлуномид, и моноклонско антитело натализумаб (Loma и Neuman 2011).

Сви тренутно актуелни терапијски протоколи који се примењују у лечењу МС, не поправљају оштећења која су настала, већ само помажу у контроли болести и на тај начин побољшавају квалитет живота ових пацијената. Да би се креирала дефинитивна ефикасна терапија, неопходно је боље познавање етиологије и патогенетских механизма ове изузетно комплексне болести, како би се идентификовала нова циљна места терапијског деловања.

1.2 Имунске основе демиелинизације у мултиплој склерози

Централно место у настанку свих инфламацијских дешавања у МС се данас приписује аутореактивним, мијелин-специфичним $CD4^+$ T лимфоцитима, за које се сматра да регулишу све имунолошке механизме који доводе до настанка патолошког супстрата ове болести. Бројни су докази који упућују на укљученост и кључни значај ових ћелија.

Први докази су добијени на анималном моделу МС, експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (ЕАЕ), када је показано да трансфер *in vitro* активисаних мијелин-специфичних $CD4^+$ Т лимфоцита, у здравим животињама индукује настанак ЕАЕ (Zamvil и Steinman 1990). Такође, хуманизовани трансгени мишеви са хуманим HLA-DR геном често удруженим са МС (HLA-DR15) и хуманим Т ћелијским рецептором специфичним за мијелин, спонтано развијају ЕАЕ (Madsen и сар. 1999, Quandt и сар. 2004). Само откриће да се МС повезује са HLA молекулима II класе, говори у прилог значају ових ћелија, јер $CD4^+$ лимфоцити препознају антигене у склопу HLA молекула ове класе. Поред тога, код пацијената оболелих од МС, током



испитивања имуномодулацијских могућности вештачки модификованих компоненти мијелинског омотача, дошло је до егзарцербације болести са израженим порастом броја управо CD4⁺ Т лимфоцита у ЦС течности (Bielekova и сар. 2000).

Једно од потпуно неочекиваних открића било је присуство мијелин-специфичних CD4⁺ лимфоцита у периферној крви потпуно здравих особа и то у подједнаком броју као и код пацијената оболелих од МС (Markovic-Plese и сар. 1995). Међутим, још ранији је показано да у крви и ЦС течности оболелих пацијената и здравих испитаника, ове ћелије нису истог степена активације (Zhang и сар. 1994). То указује да присуство мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита, само по себи, није довољно за покретање аутоимунског процеса, већ су ту значајне, ако не и пресудне, околности које омогућавају активацију ових ћелија.

1.2.1 Антигени које мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити препознају

Аутоантигени који започињу хронични инфламацијски процес у МС још увек нису довољно познати, међутим, бројна испитивања су спроведена у циљу идентификације компоненти мијелинског омотача које Т ћелијски рецептор аутореактивних CD4⁺ Т лимфоцита специфично препознаје. Највише пажње је посвећено мијелинском базном протеину (енг. *Myelin Basic Protein*, MBP), који је уједно и први коришћен за имунизацију експерименталних животиња у циљу индукције ЕАЕ. Показано је да се фрагменти MBP уграђују у HLA молекула II класе који су повезани са МС, и уједно могу бити препознати од стране Т лимфоцита изолованих из крви оболелих (Valli и сар. 1993), што MBP чини релевантним аутоантигеном у МС. Поред MBP, испитиван је и протеолипидни протеин (енг. *Proteolipid Protein*, PLP), који је најзаступљенија протеинска компонента мијелинског омотача. Трансгени мишеви са Т ћелијским рецептором који препознаје PLP могу спонтано развијати ЕАЕ и то у високом проценту (Waldner и сар. 2000). Такође, након имунизације хомогенатом кичмене мождине, експерименталне животиње развијају ЕАЕ у коме је доминантан Т ћелијски одговор усмерен према PLP, међутим, током егзарцербације болести појављују се и CD4⁺ Т лимфоцити усмерени на MBP (Vanderlugt и Miller 2002). У хуманој популацији, оболели од МС имају повишен број високо афинитетних Т лимфоцита који препознају PLP. Интересантно је и да хумани тимус не

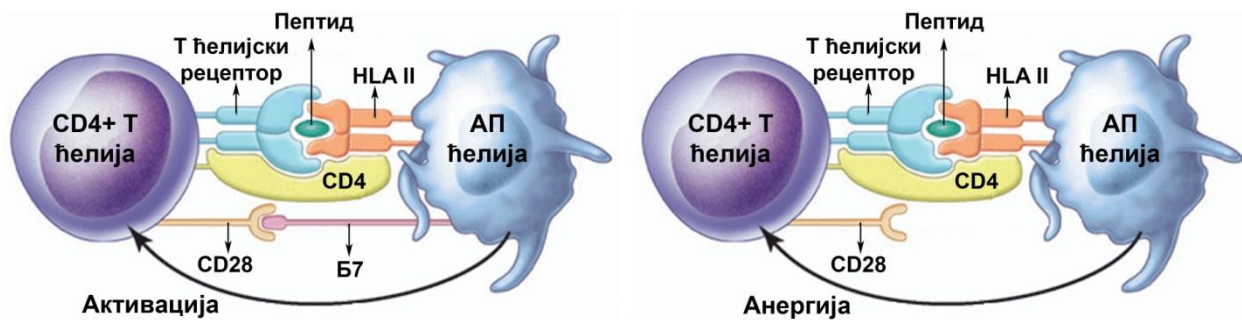


испољава PLP, што додатно сугерише аутоантигенски потеинцијал овог протеина у МС (Bielekova и сар. 2004). У МС је забележен и снажан Т ћелијски одговор на мијелински олигодендроцитни гликопротеин (енг. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, MOG) (Weissert и сар. 2002), за кога је показано да индукује варијанту ЕАЕ који је можда и најсличнија МС, с'обзиром да поред демиелинизацијских лезија у ЦНС експерименталних животиња, долази до оштећења и губитка аксона (Storch и сар. 1998). Гликопротеин удружен са мијелином (енг. *Myelin Associated Glycoprotein*, MAG) је још једна конститутивна компонента мијелинског омотача, за коју је доказано да постоје специфични Т и Б лимфоцити у ЦС течности оболелих пацијената (Andersson и сар. 2002). Поред споменутих, испитиване су и бројне друге компоненте мијелина, 2',3' циклична нуклеотидил 3' фосфодиестераза (енг. *2',3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase*, CNP) (Muraro и сар. 2002), олигодендроцитни базни протеин удружен са мијелином (енг. *Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein*, МОВР) (Kaushansky и сар. 2010), олигодендроцитни специфични протеин (енг. *Oligodendrocyte Specific Protein*, OSP) (Kaushansky и сар. 2008), трансалдолаза Х (енг. *Transaldolase H*, Tal H) (Niland и Perl 2004), за које су такође идентификовани CD4⁺ Т лимфоцити у крви и ЦС течности пацијената оболелих од МС.

Последњих година, неколико група истраживача је објавило да специфичност Т ћелијског рецептора није апсолутна, као што се до тада веровало, већ да један Т ћелијски рецептор истовремено може препознавати већи број пептида од којих неки не деле сличност ни у једној аминокиселини (Wooldridge и сар. 2012). Овај феномен је означен као дегенеративност Т ћелијског рецептора. Примењено на терену МС, то сугерише да се мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити могу активирати услед препознавања различитих пептида који не морају ни бити слични мијелину. Након активације, мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити такође препознају компоненте мијелинског омотача, покрећу инфламацијски одговор и тако иницирају аутоимунски процес. У прилог овој теорији говори чињеница да су Т лимфоцити са дегенеративним Т ћелијским рецептором заиста бројнији код пацијената који болују од МС у односу на здраве испитанике (Zhang и сар. 2008). Поред Т лимфоцита, који имају дегенерисане Т ћелијске рецепторе, у МС су идентификовани Т лимфоцити који истовремено испољавају Т ћелијске рецепторе различите специфичности, што такође може бити од значаја у започињању аутоимунског одговора (Ji и сар. 2010).

1.2.2 Активација мијелин-специфичних CD4⁺Т лимфоцита

За активацију Т лимфоцита неопходно је присуство два сигнала: сигнала 1 и сигнала 2. Сигнал 1 обезбеђује процес препознавања антигена, у коме Т ћелијски рецептор специфично препознаје и везује пептидни фрагмент антигена, који је презентован у склопу HLA молекула II класе на површини антиген презентујуће (АП) ћелије. У овом процесу, Т ћелијски рецептор истовремено везује пептидни фрагмент антигена али и полиморфне домене сопствених HLA молекула II класе у које је антигени пептид уграђен. Сигнал 2 се односи на процес костимулације, за чију реализацију је такође неопходно присуство АП ћелија. Када се активира, АП ћелија на својој површини повећава експресију костимулаторних молекула B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), који се везују за CD28 молекулу на површини Т лимфоцита, при чему ова интеракција управо представља активациони сигнал 2. Само уколико истовремено постоји сигнал 1 и сигнал 2 долази до активације Т лимфоцита, у спротном, одсуство сигнала 2 уводи лимфоците у стање функционалне нереактивности – анергију (Слика 3.) (Abbas 2014). Исти ови принципи се односе и на мијелин-специфичне CD4⁺ Т лимфоците.



Слика 3. Услови активације и анергије CD4⁺Т лимфоцита

Активација мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита се дешава ван ЦНС, (Carrithers и сар. 2000) , највероватније у регионалним лимфним чворовима врата, који конститутивно приказују одређене антигене мијелинског омотача (Furtado и сар. 2008). Постоји више теорија које објашњавају механизме који посредују у овом процесу, од којих су најзначајнији молекулска мимикрија, случајна активација и ширење епитопа.



Молекулска мимикрија, као механизам иницирања аутоимунског одговора, се везује за присуство инфекције и процесе унакрсног препознавања. Унакрсно препознавање подразумева да мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити, осим мијелина, истовремено препознају и пептидне фрагменте извесних микроорганизама. У случају инфекције, превасходно се активирају АП ћелије које обрађују антигене микроорганизама и испољавају костимулацијске молекуле на својој површини. Мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити препознају антигене микроорганизама на површини АП ћелије и притом добијају сигнал 2 активације у виду костимулације. Након активације, ови лимфоцити, осим антигена микроорганизама, истовремено препознају и компоненте мијелинског омотача неурона чиме се започиње инфламацијски аутоимунски одговор (Libbey и сар. 2007).

Имајући у виду изражену дегенеративност Т ћелијског рецептора, мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити унакрсно препознају широк спектар пептида и то је заиста феномен који се често дешава код МС (Martin и сар. 2001). Међутим унакрсно препознавање, само по себи, није довољно за иницирање аутоимунског процеса, већ је потребно и присуство активацијског сигнала 2. Инфекција, посредством активације АП ћелија, би управо могла обезбедити овај неопходни сигнал 2. У прилог томе, говори чињеница да трансгени мишеви са МВР специфичним Т ћелијским рецептором, не развијају спонтано ЕАЕ у стерилном, већ искључиво у нестерилном окружењу, што се приписује присуству извесне вирусне или бактеријске инфекције (Goverman и сар. 1993). Уједно, овај механизам обашњава и зашто све особе са мијелин-специфичним CD4⁺ Т лимфоцитима не развијају МС.

Случајна активација (енг. *Bystander Activation*), за разлику од претходног механизма, је антиген неспецифичан процес. Дешава се у проинфламацијском окружењу, када може доћи до прекида механизма периферне имунотолеранције који су мијелин-специфичне CD4⁺ Т лимфоците држали у стању анергије (Kim и сар. 2006). Анергија, као механизам периферне имунотолеранције, је стање функционалне нереактивности лимфоцита, које настаје када лимфоцит препознаје антиген - обезбеђен му је сигнал 1, али му недостаје костимулација, односно сигнал 2 активације. У случају инфекције, микроорганизми индукују појачану испољеност костимулатора на површини АП ћелија које могу обезбедити сигнал 2 за активацију аутореактивних лимфоцита, који заправо и не препознају антигене микроорганизама, већ сопствене



антигене. Показано је да при активацији АП ћелија стимулацијом рецептора сличног Толу – 4 (енг. *Toll Like Receptor - 4*, TLR-4) липополисахаридом бактерија, испољеност костимулаторних молекула се повећава што индукује активацију до тада анергичних мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита и резултира развојем ЕАЕ (Waldner и сар. 2004). Поред тога, само присуство проинфламацијских цитокина, фактора некрозе тумора α (енг. *Tumor Necrosis Factor α*, TNF-α) и IL-6 у високим концентрацијама може условити пораст афинитета рецептора за IL-2 на површини лимфоцита различите антигене специфичности. То омогућава везивање цитокина IL-2, кога секретују лимфоцити активисани на антиген специфичан начин. На тај начин, IL-2 стимулише неспецифичну пролиферацију лимфоцитних клонова од којих неки могу бити и аутореактивни (Boyman 2010).

Ширење епитопа је процес који се везује за откривање сопствених антигена, који су до тада били недоступни имунском систему, што се може десити приликом оштећења ткива изазваним одређеним вирусним инфекцијама. У овом случају вирус-специфични лимфоцити убијају инфициране ћелије и условљавају ослобађање аутоантигена. Антиген-презентујуће ћелије обрађују и приказују сопствене антигене, истовремено испољавају костимулаторне молекуле због присутне инфекције, што може резултирати активацијом аутореактивних лимфоцита. Показано је на експерименталном моделу МС да се Т ћелијски имунски одговор, који је првобитно био усмерен на вирус, касније може ширити и на компоненте мијелинског омотача (Miller и сар. 1997). Поред тога, током вирусне инфекције, презентација сопствених антигена је појачана у инфицираним ћелијама (Barnaba 1996). Такође, у активисаним АП ћелијама може доћи до модификоване протеолитичке обраде сопствених антигена која се нормално не јавља, што додатно може покренути аутоимунски одговор услед атипичне презентације сопствених антигена (Opdenakker и Van Damme 1994).

1.2.3 Миграција мијелин-специфичних CD4⁺Т лимфоцита у централни нервни систем

Након активације у регионалним лимфним чворовима врата, мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити мигрирају у ЦНС, где иницирају настанак плакова демиелинизације. Да би уопште доспели до структура ЦНС, лимфоцити морају да



прођу крвно-мождану баријеру (КМБ) која је ограничене пропустљивости, због чега је, сада већ историјски, ЦНС сматран имунопривилегованим одељком. Касније је доказано да лимфоцити могу да пенетрирају у ЦНС и на друге начине нпр. преко крвно-цереброспиналне баријере (КЦБ) која се формира у хороидном плексусу где настаје ЦС (Ransohoff и сар. 2003).

Механизми који усмеравају мијелин-специфичне CD4⁺ Т лимфоците у ЦНС и омогућавају њихову трансмиграцију кроз васкуларни ендотел КМБ још увек нису употпуности разјашњени. С'обзиром да у је одсуству инфламације КМБ практично непропустљива за лимфоците јер не испољава адекватне адхезивне молекуле, верује се да мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити инфилтришу структуре ЦНС првенствено преко КЦБ, чија васкуларна компонента конститутивно испољава П селектин који посредује у процесима трансмиграције (Carrithers и сар. 2002). У ЕАЕ моделу је показано да васкуларни ендотел КЦБ конститутивно испољава ЦЦ - хемокински лиганд 20, (енг. *CC Chemokine Ligand 20*, CCL20). За овај лиганд се специфично везује ЦЦ - хемокински рецептор 6, (енг. *CC Chemokine Receptor 6*, CCR6) који је у високом степену испољен на површини мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита, што може објаснити енцефалотропност ових ћелија (Reboldi и сар. 2009). Поред тога, потврђено је да је субарахноидални простор, кога испуњава ЦС течност, прво место где долази до реактивације мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита услед поновног препознавања антигена на површини АП ћелија које се овде налазе (Kivisäkk и сар. 2009). Након реактивације, лимфоцити ослобађају бројне солубилне медијаторе који активирају микроглијалне ћелије и повећавају експресију адхезивних молекула на ендотелу КМБ, што ову баријеру потом чини пропустљивом за лимфоците (Brown и Sawchenko 2007). У прилог овој теорији иде и чињеница да се након интравенског трансфера мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита, ови лимфоцити појављују у ЦНС експерименталне животиње у два времена (таласа), од којих је други масивнији и поклапа се са настанком клиничке манифестације ЕАЕ (Flügel и сар. 2001). То указује да је иницијална миграција мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита у ЦНС преко КЦБ неопходна за нарушавање пермеабилности КМБ, која потом омогућава инфилтрацију већег броја лимфоцита који су укључени у настанак болести.

Крвно-мождана баријера се састоји од три одељка: васкуларног ендотела, периваскуларног простора и глијалног слоја кога изграђују прстолики наставци



астроцита и микроглијалне ћелије. За миграцију мијелин-специфичних $CD4^+$ Т лимфоцита кроз васкуларни ендотел значајни су бројни адхезивни молекули као што су Е и П селектини, интрацелуларни адхезивни молекул 1, (енг. *Intracellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1). Међутим, сматра се да је најважнији васкуларни адхезивни молекул 1 (енг. *Vascular Adhesion Molecule 1*, VCAM-1) (Engelhardt и Ransohoff 2005). Због тога се данас у терапији МС употребљава натализумаб, моноклонско антитело усмерено на лимфоцитни интегрин који се везује за VCAM-1, у циљу спречавања трансмиграције мијелин-специфичних лимфоцита у ЦНС. Поред тога, показано је да у проинфламацијском окружењу, ендотелне ћелије КМБ могу да експримирају HLA молекуле II класе и врше успешну презентацију антигена, што омогућава реактивацију мијелин-специфичних $CD4^+$ Т лимфоцита који мигрирају на овај начин (Archambault и сар. 2005). Када лимфоцити прођу васкуларну компоненту КМБ доспевају у периваскуларни простор, где се налазе периваскуларни макрофаги који су по својој природи АП ћелије и као такве такође могу посредовати у процесима реактивације. Реактивисани лимфоцити потом мигрирају кроз глијални слој, за шта је неопходно присуство хемокина, али и цитокина TNF- α који стимулише испољеност VCAM-1 на површини астроцита, за кога се показало и да је круцијалан и у процесима миграције у мождани паренхим (Gimenez и сар. 2004). Мијелин-специфични $CD4^+$ Т лимфоцити у можданом паренхиму, заједно са активисаним макрофагима и микроглијалним ћелијама, секретују солубилне медијаторе који посредују у демиелинизацијским процесима.

1.2.4 Диференцијација мијелин-специфичних $CD4^+$ Т лимфоцита у ефекторске ћелије

Приликом процеса активације, миграције и реактивације, мијелин-специфични $CD4^+$ Т лимфоцити се диферентују у ефекторске, помоћничке Т (енг. *T helper*, Th) ћелије. У зависности од цитокинског миљеа кога секретују, Th ћелије се деле на субпопулације Th-1, Th-2, Th-9, Th-17, Th-22 ћелија, међутим број ових ћелијских субпопулација још увек није коначан.

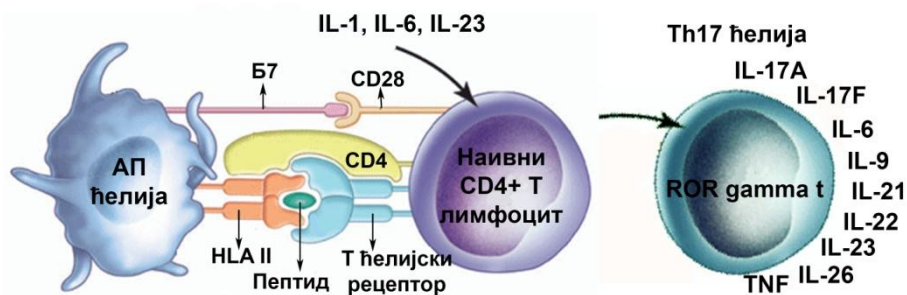
До скоро се сматрало да мијелин-специфични $CD4^+$ Т лимфоцити одговорни за настанак ЕАЕ и МС, припадају Th-1 ћелијској линији, која захтева присуство цитокина



IL-12 за своју диференцијацију и карактерише се секрецијом интерферона- γ (енг. *Interferon- γ* , IFN- γ) и цитокина IL-2 и TNF- α . Овакав став се темељио углавном на експериментима спроведеним на ЕАЕ, када је показано да CD4⁺ Т лимфоцити који врше инвазију ЦНС, секретују IFN- γ (Renno и сар. 1995). Детектовано је и присуство цитокина Th-1 ћелија у инфламацијским лезијама ЕАЕ, чије концентрације корелирају са тежином клиничке слике (Merrill и сар. 1992). У хуманој популацији је такође показано да након примене IFN- γ пацијентима који болују од МС, долази до клиничке егзарцезације болести (Panitch и сар. 1987). Међутим, у последњих неколико година, бројна испитивања су довела у питање разматрање МС као искључиво Th-1 посредовану болест. Можда најнеочекиваније, било је откриће да мишеви дефицијентни за цитокине Th-1 ћелијског одговора, не само да нису резистентни на индукцију ЕАЕ, већ развијају тежу клиничку форму болести (Ferber и сар. 1997). Насупрот томе, мишеви дефицијентни за цитокин IL-23 су у потпуности отпорни на индукцију ЕАЕ (Cua и сар. 2003). Касније је установљено да је цитокин IL-23 неопходан за настанак и стабилизацију Th-17 ћелијске линије, што је условило интензивна истраживања патогености ове ћелијске субпопулације у МС (Langrish и сар. 2005).

Th-17 ћелије су први пут описане 2000. год. као ћелијска субпопулација CD4⁺ Т лимфоцита која секретује велике количине цитокина IL-17 (Infante-Duarte и сар. 2000). Каснија истраживања су показала да ове ћелије поседују знатно шири цитокински миље секреције који обухвата IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-9, IL-21, IL-22, IL-23, IL-26, TNF- α , међутим, и даље доминантним продуктом секреције ових ћелија се сматра цитокин IL-17A (Harrington и сар. 2005, Wilson и сар. 2007, Bettelli и сар. 2007, Elyaman и сар. 2009). Поред директног проинфламацијског ефекта, IL-17A посредством бројних ћелија, фибробласта, стромалних, ендотелних ћелија и макрофага, индукује продукцију других солубилних медијатора IL-1, IL-6, TNF- α , фактора стимулације гранулоцитно-макрофагних колонија (енг. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, GM-CSF), матрикс металопротеиназа и Ц(икс)Ц хемокина у првом плану Ц(икс) хемокинског лиганда 8 (енг. *CX Chemokine Ligand 8*, CXCL8), што све указује на изразит проинфламацијски карактер ове ћелијске линије (Fossiez и сар. 1996, Jovanovic и сар. 1998, Kolls и Lindén 2004). Програм диференцијације Th-17 ћелија још увек није детаљно проучен, али се везује за присуство одређених транскрипционих фактора у

наивним CD4⁺ Т лимфоцитима, као што су солубилни рецептор ретиноичне киселине γ t (енг. *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γ t*, ROR γ t), чија активација зависи од бројних позитивних и негативних регулатора (Ivanov и сар. 2006). Првобитно је сматрано да је присуство трансформишућег фактора раста β (енг. *Transforming Growth Factor- β* , TGF- β), IL-6 и IL-1 потребно за развој Th-17 ћелија, док је аутокрино дејство IL-23 неопходно за експанзију ове ћелијске линије (Chung и сар. 2009). Код људи је показано да IL-1, IL-6 и IL-23 подстичу Th-17 ћелијску диференцијацију, док за разлику од мишева, присуство TGF- β није неопходно, иако индиректно омогућава експанзију ове ћелијске линије јер инхибира Th-1 имунски одговор (Слика 4.) (Santarlaschi и сар. 2009).



Слика 4. Диференцијација и цитокински профил Th-17 ћелија

Бројни експерименти спроведени на ЕАЕ указују на несумњив значај Th-17 ћелија и цитокина IL-17 у настанку болести (Hofstetter и сар. 2005, Langrish и сар. 2005, Komiyama и сар. 2006, Ivanov и сар. 2006). У хуманој популацији, транскрипти гена за IL-17 су откривени у демиелинизацијским плаковима пацијената оболелих од МС (Lock и сар. 2002), док ћелије које продукују IL-17 су присутне у активним али не и неактивним плаковима (Tzartos и сар. 2008). Поред тога, активност болести је повезана са повећањем броја Th-17 ћелија у крви оболелих (Durelli и сар. 2009); такође, током егзарцербације повећава се број ових ћелија и у ЦС течности, што није случај са Th-1 ћелијама (Brucklacher-Waldert и сар. 2009).



1.3 Глутаматска екситотоксичност и неуродегенеративне промене у мултиплој склерози

Демиелинизација, као последица инфламацијских збивања, се традиционално сматра основном патолошком карактеристиком МС. Међутим, одавно је познато да се инфламацијски процеси у МС редовно удружују са неуродегенеративним променама (Kornek и Lassmann 1999), чији се значај у настанку болести годинама занемаривао. Интересовање за неуродегенеративне промене у МС је поново побуђено открићем да је физичка неспособност пацијената у директној вези са степеном оштећења и губитка аксона (Bakshi и сар. 2008). Термин неуродегенерација се односи на различите процесе који доводе до прогресивног губитка структуре или функције неурона и последичне смрти ових ћелија. Показано је да се ови процеси појављују врло рано током развоја МС (De Stefano и сар. 2001), и данас се чак сматра да је прелазак болести у прогресивну форму директно повезан са губитком критичног броја аксона (Schirmer и сар. 2011). Губитак аксона је најинтензивнији у плаковима демиелинизације и присутан је у активним и неактивним лезијама (Peterson и сар. 2001), међутим интересантно је да се такође јавља у наизглед нормалној белој маси мозга, што временом доводи до мождане атрофије (Evangelou и сар. 2000). Посебно, степен атрофије мозга визуелизован НМР методом, одговара клиничким параметрима МС, више него број и активност демиелинизацијских лезија (De Stefano и сар. 2003).

Механизми настанка неуродегенерације и аксоналног оштећења у МС су изузетно разноврсни и зависе од стадијума болести. Током фазе акутне демиелинизације, велики број аксонских наставака неурона је оштећен, што је највероватније последица самог инфламацијског процеса. Међутим, ова фаза масивног губитка аксона траје свега неколико дана до недеља (Kornek и сар. 2000). Насупрот томе, запажена је и аксонална дегенерација у знатно нижем степену у неактивним плаковима која се вероватно дешава ван инфламацијских дешавања. Иако се на овај начин губи релативно мали број аксона, овакве лезије могу да перзистирају годинама, тако да се верује да између осталог, су оне одговорне за свеобухватни губитак аксона у МС. Ови налази, могу делимично објаснити спору прогресију болести до физичке неспособности (Kornek и сар. 2000).



Бројни су предложени механизми аксоналног оштећења: поремећај функције митохондрија (Мао и Reddy 2010), депоновање гвожђа и поремећај хомеостазе метала (LeVine и Chakrabarty 2004), оксидативни и нитрозативни стрес услед појачане продукције реактивних метаболита кисеоника и азота (Gilgun-Sherki и сар. 2004, Miller и сар. 2009). Од недавно и глутаматска екцитотоксичност се сматра могућим механизмом настанка неуродегенерације у МС. То је феномен који настаје када екцитацијски неуротрансмитер, глутамат, у повећаним концентрацијама претерано активира своје рецепторе на мембранама неурона и олигодендроцита, што доводи до унутарћелијске акумулације јона Ca^{2+} и последичне смрти ових ћелија (Sendrowski и сар. 2013). Први докази који упућују на укљученост глутаматске екцитотоксичности у патогенезу МС, везани су за повећан ниво глутамата у ЦС течности оболелих у односу на здраве испитанике без објективних знакова неуролошког поремећаја (Stover и сар. 1997). Од тада, бројне студије се баве узроком повећаног нивоа глутамата у МС, као и поремећајима глутаматских рецептора, транспортера и ензима укључених у метаболизам овог неуротрансмитера.

1.3.1 Узрок повећаног нивоа глутамата у МС

Истраживања су показала да пацијенти који болују од МС имају повишен ниво глутамата у ЦС течности (Stover и сар. 1997, Sarchielli и сар. 2003), и акутним плаковима демиелинизације (Srinivasan и сар. 2005), међутим, порекло овог глутаматског експеса је и даље предмет дебате.

Акумулација активисаних макрофага и глијалних ћелија је једна од основних хистопатолошких карактеристика акутних плакова демиелинизације, и управо ове ћелије се данас сматрају најзначајнијим извором вишка глутамата. Када се активишу, нпр. липополисахаридом бактерија или другим TLR-4 агонистима, ове ћелије имају способност секреције велике количине глутамата (Piani и сар. 1991, Piani и сар. 1992). У МС, активација микроглијалних ћелија је присутна у свим клиничким типовима болести (Sriram и Rodriguez 1997, Prineas и сар. 2001). Активни плакови демиелинизације заиста показују висок ниво активности ензима који производи глутамат - глутаминазе, управо у макрофагима и микроглијалним ћелијама који се налазе у непосредној близини дистрофичних аксона. Још важније је да постоји



директна повезаност активности глутаминазе и степена оштећења аксона (Werner и сар. 2001).

Демиелинизирани аксони се такође сматрају потенцијалним изворима глутаматског ексцеса у МС. Електронмикроскопски је показано да огољена аксолема обилује волтажно зависним Ca^{2+} каналима, који се нормално налазе само на пресинаптичким регионима аксона, где су укључени у процес везикуларног ослобађања глутамата у ванћелијски простор (Kornek и сар. 2001). Оваква ектопијска дистрибуција волтажно зависних Ca^{2+} канала на демиелинизованим регионима аксона може условити повећан улазак Ca^{2+} у аксонски наставак уз компензаторно ослобађање глутамата (Kukley и сар. 2007). Слично је показано и са волтажно зависним Na^{+} каналима који такође могу посредовати у процесима ослобађања глутамата из оголелих аксона (Craner и сар. 2004).

У новије време, и астроцити се истражују као потенцијални извори глутамата у инфламацијским дешавањима која погађају ЦНС. Астроцити, као најбројнија популација глијалних ћелија, заузимају централно место у метаболизму глутамата и традиционални став је да ове ћелије имају ексклузивну улогу у мобилизацији глутамата из ванћелијског простора и његовој конверзији у нетоксични глутамин (Schousboe и Hertz 1981). Насупрот томе, новија истраживања указују да у извесним патолошким али и физиолошким околностима, астроцити могу и да ослобађају глутамат (Vesce и сар. 2007). Описано је неколико механизма који повезују астроцитно ослобађање глутамата и екситотоксична оштећења присутна у МС. Ови механизми се претежно реализују посредством микроглијалних ћелија које након активације, ослобађају велике количине аденозин-3-фосфата, који потом стимулише астроците на ослобађање глутамата (Pascual и сар. 2012). Сличне ефекте на астроците остварују и извесни цитокини активисаних микроглијалних ћелија као што су $\text{TNF-}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ (Bezzi и сар. 2001). Такође, сам глутамат може да услови појачано ослобађање из астроцита посредством метаботропних глутаматских рецептора (Bezzi и сар. 1998).



1.3.2 Глутаматски рецептори у МС

Глутамат своје ефекте деловања на циљне ћелије остварује посредством јонотропних и метаботропних глутаматских рецептора. Јонотропни глутаматски рецептори су разврстани у четири класе N-метил-D-аспартатски (енг. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA), α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионатски (енг. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate*, АМРА), каинатски и δ рецептори, који су именовани према супстанцама које се понашају као њихови агонисти.

С'обзиром да се претежно налазе на површини нервних ћелија, NMDA рецептори су и посебно интересантни са аспекта неуродегенеративних процеса. Након везивања за ове рецепторе, глутамат условљава отварање Ca^{2+} канала и инфлукс јона Ca^{2+} у ћелију уз истовремену мобилизацију Ca^{2+} из унутарћелијских депоа. Претерана стимулација ових рецептора условљава ексцитотоксичну смрт неурона услед преоптерећења јонима Ca^{2+} (Lipton и Rosenberg 1994). Показано је у *in vitro* условима да дегенерација аксона заиста може бити последица претеране глутаматске стимулације и да су настала оштећења претежно посредована NMDA рецепторима (Chung и сар. 2005). Имајући у виду да се NMDA рецептори налазе и на површини олигодендроцита и епителних ћелија које формирају КМБ, глутаматска ексцитотоксичност би могла учествовати у процесима демиелинизације и нарушавања пропустљивости КМБ, што су уједно основне карактеристике МС (Sharp и сар. 2003, Wong 2006).

У ЦНС, АМРА рецептори су претежно присутни на површини глијалних ћелија (Verkhatsky и Steinhäuser 2000). Међутим, функционални АМРА рецептори се налазе и на неуронима што отвара могућност да ови рецептори такође посредују у неуродегенеративним процесима. Показано је да стимулација АМРА рецептора подстиче увећање Ca^{2+} у аксонима, и потенцијално може условити ћелијску смрт (Ouardouz и сар. 2009b). Након третирања блокаторима АМРА рецептора, степен аксоналног оштећења у ЕАЕ се смањује, док је клинички ток болести знатно блажи (Groom и сар. 2003).

Значај каинатских рецептора у настанку МС је још одавно претпостављен, када је показано да убризгавање каината, агонисте каинатских рецептора у оптички нерв, доводи до формирања лезија које наликују на МС (Matute 1998). Касније је откривено



да аксони поседују каинатске рецепторе, који након активације, омогућавају инфлукс јона Ca^{2+} у аксоплазму, и самим тим посредују у настаку ексцитотоксичних оштећења у виду неуродегенеративних промена (Ouardouz и сар. 2009а). Интересантно, имунохистохемијске анализе активних плакова МС су показале да се ови рецептори, поред тога што су испољени на дистрофичним аксонима, налазе и на ендотелним ћелијама крвних судова што указује на потенцијални значај ових рецептора и у настанку дисфункције КМБ (Newcombe и сар. 2008).

У глутаматске рецепторе се сврставају и δ рецептори који заправо не везују глутамат нити глутаматске агонисте, с'тога немају значај у развоју глутаматске ексцитотоксичности (Mayat и сар. 1995).

Метаботропни глутаматски рецептори су везани за секундарне гласнике у виду Г протеина, и њихова функција се огледа у регулацији синаптичке трансмисије која се остварује модулацијом процеса ослобађања глутамата у синаптичку пукотину и активности пре и постсинаптичких јонских канала (Conn и Pin 1997). Постоје подаци који указују на поремећај дистрибуције ових рецептора у МС (Geurts и сар. 2003, Geurts и сар. 2005), међутим, имајући у виду веома разноврсне, често и антагонистичке ефекте које ови рецептори остварују, тешко је интерпретирати њихов значај у настанку неуродегенеративних промена.

1.3.3 Глутаматски транспортери у МС

Преузимање глутамата из ванћелијског простора је један од основних механизма за дугорочну регулацију нивоа глутамата у ниским, нетоксичним концентрацијама. За овај процес су одговорни специфични мембрански протеини, глутаматски транспортери који мобилишу глутамат из ванћелијског у унутарћелијски простор неурона и глијалних ћелија. До данас, у хуманој популацији је описано пет различитих врста ових протеина означених као транспортери ексцитацијских аминокиселина 1-5 (енг. *Excitatory Amino Acid Transporters 1–5*, EAAT-1–5) (Danbolt 2001).

Глутаматски транспортер EAAT-1 код људи, или глутамат-аспартат транспортер (енг. *Glutamate Aspartate Transporter*, GLAST) код других сисара, се налази на површини олигодендроцита. Међутим, присуство овог глутаматског



транспортера је откривено и на површини астроцита и активисаних микроглијалних ћелија (Danbolt 2001). Имунохистохемијске студије су показале потпуни губитак ЕААТ-1 у активним плаковима МС, што може да укаже на значајно смањење способности беле масе мозга да одржава ванћелијски ниво глутамата у нетоксичном опсегу (Werner и сар. 2001). На ЕАЕ моделу је потврђен поремећај експресије GLAST протеина у различитим деловима мозга током различитих стадијума болести. Поготову, у малом мозгу где је GLAST основни транспортер глутамата, забележено је смањење експресије овог протеина током егзарцербације болести (Mitosek-Szewczyk и сар. 2008). Такође је показано да Т лимфоцити секретују TNF- α или стимулишу микроглијалне ћелије да продукују велике количине овог цитокина, који смањује експресију GLAST на астроцитима и подстиче екситотоксична оштећења (Korn и сар. 2005).

Транспортер ЕААТ-2 код људи или глутаматски транспортер 1 (енг. *Glutamate Transporter 1*, GLT-1) код других сисара, је основни астроцитни транспортер глутамата, међутим, може се наћи и на површини олигодендроцита (Danbolt 2001). Верује се да се највећа количина ванћелијског глутамата мобилише у унутарћелијски простор управо посредством овог транспортера (Pitt и сар. 2003), што ЕААТ-2 чини посебно интересантним са аспекта глутаматске екситотоксичности. У МС, поремећаји испољености глутаматских транспортера су најизраженији управо за ЕААТ-2. У активним плаковима, смањење ЕААТ-2 се шири ван граница лезије у наизглед неизмењену белу масу мозга, где је испољеност других глутаматских транспортера још увек очувана (Werner и сар. 2001). Овакав селективни губитак ЕААТ-2 може умногоме допринети развоју екситотоксичних оштећења, имајући у виду експерименталне податке да блокада GLT-1 подстиче губитак олигодендроцита и дегенерацију аксона (Domercq и сар. 2005). Губитак ЕААТ-2 може бити последица самих инфламацијских дешавања у МС. Наиме, TNF- α , чија је концентрација повишена у ЦС течности оболелих од МС (Obradović и сар. 2012), може условити смањење испољености ЕААТ-2 на површини олигодендроцита (Pitt и сар. 2003); слично и IL-1 β смањује испољеност ЕААТ-2 на површини астроцита (Takahashi и сар. 2003).

У људи ЕААТ-3, или глутаматски транспортер 1 (енг. *Excitatory Amino Acid Carrier 1*, ЕААС-1) код других сисара, је претежно присутан на дендритским али не и на аксонским наставцима неурона (Danbolt 2001). Снажна ЕААТ-3 имунопозитивност



је детектована у активним плаковима МС (Newcombe и сар. 2008). Такође, током развоја ЕАЕ нађено је значајно повећање експресије ЕААС-1 протеина која корелира са клиничком прогресијом болести (Ohgoh и сар. 2002). Имајући у виду да су GLAST и GLT-1 у највећем степену одговорни за уклањање вишка глутамата из ванћелијског простора (Pitt и сар. 2003), претпоставља се да увећање ЕААС-1 не може обезбедити значајан протективни ефекат. У прилог томе је чињеница да мишеви дефицијентни за ЕААС-1 не развијају знаке неуродегенерације током развоја ЕАЕ (Peghini и сар. 1997).

Глутаматски транспортери ЕААТ-4 и ЕААТ-5 не могу имати велики значај у настанку глобалног екситотоксичног оштећења имајући у виду ограничену испољеност ових транспортера која је резервисана за Пуркинијеве ћелије малог мозга и Милерове ћелије ретине (Danbolt 2001).

1.3.4 Поремећаји ензима укључених у метаболизам глутамата у МС

Метаболизам глутамата у ЦНС се одвија по принципима затвореног метаболичког круга познатог као глутамат-глутамински метаболички круг. По овом концепту, глутамат се током синаптичке трансмисије ослобађа у синаптичку пукотину, након чега се убрзано мобилише у постсинаптички, пресинаптички и глијални одељак. Мобилизација глутамата у глијални одељак се сматра најефикаснијим механизмом уклањања вишка глутамата, и остварује се посредством глутаматских транспортера који се налазе на површини астроцита. У астроцитима, глутамат се конвертује у нетоксични глутамин уз помоћ ензима глутамин синтетазе у процесу који захтева амонијак и аденозин трифосфат. Глутамин се потом ослобађа у ванћелијски простор одакле се транспортује назад у неуроне током њихове деполаризације. У неуронима глутамин се хидролизује на глутамат и амонијак уз помоћ ензима глутаминазе и на тај начин се затвара глутамат-глутамински круг (Daikhin и Yudkoff 2000). Иако се данас овај метаболички пут глутамата сматра основним, описани су и бројни други чији значај још увек није детаљно испитан (Kanunnikova 2012).

У МС, имунохистохемијски је показано значајно смањење активности ензима глутамин синтетазе у олигодендроцитима, у непосредној близини активних лезија демиелинизације, док у хроничним плаковима смањена активност је забележена и у



астроцитима (Werner и сар. 2001). Овакви подаци указују да је метаболизам глутамата компромитован у нивоу лезија МС. У прилог томе су и налази масивног инфилтрата макрофага у активним плаковима МС, јер активисани макрофаги, као и микроглијалне ћелије, су изузетно богати глутаминазом, што доприноси појачаној продукцији глутамата у активним лезијама (Yawata и сар. 2008). Између осталог, имунохистохемијски позитивни макрофаги на глутаминазу су пронађени у непосредној близини дистрофичних аксона и учесталост овакх ћелија је повезана са степеном аксоналног оштећења (Werner и сар. 2001).

2 Радне хипотезе



Уочавајући значај Th-17 имунског одговора и глутаматске ексцитотоксичности у патогенези МС, испитана је могућа повезаност ова два процеса током настанка МС. Предложене су следеће радне хипотезе за испитивање овог научног проблема:

1. Пацијенти који болују од мултипле склерозе имају повишен ниво IL-17A у цереброспиналној течности у односу на здраве испитанике.
2. Постоји директна корелација између нивоа IL-17A и глутамата у цереброспиналној течности пацијената оболелих од мултипле склерозе.
3. Интерлеукин 17A стимулише ексцитотоксичност, смањујући преузимање глутамата од стране астроцита и његов метаболизам, преко негативне регулације експресије гена за глутаматске транспортере и ензим глутамин синтетазу.
4. Интерлеукин 17A повећава ослобађање глутамата из астроцита процесом који зависи од присуства Ca²⁺ јона.

3 Циљеви истраживања



За проверу наведених хипотеза постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Код пацијената оболелих од мултипле склерозе:

- одредити нивое IL-17A и глутамата у цереброспиналној течности и упоредити са вредностима ових параметара у цереброспиналној течности код здравих испитаника.
- испитати међусобну повезаност нивоа IL-17A и глутамата у цереброспиналној течности.
- испитати међусобну повезаност између нивоа IL-17A и глутамата у цереброспиналној течности са клиничким карактеристикама обољења, биохемијским и цитолошким параметрима у цереброспиналној течности.

2. Испитати ефекте рекомбинантног пацовског IL-17A на способност астроцита пацова у култури да преузимају и метаболишу глутамат, праћењем испољености гена за глутаматске транспортере и ензим глутамин синтетазу.

3. Испитати ефекте пацовског IL-17A на способност астроцита да ослобађају глутамат *in vivo* и зависност овог процеса од присуства Ca²⁺ јона.

4 Материјал и методе



4.1 Коришћени реагенси

4.1.1 Медијими, пуфери и супстанце коришћене у култивисању и третирању ћелијске културе астроцита пацова

4.1.1.1 Медијуми и пуфери

1. Медијум RPMI 1640 (поизвођач: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) оплемењен 10 % феталним телећим серумом (енг. *Fetal Calf Serum*, FCS) (поизвођач: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) и глукозом (поизвођач: Zorka, Šabac, Srbija) у концентрацији од 4 g/L је коришћен као медијум за култивацију астроцита пацова. До употребе је складиштен на температури +4°C.

2. Комерцијални трипсин-EDTA раствор концентрације трипсина 2,5 g/L и EDTA 0,2 g/L (поизвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) је коришћен за пресађивање (пасажирање) ћелија. До употребе је складиштен на температури -20°C.

3. Фосфатни пуферисан слани раствор (енг. *Phosphate Buffered Saline*, PBS)

У 1000 mL дестиловане воде додато је:

- 0,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (поизвођач: Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (поизвођач: Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- 8,5 g NaCl (поизвођач: Zorka, Šabac, Srbija)

pH вредност раствора је подешена додавањем NaOH (поизвођач: Zorka, Šabac, Srbija) до вредности 7,4.

4. Локов (*Locke's*) раствор

У 500 mL дејонизоване воде додато је:

- 4,091 g NaCl (140 mM) (поизвођач: Zorka, Šabac, Srbija)
- 0,175 g KCl (4,7 mM) (поизвођач: Zorka, Šabac, Srbija)
- 0,0815 g KH_2PO_4 (1,2 mM) (поизвођач: Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- 0,0725 g MgSO_4 (1,2 mM) (поизвођач: Centrohem, Stara Pazova, Srbija)



- 0,138 g CaCl₂ (2,5 mM) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)
- 0,99 g глукозе (11 mM) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)
- 1,787 g HEPES-NaOH (15 mM) (произвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

pH вредност раствора је подешена додавањем NaOH (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija) до вредности 7,4. У стимулацији ћелијске културе астроцита коришћен је и Локов раствор без Ca²⁺ јона, при чијој припреми је изостављен CaCl₂.

4.1.1.2 Супстанце:

1. Рекомбинантни пацовски IL-17A протеин (произвођач: eBioscience, San Diego, CA, USA). Испоручен је у виду стерилног раствора концентрације 0,1 mg/mL и чуван на температури од -80°C до употребе. У експериментима је коришћен у концентрацијама 10, 25, 50, 100 ng/mL које су добијене растварањем у оплемењеном RPMI 1640 медијуму непосредно пре употребе.

2. Калцијум јонофор A23187 (произвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Испоручен је у виду прашка, количине 5 g који је чуван на +4°C. Пре употребе направљен је радни раствор концентрације 50 mg/mL додавањем 20 µL диметил сулфоксида (енг. *Dimethyl sulfoxide*, DMSO) (произвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). У експериментима је коришћен у концентрацији 10 µM (5,24 ng/mL) разблаживањем радног раствора у Локовом раствору.

4.1.2 Антитела и раствори коришћени у имунохистохемијској анализи ћелијске културе астроцита

4.1.2.1 Антитела

1. Зечије анти-пацовско антитело на глијални кисели фибриларни протеин (енг. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP), (произвођач: Abcam, Cambridge, ENG, UK). Антитело је чувано на -20°C до употребе. У експериментима је коришћено као примарно антитело, разблажено у односу 1:2000.



2. Зечије анти-пацовско антитело на CD11b молекулу (произвођач: Abcam, Cambridge, ENG, UK). Антитело је чувано на -20°C до употребе. У експериментима је коришћено као примарно антитело, разблажено у односу 1:2000.

3. Магареће анти-зечије антитело на лаке и тешке ланце имуноглобулина G обележено пероксидазом рена (енг. *Horse Radish Peroxidase*, HRP) (произвођач: Abcam, Cambridge, ENG, UK). Антитело је чувано на $+4^{\circ}\text{C}$ до употребе. У експериментима је коришћено као секундарно антитело, разблажено у односу 1:200.

4.1.2.2 Раствори

1. 100 % Ацетон (произвођач: Zorka, Šabac, Србија) је охлађен на -20°C и коришћен за фиксацију препарата.

2. TRIS пуфер (произвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) је коришћен за испирање препарата. Чуван је у виду концентрованог раствора на температури од $+4^{\circ}\text{C}$, пре употребе је разблажен 10 пута у дејонизованој води.

3. 3,3'-диаминобензидин (енг. *3,3'-diaminobenzidine*, DAB) супстрат комплет (произвођач: Abcam, Cambridge, ENG, UK). Комплет се састоји од DAB хромогена и DAB супстрата који су чувани на $+4^{\circ}\text{C}$ до употребе. Непосредно пре коришћења направљен је радни раствор мешањем 1,5 mL DAB супстрата и 30 μL DAB хромогена.

4.1.3 Комплекти и граничници („прајмери“) коришћени у анализи генске експресије

4.1.3.1 Комплекти

1. RNeasy Mini Kit (произвођач: Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) је коришћен за изолацију РНК молекула из узорака.

2. Sensiscript RT Kit (произвођач: Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) је коришћен за процес реверзне транскрипције.

3. QuantiTect SYBR Green PCR Kit (произвођач: Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) је коришћен за добијање PCR продуката.



4.1.3.2 „Прајмери”

Сви „прајмери” коришћени за анализу испољености гена, методом полимеразне ланчане реакције у стварном времену (енг. *Real Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) су произведени од стране Fermentas, Vilnius, Lithuania. Коришћени су следећи прајмери:

1. Пацовски GLT-1 (*GenBank* број: NM_017215.2):

5' АТТГАСТСССААСАССГ 3' (код),

5' САТТГГСССГССАГАГТТА 3' (антикод).

2. Пацовски GLAST (*GenBank* број: NM_019225.1):

5' ТАТАСАГТГАСАГТСАТССГТС 3' (код),

5' АСАААТСТГГТГАТГССГТ 3' (антикод).

3. Пацовска GS (*GenBank* број: NM_017073.3):

5' АГСГАСАТГТАССТССАТСС 3' (код),

5' ТАСАГСТГТГССТСАГГТТГ 3' (антикод).

4. Пацовски глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа (енг. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) (*GenBank* број: NM_017008.4):

5'-ТСАССАТСТТССАГГАГССАГ-3' (код)

5'-АСАГССТТГГСАГСАССАГТ-3' (антикод)

4.1.4 Комплекти коришћени за одређивање концентрације IL-17A

1. Хумани IL-17A ELISA (енг. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) комплет високе сензитивности 0,01 pg/mL (произвођач: eBioscience, San Diego, CA, USA). По упутствима произвођача комплет је до употребе чуван на температури +4 °C.



4.1.5 Реагенси коришћени за одређивање концентрације глутамата

4.1.5.1 Стационарна фаза

1. ZorbaxSB - C18 колона величине 3,0x150 mm (величина честица 3,5 μ m)
(произвођач: Agilent, Santa Clara, CA, USA)

4.1.5.2 Мобилна фаза

1. Растварач А – фосфатни пуфер (50 mM, pH 6,8) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)

2. Растварач Б – 100 % метанол (HPLC grade) (произвођач: JT Baker Avantor, Deventer, Netherlands)

4.1.5.3 Реагенси коришћени за припрему узорака

1. Перхлорна киселина (1 M) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)

2. Натријум карбонат (1 M) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)

3. Орто-Фталдиалдехид (енг. *Orto-Phthaldialdehyde*, OPA) раствор (37 mM):

- 20 mg OPA (произвођач: Fluka, St. Gallen, Switzerland)
- 3,6 mL Натријум-боратни пуфер (200 mM, pH 9,4) (произвођач: Zorka, Šabac, Srbija)
- 0,4 mL 100 % метанол (произвођач: JT Baker Avantor, Deventer, Netherlands)
- 35 μ L β -меркаптоетанол (произвођач: CalBiochem, La Jolla, CA, USA)

4. L-глутамат (≥ 99 %) (произвођач: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) је коришћен као екстерни стандард.



4.2 Клинички део истраживања

4.2.1 Пацијенти и клинички материјал

У студију је укључено укупно 79 испитаника, старости од 18 до 73 година, оба пола који су разврстани у две групе: контролна група и група пацијената оболелих од МС.

Контролна група је обухватила укупно 40 испитаника, 29 мушког и 11 женског пола, старости од 31 до 73 године, хоститализованих на Клиници за урологију, Клиничког Центра у Нишу, у периоду од октобра 2011. год. до јуна 2012. год. Пацијенти су били без претходне историје неуролошког обољења, којима је због извесне уролошке патологије рађена хируршка интервенција у спиналној анестезији. Током преоперативне припреме пацијента, узоркована је ЦС течност у запремини од 500 μL , лумбалном пункцијом у нивоу интервертебралног простора L4/L5 у седећем положају, пре давања анестетика у спинални простор.

Група пацијената оболелих од МС је обухватила 39 пацијената, 13 мушког и 26 женског пола, старости од 18 до 64 година, хоспитализованих на Клиници за неурологију, Клиничког Центра у Нишу, у периоду од октобра 2011. год. до августа 2012. год. Сви пацијенти су подвргнути лумбалној пункцији у дијагностичке сврхе и испуњавали *McDonald* критеријуме (ревизија 2010) за дијагнозу МС (Polman и сар. 2011). Одмах након лумбалне пункције у нивоу интервертебралног простора L4/L5 у седећем положају, 500 μL ЦС течности је одвојено за потребе истраживања, док је остатак коришћен за стандардне, прописане дијагностичке анализе. Студија је обухватила само пацијенте са релапсно-ремитентном формом болести у активној фази и присутним олигоклонским IgG тракама у ЦС течности, који према биохемијским параметрима крви нису имали акутну инфекцију и нису примали никакву имunosупресивну нити имуномодулаторну терапију у последња три месеца.

Непосредно након прикупљања, узорци ЦС течности су центрифугирани на $+4^{\circ}\text{C}$ (5 минута на 1500 обртаја по минути (енг. *revolutions per minute*, rpm)) и у року од 15 минута замрзнути на -80°C до спровођења даљих анализа.



Сви пацијенти су благовремено информисани о релевантним подацима који се тичу њиховог учешћа у студији и од њих је тражен пристанак за учешће у писаној форми. Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу под бројем 01-7289-5.

4.2.2 Методе

4.2.2.1 Анализа медицинске документације

Анализом медицинске документације о хоспитализацији пацијента прикупљени су подаци о:

- старости и полу пацијената.
- дужини трајања болести, која је праћена као временски интервал од појаве првог знака болести до хоспитализације када је извршено узорковање ЦС течности.
- клиничком статусу, који је одређен коришћењем стандардне EDSS скале (енг. *The Expanded Disability Status Scale, EDSS*) (Kurtzke 1983).
- годишњој стопи релапса болести, добијеној утврђивањем односа укупног броја релапса и дужине трајања болести изражене у годинама.
- фази болести, у којој се пацијент налазио при узорковању ЦС течности.
- времену од почетка релапса до момента узорковања ЦС течности.
- стандардним биохемијским анализама крви, које су обухватиле леукоцитарну формулу, вредности серумских албумина, имуноглобулина IgG и Ц-реактивног протеина (енг. *C-reactive protein, CRP*).
- стандардним биохемијским анализама ЦС течности, које су обухватиле вредности албумина, имуноглобулина IgG и хлорида.
- цитолошком прегледу ЦС течности, који је обухватио податке о укупном броју леукоцита као и диференцијалну леукоцитарну формулу.
- изоелектричном фокусирању ЦС течности, које је обухватило податке о присуству олигоклонских IgG трака.



- степену пропустљивости КМБ, који је добијен као процентуални однос албумина ЦС течности и серума пацијената.

4.2.2.2 Одређивање нивоа IL-17A у ЦС течности

Присуство Th-17 ћелија у ЦНС испитаника је праћено одређивањем нивоа IL-17A у ЦС течности, коришћењем комерцијалног ELISA комплета, према упутствима произвођача (eBioscience). Укратко, полистиренска микротитарска плоча, обложена антителима на хумани IL-17A, пре употребе испрана је четири пута пуфером за испирање. У све базене је додат разблаживач узорака у количини од 50 μL , потом 50 μL стандарда (рекомбинантни хумани IL-17A протеин) у двоструко опадајућим концентрацијама (15-0 pg/mL) у за то предвиђене базене и 50 μL узорка у преостале базене. Затим је у све базене додато 50 μL секундарног антитела (анти хумано IL-17A антитело обележено биотином), плоча је прекривена адхезивним филмом и уследила је инкубација током ноћи, у мраку, на собној температури. Плоча је потом испражњена, испрана шест пута и додато је 100 μL коњугата стрептавидина и пероксидазе рена (HRP) након чега је уследила друга инкубација у трајању од 1 часа, на собној температури уз непрестално мешање. Након поновног испирања додато је 100 μL амплификационог раствора I (биотинил-тирамид), који је након 15 минута уклоњен и додато је амплификациони раствор II (стрептавидин-HRP) у запремини од 100 μL . Након инкубације у трајању од 30 минута на собној температури уз мешање и поновног испирања, у све бунаре додато је хромогени супстрат у запремини од 100 μL . Наредна инкубација је трајала 20 минута у мраку, након чега је додато 100 μL „стоп” реагенса (фосфорна киселина, 1 M). Апсорбанца је читана на спектрофотометру (Multiskan Ascent 354 Microplate Photometer, произвођач: Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA) на таласној дужини од 450 nm. На основу апсорбанција стандарда конструисана је стандардна крива у компјутерском програму *TableCurve2D* (произвођач: AISN software, USA, ver. 4.0.0.0) у коме је израчуната концентрација IL-17A у јединицама pg/mL . Добијене вредности су дуплиране због почетног разблажења узорака. Граничне вредности за детектибилност IL-17A су биле 0,01 pg/mL .



4.2.2.3 Одређивање нивоа глутамата у ЦС течности

Екситотоксични процеси су праћени одређивањем нивоа глутамата у ЦС течности испитаника, методом течне хроматографије (енг. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), према раније описаним упутствима (Stover и сар. 1997). Коришћен је апарат *Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System* са флуоресцентним детектором серије 1200, подешен на таласну дужину 340 nm (за екситацију) и 445 nm (за емисију) (произвођач: Agilent, Santa Clara, CA, USA). Као стационарна фаза коришћена је *Zorbax SB-C18* колона, док мобилне фазе су биле у виду растварача А и Б. Након отапања, узорци ЦС течности у запремини од 150 μL су мешани са 30 μL перхлорне киселине и инкубирани на собној температури у трајању од 2 минута у циљу депротеинизације. Потом је извршена неутрализација додавањем 20 μL натријум карбоната, након чега су узорци центрифугирани 5 минута на 10000 rpm. Добијени супернатант у запремини од 100 μL је инкубиран са 100 μL ОРА у трајању од 2 минута како би се извршила дериватизација аминокиселина. За анализу апарат је користио 10 μL овако припремљеног узорка уз интензитет протока растварача А и Б од 0,6 mL по минути у различитом међусобном односу:

- 0-4 минута – 88-85 % растварача А и 12-15 % растварача Б
- 4-8 минута – 85-20 % растварача А и 15-80 % растварача Б
- 8-11 минута – 20 % растварача А и 80 % растварача Б
- 11-15 минута – 20-85 % растварача А и 80-15 % растварача Б
- 15-16 минута – 85-88 % растварача А и 15-12 % растварача Б

Температура колоне при извођењу анализа је била 40⁰С. Пре анализирања узорака извршена је анализа стандарда добијених растварањем л-глутамата у PBS у двоструко опадајућим концентрацијама (10-0 μM). Површина добијених пикова при анализирању стандарда познате концентрације је упоређивана са површином пикова узорака ЦС течности на основу чега је израчуната концентрација глутамата у узорку у јединицама μM .



4.3 Експериментални део истраживања

4.3.1 Материјал

Експериментални део студије је спроведен на примарној култури астроцита пацова добијеној према претходно описаној методи (McCarthy и de Vellis 1980), уз мање модификације. Истраживање је извршено у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду и уз одобрење Етичке комисије за добробит лабораторијских животиња из овог Института. Након декапитације пацова соја АО (енг. *Albino Oxford*) старости 1-3 дана, главе су потопљене у стаклену чашу са 70 % етанолом. У ламинару, извршено је отварање лобањске јаме у Петри шољи испуњеној етанолом, и изолован је велики мозак који је потом пребачен у чисту Петри шољу са стерилним PBS. Након уклањања крвних судова и можданица, ткиво мозга је механичким путем дисоцирано уз помоћ Пастерове пипете како би се добила суспензија ћелија, која је потом, пребачена у бочице за ћелијску културу, површине 25 cm². Ћелијама је додат оплемењени RPMI 1640 медијум до количине од 5 mL, након чега је уследила инкубација од 24 часа на 37°C у атмосфери засићеној воденом паром са 5 % угљен-диоксидом. Следећег дана је извршена замена медијума. Током тронедељне култивације ћелије су "пролазиле" кроз три трипсинизације које су вршене када је конфлуентност ћелија, процењена микроскопирањем, износила преко 95 %. Трипсинизације су спроведене на тај начин што је из бочица за ћелијску културу аспириран медијум а потом додат трипсин-EDTA раствор у количини од 1 mL. Након инкубације у трајању од 5 до 10 минута, микроскопирањем је проверено да ли су се ћелије одвојиле од подлоге, и у том случају је додато 3 mL медијума у циљу блокирања протеолитичког дејства трипсина. Ћелије су потом пребачене у пластичне епрувете запремине 50 mL и центрифугиране на 1000 rpm у трајању од 10-20 минута. Супернатант је аспириран, док су исталожене ћелије ресуспендоване са 5 mL медијума и разливене у чисте бочице за ћелијску културу, након чега је додат медијум и настављена инкубација. Након треће трипсинизације, испитана је хомогеност добијене ћелијске популације имунохистохемијском методом, и потом су ћелије коришћене у истраживању.



Имунохистохемијска провера хомогености ћелијске културе астроцита се заснивала на одређивању процента ћелија које испољавају астроцитни маркер GFAP и маркер микроглијалних ћелија (CD11b молекула). Направљени су размази ћелија на плочицама обложеним поли-L-лизином (енг. *SuperFrost*), који су фиксирани на ваздуху у трајању од 24 часа, након чега је уследила кратка фиксација у 100 % етанолу у трајању од 2-3 минута. Након фиксације, размази ћелија су три пута испрани TRIS пуфером и потом, преко ноћи на температури од +4°C, инкубирани са примарним антителом (зечијим анти-пацовским GFAP или анти-CD11b антителом). Након поновног испирања у TRIS пуферу у циљу уклањања невезаних антитела, уследила је инкубација са секундарним антителом (анти-зечијим антителом обележеним ензимом HRP) у трајању од 1 часа на собној температури. Размазима је потом додат хромогени супстрат, DAB и након 10-ак минута испрани су у TRIS пуферу. Приликом микроскопирања (увећање x20) начињене су дигиталне фотографије које су потом анализирани у програму *ImageJ* (произвођач: NIH, USA, ver. 1.44p) у циљу одређивања процента GFAP и CD11b позитивних ћелија, односно процената астроцита и микроглијалних ћелија у култури.

4.3.2 Методе

4.3.2.1 Испитивање способности астроцита да преузимају и метаболишу глутамат

У циљу испитивања ефеката IL-17A на способност астроцита да преузимају и метаболишу глутамат, астроцити су култивисани у плочама са по 6 базена (3×10^5 ћелија по базену), након чега су третирани пацовским рекомбинантним IL-17A цитокином у растућим концентрацијама од 10; 25; 50; 100 ng/mL. Након инкубационог периода од 12 часова, ћелије су прикупљене и одређен је степен експресије гена за глутаматске транспортере (GLAST и GLT-1) у циљу испитивања ефеката IL-17A на способност астроцита да преузимају глутамат из ванћелијског простора. Такође је одређен и степен испољености гена за глутамин синтазу у циљу процене способности астроцита да метаболишу глутамат, односно конвертују глутамат у нетоксични глутамин. Експресија гена за GLAST, GLT-1 и глутамин синтазу је одређивана RT-PCR методом. Из ћелија је најпре изолована целокупна количина РНК



молекула коришћењем *RNeasy Mini* комплета у складу са инструкцијама произвођача. Укратко, након аспирације медијума, астроцитима је додат пуфер за лизу ћелија (енг. *RLT buffer*) у запремини 350 μL по базену. Ћелијски лизат је потом пребачен у микроепрувете и помешан на аутоматској мешалици („вортексиран“) 1 минут како би се извршила хомогенизација узорка. Након додавања 350 μL 70 % етанола, узорак је измешан учесталим пипетирањем и пребачен на колону за изолацију РНК молекула, која је постављена у колекциону микроепрувету и центрифугирана на 10000 rpm у трајању од 15 секунди. Потом је додато 700 μL пуфера (енг. *RWI buffer*) и колона је поново центрифугирана на 10000 rpm у трајању од 15 секунди. Након додавања 500 μL пуфера за испирање (енг. *RPE buffer*) уследило је још једно центрифугирање на 10000 rpm у трајању од 15 секунди. Овај корак је поновљен два пута с тим што је друго центрифугирање трајало 2 минута. Колона је потом пребачена у чисту колекциону микроепрувету и додато јој је 50 μL воде (енг. *RNase-free water*). Након центрифугирања од 1 минута на 10000 rpm , елуат у колекционој микроепрувети, у коме су изоловани РНК молекули из узорка, је даље коришћен за реверзну транскрипцију. Реверзна транскрипција је спроведена употребом *Sensiscript RT* комплет. Направљена је смеша за реверзну транскрипцију (енг. *Master mix*) мешањем:

- 2 μL пуфера за реверзну транскрипцију (енг. *10x RT buffer*),
- 2 μL мешавине дезоксинуклеотид трифосфата (енг. *dNTP Mix*), свака азотна база је била концентрације 5 mM ,
- 2 μL наизменичних секвенци олигонуклеотида (енг. *oligo(dT) primers*), концентрације 10 μM ,
- 1 μL инхибитора ензима РНазе (енг. *RNase-inhibitor*) у концентрацији 10 $\text{U}/\mu\text{L}$,
- 1 μL реверзне транскриптазе (енг. *Sensiscript Reverse Transcriptase*) и
- 12 μL воде (енг. *RNase-free water*).

Након „вортексирања“ у трајању од 5 секунди, смеси је додат раствор претходно изолованих РНК молекула и уследила је инкубација у трајању од 60 минута на температури од 37°C. Током овог процеса, у присуству реверзне транскриптазе дошло је до синтезе једноланчаног ДНК молекула (цДНК молекула) на копији РНК молекула. Ланци цДНК су даље умножени, коришћењем *QuantiTect SYBR Green PCR* комплета. У 25 μL реакционе смеше за PCR (енг. *PCR master mix*) додат је узорак са



цДНК (<500 ng по реакцији) и граничници („прајмери“) за GAPDH, GLAST, GLT-1 и глутамин синтетазу тако да њихова концентрација буде 0,3 μM . Реакционој смеши је додата вода (енг. *RNase-free water*) до укупне запремине од 50 μL . Анализа узорака је извршена на апарату *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (произвођач: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Примењени услови PCR реакције су били у виду иницијалног корака у трајању од 5 минута на 50°C, након чега је уследио корак у трајању од 10 минута на 95°C. Потом је примењен PCR програм у два корака на 95°C, 15 секунди и 60°C у трајању од 60 секунди за укупно 40 циклуса. Добијени PCR производи су детектовани симултано (у стварном времену), и резултати су интерпретирани коришћењем предвиђеног програма PCR апарата (*7500 System Software AB*). Резултати су приказани као $2^{-\Delta\text{Ct}}$ вредности, при чему је ΔCt разлика Ct вредности гена од интереса и Ct вредности интерне контроле, у овом случају "house-keeping" гена GAPDH.

4.3.2.2 Испитивање способности астроцита да секретују глутамат

У циљу испитивања утицаја IL-17A на способност астроцита да секретују глутамат, астроцити су култивисани у плочама са по 6 бунара (1×10^6 ћелија по бунару), након чега су третирани пацовским рекомбинантним IL-17A протеином у концентрацијама од 0, 50 и 100 ng/mL. Након инкубационог периода од 12 часова, уклоњен је култивациони медијум, ћелије су накратко испране, а потом и инкубиране у Локовом раствору. Раствор је мењан два пута у интервалу од по 2 минута и ћелијски супернатанти прикупљени у овој фази су коришћени за испитивање базалног нивоа секреције глутамата третираних и нетретираних ћелија. Ћелијама је потом додат Локов раствор са калцијум јонофором A23187 (10 μM) који је мењан три пута на свака 2 минута. Супернатанти прикупљени у овој фази су коришћени за испитивање стимулисаног нивоа секреције глутамата, јер калцијум јонофор стимулише астроците на секрецију глутамата повећањем нивоа унутарћелијског Ca^{2+} . Другој групи третираних и нетретираних ћелија је додат Локов раствор без Ca^{2+} који је такође мењан три пута на свака 2 минута. Супернатанти прикупљени у овој фази су коришћени за испитивање ефеката IL-17A на ниво секреције глутамата у условима смањеног ванћелијског Ca^{2+} . До одређивања ниво глутамата HPLC методом, прикупљени



ћелијски супернатанти су чувани на температури од -80°C . Сама HPLC анализа је спроведена на исти начин као код одређивања глутамата у ЦС течности, описаном у одељку 3.2.2.3, с'тим што није примењиван корак депротеинизације и неутрализације имајући у виду низак протеински садржај узорака.

4.4 Статистичка обрада података

Целокупна статистичка обрада података је извршена у компјутерском програму SPSS 17.0 (произвођач: SPSSInc., Chicago, IL, USA). Првенствено је испитана дистрибуција добијених вредности применом *Shapiro-Wilk* теста. С'обзиром да су подаци били асиметричне дистрибуције, целокупна дескриптивна анализа мерених параметара је обухватила мере централне тенденције у виду медијане и опсега. Испитивање разлика између група је спроведено применом *Mann-Whitney U* теста, док групна међузависност је испитивана применом *Spearman* непараметријског теста корелације. Добијене Р вредности су сматране статистички значајним уколико су биле мање од 0,05.

5 Резултати истраживања



5.1 Клинички део истраживања

5.1.1 Анализа медицинске документације

Анализом медицинске документације о хоспитализацији пацијената прикупљени су подаци приказани на *Табели 2.*, који су потом коришћени за упоређивање са параметрима мереним у ЦС течности испитаника.

Табела 2. Клиничке карактеристике пацијената оболелих од МС и здравих испитаника

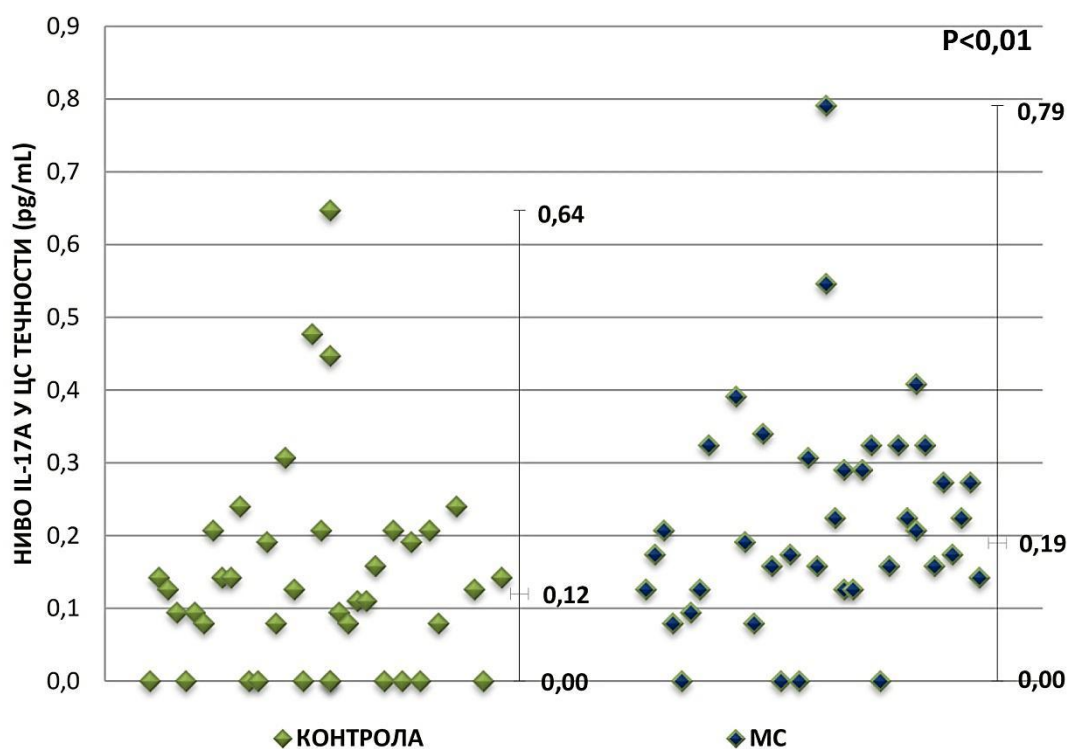
	МС група (n=39)	Контролна група (n=40)
Клиничке карактеристике	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)
Пол (мушки/женски)	13/26	29/11
Године старости	40 (18-64)	65 (31-73)
Трајање болести (у годинама)	1 (0,08-11)	/
Клинички статус (EDSS скор)	3,5 (1-7)	/
Фаза болести	релапс	/
Годишња стопа релапса	1 (0,36-2)	/
Време од почетка релапса до узорковања ЦС течности (у данима)	7 (1-14)	/
Анализе крви	Медијана (опсег)	Реф^а
Леукоцити (x10 ⁹ /L)	7,20 (4,14-11,20)	3,90-10,00 /
Неутрофили (x10 ⁹ /L)	4,15 (1,92-8,80)	1,60-7,00 /
Моноцити (x10 ⁹ /L)	0,55 (0,28-1,20)	0,10-1,00 /
Лимфоцити (x10 ⁹ /L)	2,20 (1,11-3,36)	0,80-5,00 /
CRP (mg/L)	0,60 (0,20-7,40)	0,00-5,00 /
Анализе ЦС течности	Медијана (опсег)	Реф^а
Леукоцити (/μL):	6 (0-26)	<5 /
Неутрофили (%) или (/μL)	6 (0-23) или 1 (0-6)	0-3 или 0 /
Моноцити (%) или (/μL)	20 (0-42) или 1 (0-8)	20-40 или 0-2 /
Лимфоцити (%) или (/μL)	67 (0-96) или 2 (0-17)	60-80 или 0-4 /
Пропустљивост КМБ (%)	1,16 (0,49-2,21)	<0,70 /
Олигоклонске IgG траке	присутне	одсутне /

^аРеферентне вредности према Центру за медицинску биохемију, Клинички центар, Ниш, Србија



5.1.2 Одређивање нивоа IL-17A у ЦС течности

Присуство Th-17 ћелија у ЦНС испитаника је праћено одређивањем нивоа IL-17A у ЦС течности. У групи оболелих од МС, вредности IL-17A нису биле детектабилне у 10,26% испитаника, док у контролној групи испитаника тај проценат је износио 25%. Показано је да пацијенти који болују од МС имају статистички значајно веће вредности овог цитокина у односу на контролну групу испитаника ($P=0,003$). Вредности концентрација IL-17A у ЦС течности оболелих од МС и контролних испитаника са мерама централне тенденције (медијана и опсег) су приказане на *Графикону 1*.



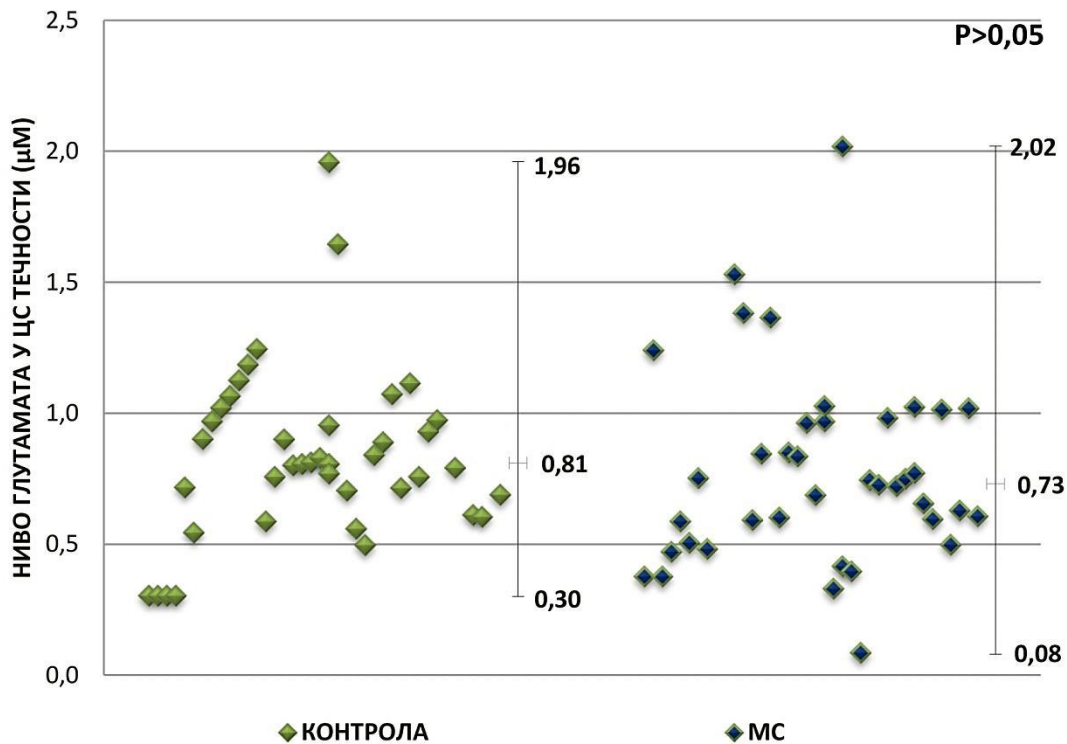
Графикон 1. Ниво IL-17A у ЦС течности контролне групе и групе испитаника оболелих од МС

5.1.3 Одређивање нивоа глутамата у ЦС течности

Екситотоксични процеси у ЦНС испитаника су праћени одређивањем нивоа глутамата у ЦС течности. Испитивање је показало да не постоји статистички значајна разлика у нивоу глутамата између групе пацијената оболелих од МС и контролне групе



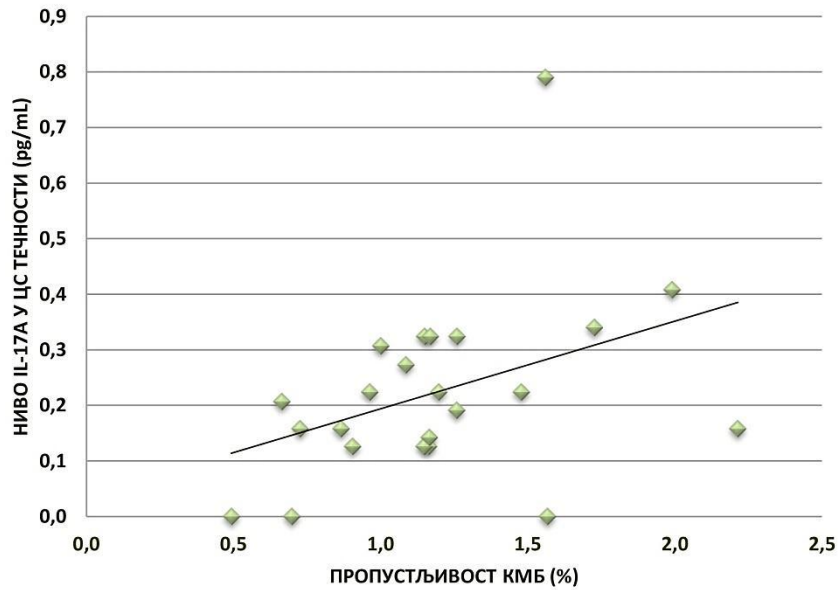
($P > 0,05$). Вредности глутамата у ЦС течности оболелих од МС и контролних испитаника са мерама централне тенденције (медијана и опсег) су приказане на *Графикону 2*.



Графикон 2. Ниво глутамата у ЦС течности контролне групе и групе испитаника оболелих од МС

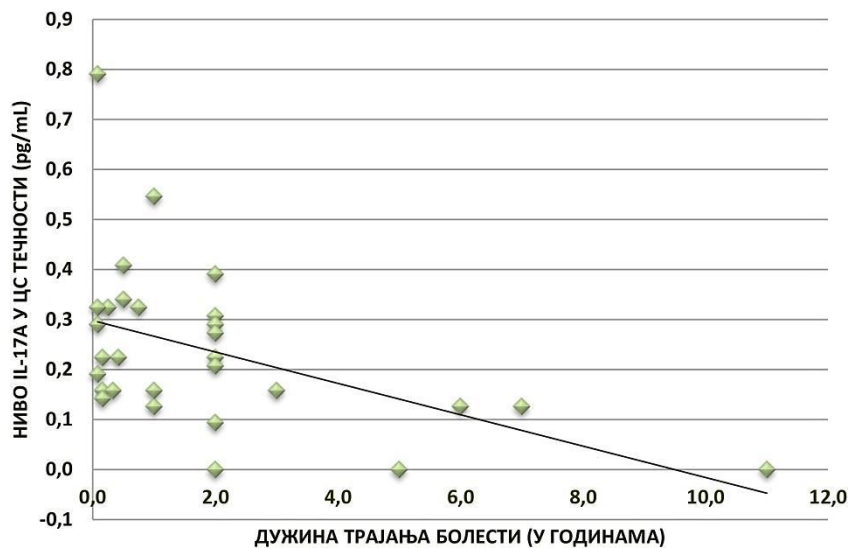
5.1.4 Компаративне анализе

Вредности IL-17A у ЦС течности пацијената оболелих од МС су упоређиване са вредностима глутамата и прикупљеним клиничким параметрима. Установљено је да постоји статистички значајна, директна позитивна повезаност између нивоа IL-17A и глутамата ($r_s=0,368$; $P < 0,05$), приказана на *Графикону 3*.



Графикон 5. Корелација нивоа IL-17A и пропустљивости КМБ пацијената оболелих од МС

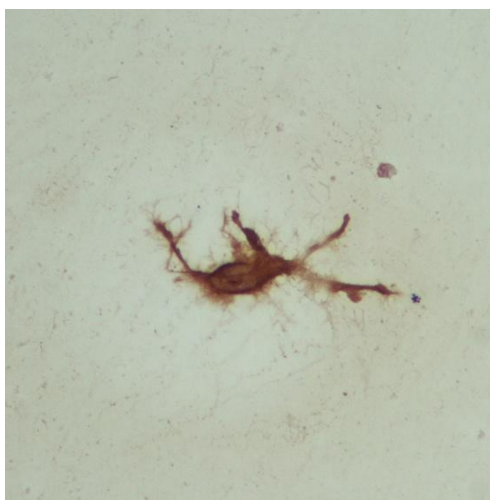
Интересантан налаз је да дужина трајања болести негативно корелира са концентрацијом IL-17A ($r_s = -0,466$; $P < 0,01$) (Графикон 6.) и бројем неутрофила ($r_s = -0,632$; $P < 0,01$) (Графикон 7.) у ЦС течности оболелих.



5.2 Експериментални део истраживања

5.2.1 Испитивање хомогености културе астроцита пацова

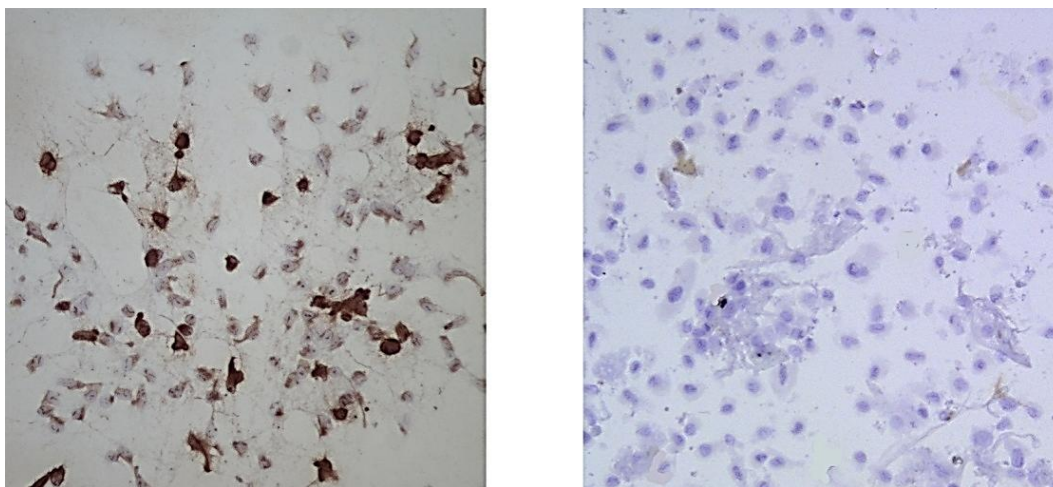
Експериментални део истраживања је спроведен на ћелијској култури астроцита пацова. Астроцити су добијени из неонаталних мозгова АО пацова, како је описано у поглављу Материјал и методе. Након култивације је извршена микроскопска анализа морфолошких карактеристика ћелијских култура. Доминантну популацију су чиниле ћелије са бројним разгранатим цитоплазматским наставцима, крупних једара и оскудне цитоплазме које су изгледом одговарале протоплазматским астроцитима сиве масе можданог паренхима. Имунохистохемијска анализа је потврдила да су ћелије у култури позитивне на GFAP протеин - основни астроцитни маркер (Слика 5.).



Слика 5. Астроцит у ћелијској култури, имунохистохемијско бојење на GFAP протеин – увећање x40

Такође је испитана хомогеност добијене ћелијске културе астроцита како би се искључила могућа контаминација микроглијалним ћелијама. Примењена је имунохистохемијска метода у циљу одређивања процента GFAP и CD11b позитивних ћелија. Установљено је да су астроцити (GFAP позитивне ћелије) у култури били заступљени са 95 - 97%, док су микроглијалне ћелије (CD11b позитивне ћелије) биле

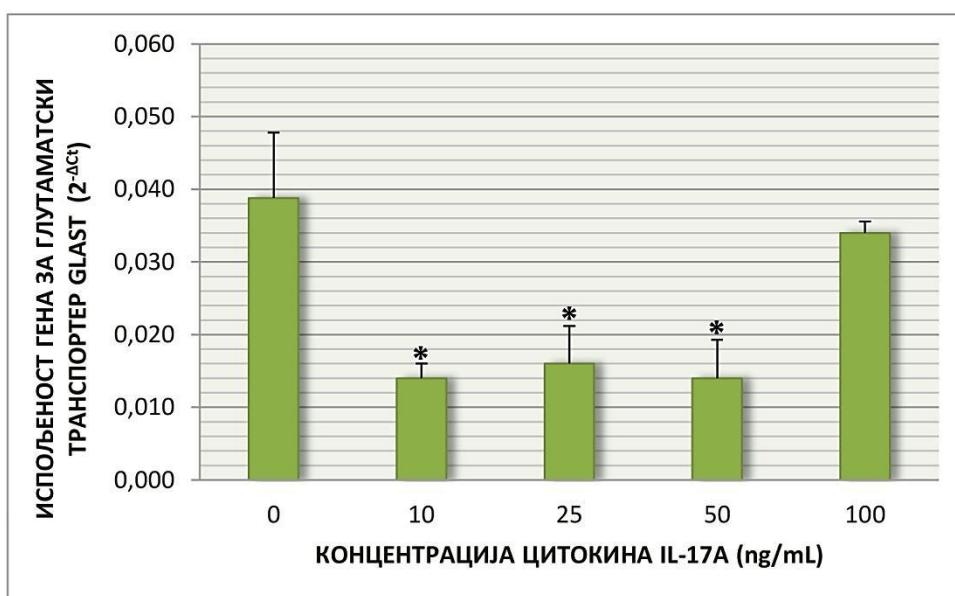
заступљене са 3 - 5%, што је указивало на изражену хомогеност добијене ћелијске културе (Слика 6.).



Слика 6. Ћелијска култура астроцита, имунохистохемијско бојење на GFAP (лево) и CD11b (десно) - увећање x20

5.2.2 Испитивање способности астроцита да преузимају глутамат

Испитивање утицаја IL-17A на способност астроцита да преузимају глутамат је извршено одређивањем релативне експресије гена за глутаматске транспортере.

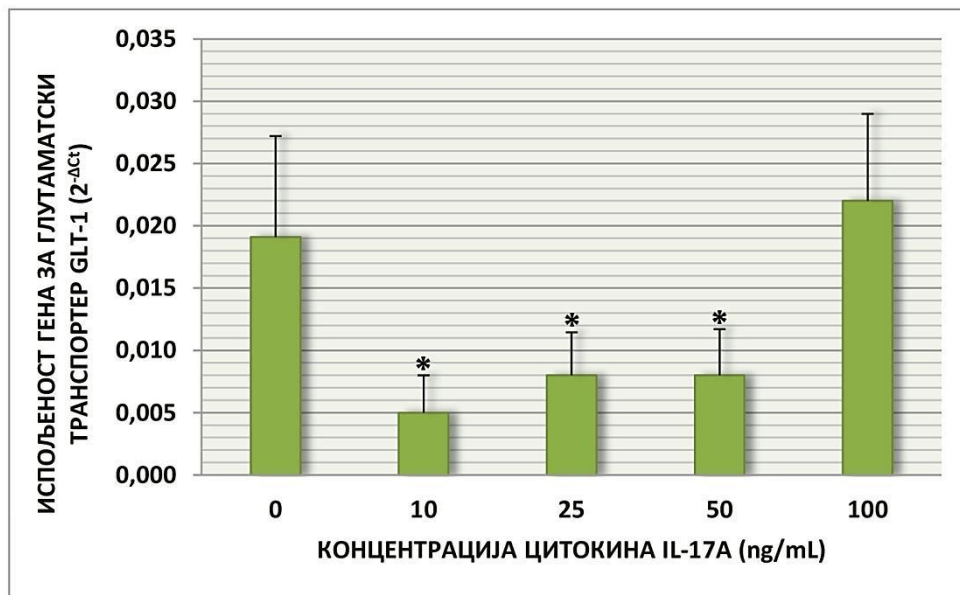


Графикон 8. Утицај IL-17A на експресију гена за глутаматски транспортер GLAST (*P<0,05 у односу на контролу без IL-17A)



Показано је да IL-17A у нижим концентрацијама (10, 25, 50 ng/mL) смањује релативну експресију гена за транспортер GLAST. Интересантно, у ћелијским културама које су биле третиране највишом концентрацијом IL-17A (100 ng/mL), нису забележене значајне промене у степену експресије гена за овај глутаматски транспортер (Графикон 8.).

Интерлеукин 17A је остварио сличне ефекте деловања и на степен експресије гена за транспортер GLT-1. Ћелијске културе астроцита третиране нижим концентрацијама IL-17A (10, 25, 50 ng/mL) имале су значајно слабију експресију гена за транспортер GLT-1 у односу на нетретиране, контролне ћелијске културе. Као и у претходном експерименту, супресивни ефекат IL-17A на степен испољености гена за GLT-1 није забележен у ћелијским културама које су стимулисане највећом дозом IL-17A (100 ng/mL) (Графикон 9.).



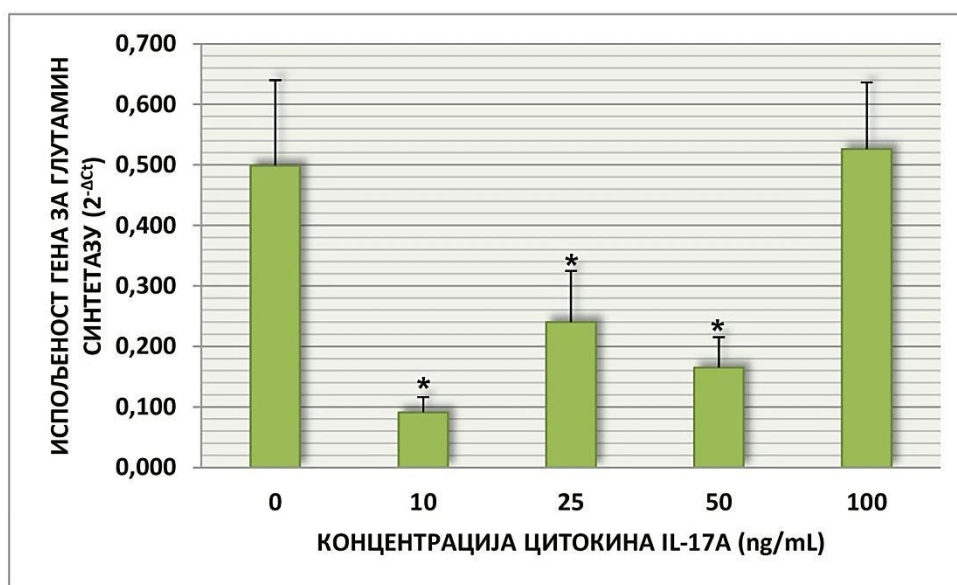
Графикон 9. Утицај IL-17A на експресију гена за глутаматски транспортер GLT-1 (* $P < 0,05$ у односу на контролу без IL-17A)

5.2.3 Испитивање способности астроцита да метаболишу глутамат

Утицај IL-17A на способност астроцита да метаболишу глутамат је праћен променама у експресији гена за ензим глутамин синтетазу, који је укључен у процес



конверзије глутамата у нетоксични глутамин. Притом је забележен сличан тренд као и код глутаматских транспортера, односно ниже концентрације IL-17A су смањиле степен експресије гена за глутамин синтетазу у астроцитима, док највећа концентрација (100 ng/mL) није довела до статистички значајне промене у степену експресије овог гена (Графикон 10.).

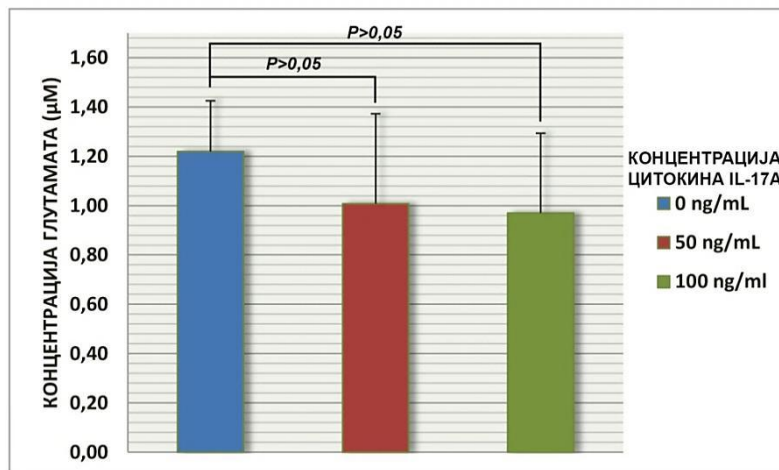


Графикон 10. Утицај IL-17A на експресију гена за глутамин синтетазу (* $P < 0,05$ у односу на контролу без IL-17A)

5.2.4 Испитивање способности астроцита да секретују глутамат

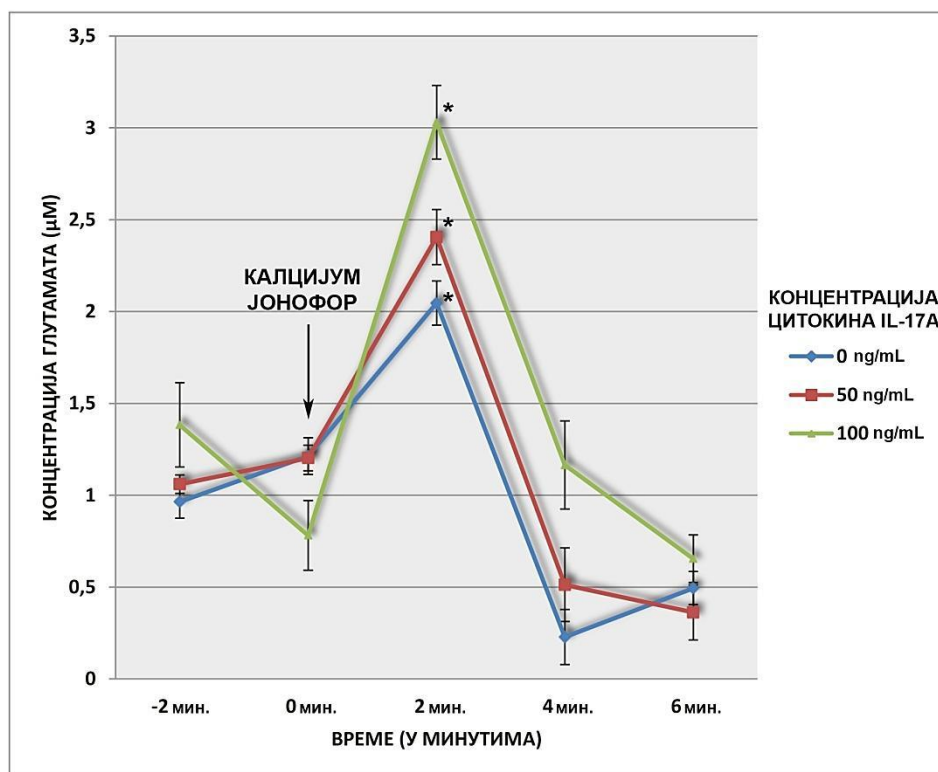
Утицај IL-17A на способност астроцита да секретују глутамат је испитиван одређивањем концентрације глутамата у супернатанту културе астроцита, у базалним и стимулираним условима.

У базалним условима, испитивање ефеката IL-17A на ослобађање глутамата је спроведено упоређивањем нивоа глутамата у супернатантима ћелијских култура астроцита са и без IL-17A. Базални услови су постигнути инкубацијом астроцита у изотонном Локовом раствору са јонима Ca^{2+} . Показано је да у базалним условима, IL-17A значајније не мења ослобађање глутамата у астроцитима (Графикон 11.).



Графикон 11. Ефекти IL-17A на секрецију глутамата у астроцитима - базални услови

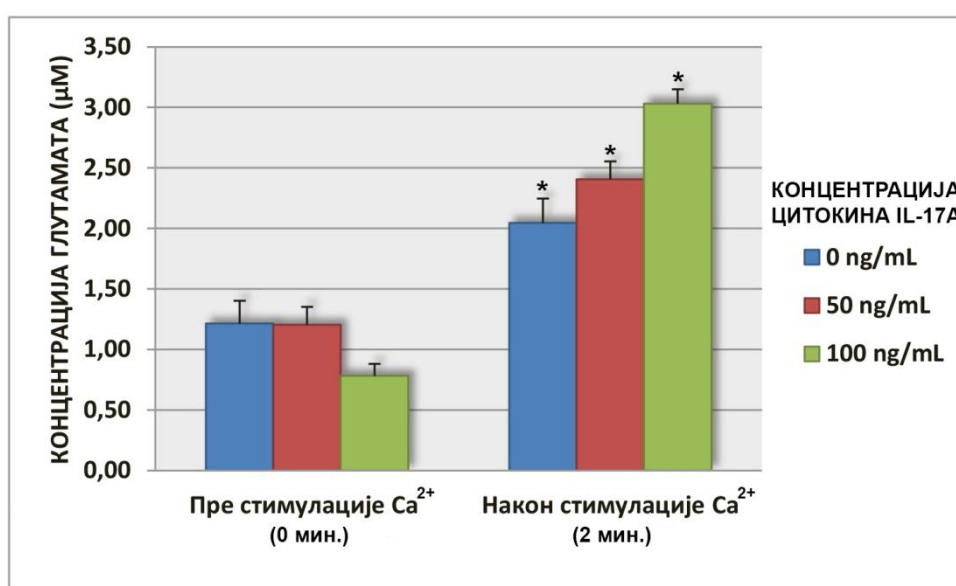
Испитивање ефеката IL-17A на секрецију глутамата је спроведено и након стимулације култура астроцита јонима Ca^{2+} .



Графикон 12. Ефекти IL-17A на секрецију глутамата након стимулације астроцита јонима Ca^{2+}
(* $P < 0,05$ у односу на вредности у 0 мин.)

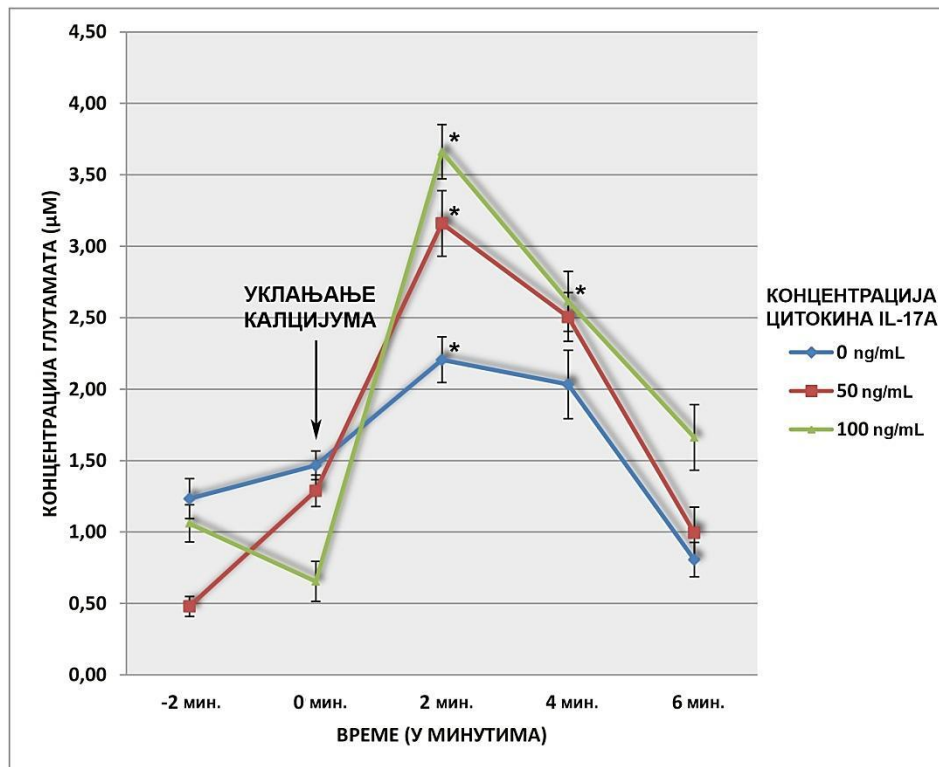


Овакви услови су постигнути краткотрајном инкубацијом астроцита у Локовом раствору са јонима Ca^{2+} уз присуство калцијум јонофора, који мобилише овај јон из ванћелијског у унутарћелијски простор. При том IL-17A је довео до повећаног ослобађања глутамата. Најизраженији пораст секреције је забележен у 2. мин. након стимулације, док у 4. и 6. мин. ниво глутамата у ћелијском супернатанту је био у границама базалних вредности (Графикон 12). У 2. мин. након стимулације уочен је дозно зависан ефекат IL-17A на секрецију глутамата (Графикон 13.).

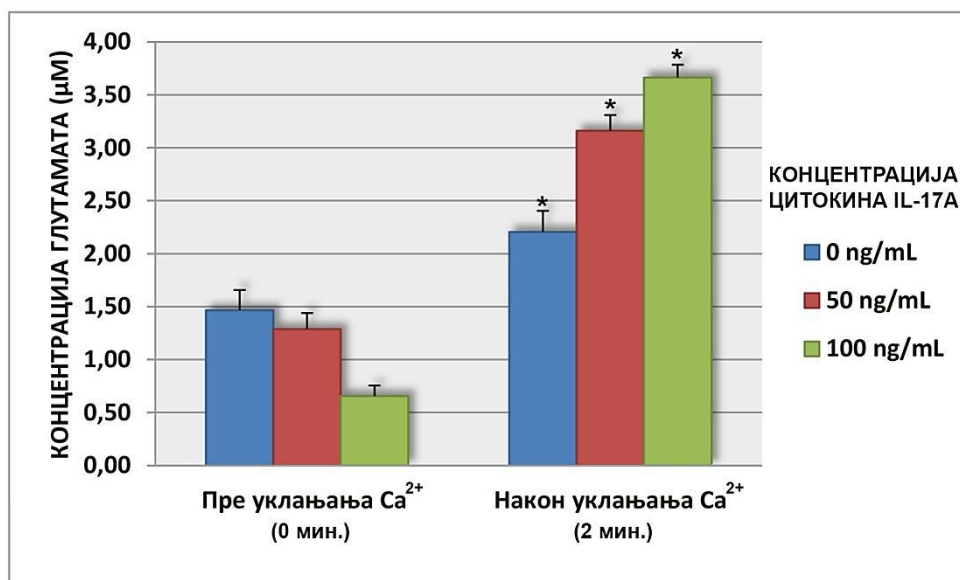


Графикон 13. Дозно зависни ефекти IL-17A на секрецију глутамата, након стимулације астроцита јонима Ca^{2+} (* $P < 0,05$ у односу на адекватне контролне вредности у 0 мин.)

Уочено је да IL-17A увећава глутаматску секрецију и након уклањања јона Ca^{2+} из култивационог медијума, што је постигнуто краткотрајним испирањем и инкубацијом астроцита у Локовом раствору без јона Ca^{2+} . Највећи пораст глутаматске секреције је био у 2. мин. У 4. мин. вредности глутамата у ћелијском супернатанту су и даље биле повећане, док у 6. мин. није било статистички значајне разлике у односу на базалне вредности (Графикон 14.). У 2. мин. стимулација глутаматске секреције је такође зависила од примењене дозе IL-17A (Графикон 15.).



Графикон 14. Ефекти IL-17A на секрецију глутамата након уклањања јонима Ca^{2+} из култивационог медијума астроцита (* $P < 0,05$ у односу на вредности у 0 мин.)



Графикон 15. Дозно зависни ефекти IL-17A на секрецију глутамата након уклањања јонима Ca^{2+} из култивационог медијума астроцита (* $P < 0,05$ у односу на адекватне контролне вредности у 0 мин.)

6 Дискусија



6.1 Пацијенти оболели од МС имају повишен ниво IL-17A у ЦС течности

Данас је опште прихваћен став да мијелин-специфични CD4⁺ Т лимфоцити имају централну улогу у демиелинизацијским процесима у МС, међутим и даље постоје контраверзе о цитокинском профилу и типу ових лимфоцита. Th-1 ћелије, су првобитно сматране основном патогеном линијом CD4⁺ Т лимфоцита, али све већи број истраживања указује на значај новооткривених Th-17 ћелије у настанку болести (Lock и сар. 2002, Tzartos и сар. 2008, Montes и сар. 2009).

Основни продукт секреције Th-17 ћелија је цитокин IL-17A, и повишене вредности овог цитокина су заиста забележене у серуму пацијената оболелих од МС (Babaloo и сар. 2013). Имајући у виду специфичност можданог одељка који је од остатка организма издвојен КМБ, у нашој студији ниво IL-17A је одређиван у ЦС течности, која веродостојније рефлектује дешавања у ЦНС. Притом је показано да пацијенти са релапсно-ремитентним типом МС у фази релапса имају повишене вредности IL-17A у односу на контролну групу испитаника (*Графикон 1.*), што указује на значај овог цитокина у настанку болести. Слични резултати су забележени и у истраживању *Ishizu* и сарадника, међутим, њихов налаз је био ограничен само на специфичну форму оптико-спиналне МС (*Ishizu* и сар. 2005). Новија студија спроведена од стране *Matsushita* и сарадника је показала да пацијенти оболели од оптичког неуромијелитиса имају повишене вредности IL-17A у ЦС течности, али не и пацијенти са релапсно-ремитентним типом МС (*Matsushita* и сар. 2013). Имајући у виду да је наше истраживање стриктно искључило пацијенте са оптичким неуромијелитом, који некада може бити диференцијално дијагностички проблем у односу на МС, објашњење за овакво неслагање се може наћи у дужини трајања болести пацијената обухваћених истраживањем. Наиме, у студији *Matsushita* и сарадника просечна дужина трајања болести је износила 8 година док у нашој, пацијенти су били у раном стадијуму МС са просечном дужином трајања од свега 1 године (*Табела 2.*). С'обзиром да смо показали да се вредности IL-17A у ЦС течности прогресивно смањују са трајањем болести (*Графикон б.*), могуће је да IL-17A и Th-17 имунски одговор има већи значај у настанку и раном стадијуму развоја МС у односу на каснију



прогресију болести. Овакво запажање је и раније забележено - конкретно, мононуклеарне ћелије изоловане из периферне крви пацијената са раном МС, продукују значајно већу количину IL-17A у односу на мононуклеарне ћелије пацијената у поодмаклом стадијуму болести (Grabec и сар. 2008). Иницијална укљученост IL-17A у патогенезу МС уједно може бити разлог због чега бројне клиничке студије лекова који циљају Th-17 ћелије у касној фази болести нису показале повољне терапијске ефекте. Vollmer и сарадници су испитивали терапијску ефикасност моноклонског антитела на p40 субјединицу рецептора за цитокин IL-23, који подстиче и стабилизује фенотип Th-17 ћелија. Пацијенти обухваћени овом студијом су имали просечну дужину трајања МС од 8 година, и код њих није откривена клиничка корист од овакве терапије (Vollmer и сар. 2011).

Показано повећање ниво IL-17A у групи испитаника оболелих од МС, може бити последица миграције Th-17 ћелија у структуре ЦНС, с'обзиром да је и учесталост ових ћелија у ЦС течности током релапса, вишеструко већа у односу на здраву популацију (Brucklacher-Waldert и сар. 2009). Међутим, иако је IL-17A основни продукт секреције Th-17 ћелија, бројне друге ћелије које се доводе у везу са патогенезом МС, такође могу бити извор овог цитокина, укључујући CD8⁺ Т ћелије (Ciric и сар. 2009), γδ Т лимфоците (Lockhart и сар. 2006), Т ћелије природне убице (Rachitskaya и сар. 2008), ћелије природне убице (Cupedo и сар. 2009), моноците (Starnes и сар. 2001), микроглијалне ћелије (Kawanokuchi и сар. 2008), неутрофиле (Ferretti и сар. 2003), астроците и олигодендроците (Tzartos и сар. 2008).

Постоји више предложених начина којима би IL-17A могао посредовати у настанку МС. Првенствено, IL-17A своје ефекте деловања остварује везујући се за мембрански рецептор (IL-17RA) који је испољен на површини различитих ћелија. На свом унутарћелијском делу рецептор поседује конзервисани домен сличан фактору раста фибробласта – (енг. *Similar expression to fibroblast growth factor genes interleukine receptor*, SEFIR). Након стимулације, он се везује за Е3 убиквитин лигазу Act1 (енг. *Act1 ligase*, Act1), која потом активира адаптивни протеин удружен са рецептором за TNF (енг. *TNF receptor associated factor 6*, TRAF6). Активисани TRAF6, преко киназе TAK1 (енг. *TGF-β activated kinase-1*, TAK1), посредује у активацији транскрипционог фактора – нуклеарни фактор κB (енг. *Nuclear factor-κB*, NF-κB). Поред NF-κB, IL-17A може да покрене и митогенима активирани протеин киназни пут (енг. *Mitogen-activated*



protein, MAP), пут јанус киназа/ преносиоци сигнала и активатори транскрипције (енг. *Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription*, JAK/STAT), фосфатидил инозитол 3 киназа/ Акт протеин пут (енг. *Phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt protein*, PI3K/Akt) и пут ЦЦААТТ везујућих протеина (енг. *CCAAT-enhancer-binding proteins*, C/EBP) у ћелији, који скупа доводе до појачане експресије гена за бројне солубилне медијаторе, цитокине и хемокине као и матриксне металопроотеиназе који доприносе настанку проинфламацијске средине (Song и Qian 2013). У ЦНС, рецептор за IL-17A је конститутивно испољен на различитим ћелијским популацијама можданог ткива, укључујући ендотелне ћелије крвних капилара, астроците, микроглијалне ћелије и олигодендроците, а интересантно је да се током ЕАЕ испољеност овог рецептора у мозгу вишеструко увећава (Kebir и сар. 2007, Das Sarma и сар. 2009).

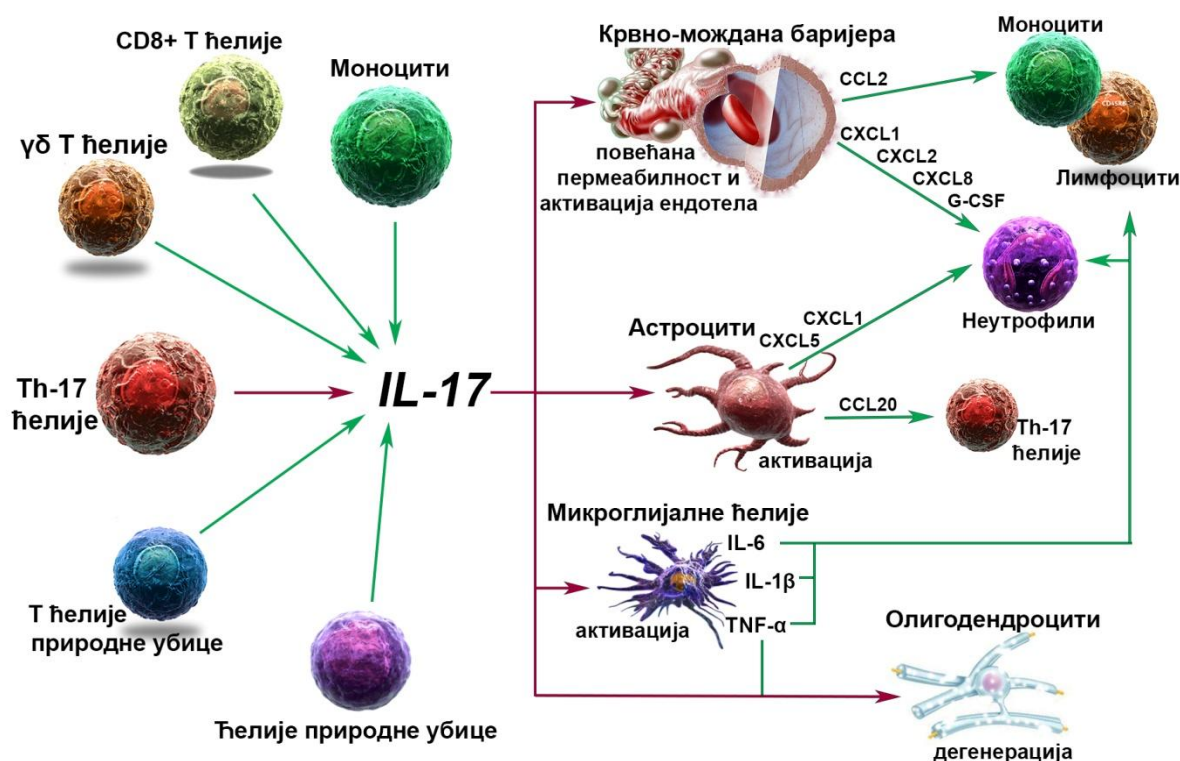
Стимулацијом ендотелних ћелија крвних капилара, IL-17A подстиче ослобађање бројних проинфламацијских медијатора укључујући хемокине CXCL1, CXCL2, CXCL8 и фактор раста G-CSF, који доводе до појачане мобилизације запаљенских ћелија, пре свега неутрофила у мoждани паренхим (Ouyang и сар. 2008, Carlson и сар. 2008, Pelletier и сар. 2010). Резултати наше студије су такође указали на директну повезаност нивоа IL-17A са бројем неутрофила у ЦС течности (*Графикон 4.*), али и тенденцију смањења њиховог броја са повећањем дужине трајања болести (*Графикон 7.*). Иницијална укљученост неутрофила и њихов значај у пропагацији аутоимунског процеса у ЦНС је претпостављен и раније у раду Nygårdas и сарадника, међутим, њихов налаз до сада није сагледаван са аспекта Th-17 имунског одговора (Nygårdas и сар. 2000). Неутрофили би заиста могли имати значајну улогу у раној фази развоја МС, имајућу у виду да је обимна инфилтрација неутрофила запажена у ткиву кичмене мождине током акутне фазе ЕАЕ, управо на местима где су најизраженији процеси демиелинизације и аксоналне дегенерације (Wu и сар. 2010). Касније је показано да су неутрофили, поред тога што су бројнији у крви пацијената оболелих од МС, више активисани у односу на здраву популацију, с'обзиром да појачано испољавају рецепторе за хемокине, имају повећану способност дегранулације и ослобађања реактивних метаболита кисеоника (Naegele и сар. 2012). Интерлеукин 17A стимулише ендотелне ћелије да ослобађају медијаторе који поред неутрофила мобилишу и друге ћелије крви. Такав је случај са CCL2 и IL-6 који привлаче моноците и лимфоците (Kebir и сар. 2007). Поред снажне мобилизације ћелија запаљења, IL-17A,



посредством ендотела, олакшава и трансмиграцију ових ћелија преко КМБ у мождани паренхим. Имајући у виду директну повезаност нивоа IL-17A у ЦС течности са степеном пропустљивости КМБ (*Графикон 5.*), наши резултати указују да IL-17A посредује у процесима који за последицу имају поремећај нормалног функционисања ове баријере. Поремећај пропустљивости КМБ се сматра раним и изузетно важним дешавањем током настанка МС, јер омогућава продор већег броја запаљенских ћелија у ЦНС, што је основни предуслов формирања плакова демиелинизације (Floris и сар. 2004). На основу експеримената спроведених на ЕАЕ моделу предложен је механизам, по коме IL-17A појачава продукцију реактивних метаболита кисеоника услед активације ензима фагоцитне оксидазе у ендотелним ћелијама. Оксидативни стрес подстиче активацију контрактилног апарата у ћелијама и условљава губитак оклудентних међућелијских веза, што за последицу има увећање међућелијских простора ендотела и нарушавање КМБ, која постаје пропустљива за запаљенске ћелије (Huppert и сар. 2010). Реактивни метаболити кисеоника доводе до појачане експресије адхезивних молекула на ендотелу, што додатно стимулише трансмиграцију ћелија у ЦНС (Huppert и сар. 2010).

Поред стимулације ендотела крвних капиЛАРА, повишен ниво IL-17A може посредовати у настанку МС и преко других резидентних ћелија мозга. С'обзиром да испољавају рецептор за IL-17A, астроцити су такође циљна места деловања овог цитокина (Das Sarma и сар. 2009). Показано је да IL-17A условљава појачану испољеност гена за бројне проинфламацијске факторе у астроцитима, као што су CXCL1 и CXCL5 који привлаче неутрофиле, CCL2 који привлачи моноците и интересантно CCL20 који привлачи саме Th-17 ћелије, што може допринети одржавању и пропагацији аутоимунског процеса у ЦНС који је управо посредован Th-17 ћелијама (Reboldi и сар. 2009). На овај начин астроцити могу покренути каскаду инфламацијских дешавања значајних за настанак демиелинизацијских промена у МС, имајући у виду да поремећај функције рецептора за IL-17A на површини ове ћелијске популације у многоме одлаже и ублажава клиничке симптоме ЕАЕ (Kang и сар. 2010). Интерлеукин 17A у садејству са другим цитокинима, условљава и појачану продукцију азот монооксида у астроцитима (Trajković и сар. 2001). Азот моноксид има неуротоксичне ефекте, што IL-17A доводи у везу и са неуродегенеративним процесима присутним у МС.

Рецептор за IL-17A је такође конститутивно испољен на површини микроглијалних ћелија. Његовом стимулацијом, долази до активације ћелије и ослобађања цитокина IL-1 β , TNF- α и IL-6, који формирају проинфламацијску микросредину и подстичу инфилтрацију запаљенских ћелија (Murphy и сар. 2010). Поред тога, IL-1 β на аутокрини начин може да стимулише микроглијалне ћелије да ослобађају додатне количине IL-17A (Kawanokuchi и сар. 2008). Имајући у виду да током настанка демиелинизацијских промена у МС, микроглијалне ћелије функционишу као ефекторске, али уједно и АП ћелије, показано је да IL-17A у комбинацији са IFN- γ може значајно повећати испољеност МНС молекула II класе и костимулаторних молекула на површини микроглије, што може поспешити реактивацију мијелин-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита у структурама ЦНС (Murphy и сар. 2010).



Слика 7. Извори, циљне ћелије и ефекти IL-17A у мозгу: IL-17A може бити продукт секреције Th-17 ћелија, CD8⁺Т лимфоцита, $\gamma\delta$ Т лимфоцита, моноцита, Т ћелија природних убица, ћелија природних убица, али и других. У мозданом ткиву делује на крвно-моздану баријеру доводећи до поремећаја пермеабилности, активације ендотела и ослобађања бројних хемокина, што поспешује миграцију и трансмиграцију неутрофила, моноцита и лимфоцита. Интерлеукин 17A активира астроците и такође условљава секрецију хемотаксичних фактора неутрофила али и самих Th-17 ћелија. Поред астроцита активирају се и микроглијалне ћелије које ослобађају проинфламацијске цитокине који такође стимулишу инфилтрацију ћелија запаљења. У садејству са TNF- α , IL-17A стимулише дегенерацију и смрт олигодендроцита. (Делови слике су преузете уз модификације са интернет адресе www.biologend.com).



Са аспекта демиелинизацијских процеса у МС, посебно су значајни ефекти који IL-17A остварује на олигодендроците, с'обзиром да су ове ћелије конституенти мијелинског омотача. Још раније је забележено да TNF- α може директним деловањем условити дегенерацију олигодендроцита (D'Souza и сар. 1995), и слично је показано и са IFN- γ (Lin и сар. 2012). Интерлеукин 17A самостално не може услови дегенеративне промене на адултним олигодендроцитима, међутим у комбинацији са TNF- α вишеструко увећава ефекте овог цитокина (Paintlia и сар. 2011). Рецептор за IL-17A је присутан на површини прогенитора олигодендроцита. Његовом стимулацијом поред повећане експресије гена за проинфламацијске медијаторе, долази и до снажне инхибиције сазревања и преживљавања ових ћелија (Kang и сар. 2013), што IL-17A доводи у везу и са поремећајима ремиелинизације у МС (Li и сар. 2013).

Извори, циљне ћелије и ефекти IL-17A у мозгу, као и његов значај у настанку МС су приказани на *Слици 7*.

6.2 Ниво IL-17A је у директној вези са нивоом глутамата у ЦС течности пацијената оболелих од МС

МС је традиционално сматрана хроничним демиелинизацијским обољењем ЦНС, у коме инфламација заузима централно место у настанку оштећења мијелинског омотача. Међутим, последњих година све већи број истраживања указује на значај неуродегенеративних процеса у настанку болести (Luessi и сар. 2012, Vigeveno и сар. 2012). Неуродегенерација, у виду оштећења аксонских наставка неурона и њиховог губитка је евидентна у акутним и хроничним демиелинизацијским лезијама, али и у наизглед неизмењеној белој маси мозга (Kornek и сар. 2000, DeLuca и сар. 2006). Поред тога показано је и да клинички симптоми болести боље корелирају са степеном аксоналног оштећења, него са бројем демиелинизацијских лезија (Bakshi и сар. 2008). О пореклу неуродегенерације у МС се и даље спекулише. Недавно је глутаматска екситотоксичност предложена као могући механизам настанка аксоналног оштећења (Chung и сар. 2005), а касније је овај концепт проширен, јер глутаматска



екцитотоксичност може посредовати и у демиелинизацијским процесима у МС (Domercq и сар. 2005, Vercellino и сар. 2007).

Имајући у виду истраживање *Frischer* и сарадника који су показали директну повезаност инфламацијских и неуродегенеративних процеса у МС (*Frischer* и сар. 2009), наша студија је имала за циљ утврђивање начина којима би се ова веза могла реализовати. С'обзиром да је у претходном делу истраживања указано да Th-17 ћелије и IL-17A имају значајну улогу у настанку инфламације у МС, испитиван је однос Th-17 имунског одговора и глутаматске екцитотоксичности која може посредовати у настанку неуродегенерације. По први пут је показана директна веза између нивоа IL-17A и глутамата у ЦС течности пацијената у раном стадијуму МС (*Графикон 3.*). Ова повезаност указује на значај IL-17A у настанку екцитотоксичног оштећења, али и сугерише да Th-17 ћелије поред инфламације могу користити глутаматску екцитотоксичност као ефекторски механизам у настанку патолошког супстрата МС. Имајући у виду да екцитотоксичност посредује у дегенерацији и губитку аксона, Th-17 ћелија су први пут повезане са настанком неуродегенеративних промена у МС, тако да би интеракција Th-17 имунског одговора и глутаматске екцитотоксичности могла бити једна од карика у ланцу између инфламације и неуродегенерације у МС.

Постоји више предложених начина којима би IL-17A могао довести до пораста нивоа ванћелијског глутамата у ЦНС до екцитотоксичних вредности. Првенствено, делујући на ендотелне ћелије КМБ, IL-17A стимулише мобилизацију, трансмиграцију и инфилтрацију неутрофила у мождани паренхим (*Carlson* и сар. 2008), на шта је указала и наша студија (*Графикон 4.*). Приликом активације, неутрофили ослобађају велике количине глутамата, због појачане активности ензима глутаминазе која конвертује аминокиселину глутамин у глутамат (*Newsholme* и сар. 2003). Стимулацијом ендотела, IL-17A такође условљава ослобађање хемокина CCL2 (*Kebir* и сар. 2007) и миграцију моноцита у мождани паренхим где се ове ћелије трансформишу у макрофаге. Активисани макрофаги су ћелије са снажном глутаминазном активношћу и великим капацитетом за секрецију глутамата, чији је допринос у настанку глутаматске екцитотоксичности већ доказан (*Yawata* и сар. 2008).

У активним лезијама МС, снажна глутаминазна активност је нађена у макрофагима али и микроглијалним ћелијама у непосредној близини дистрофичних



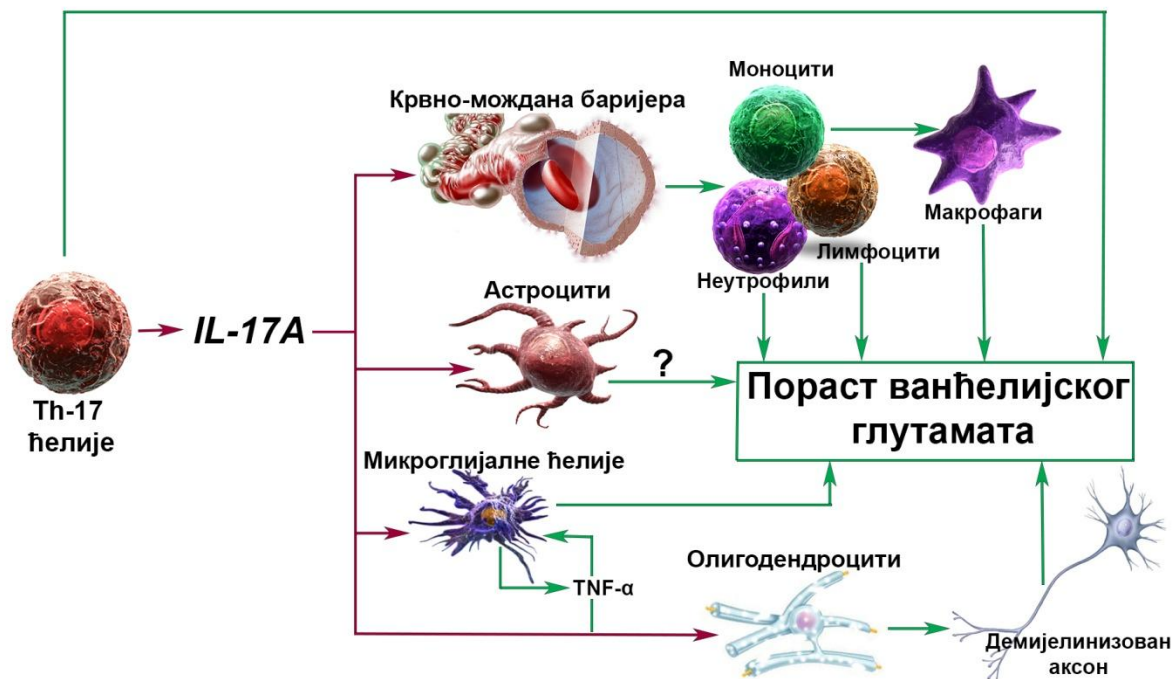
аксона и такође је успостављена директна веза између активности глутаминазе у овим ћелијама и степена аксоналног оштећења на ЕАЕ моделу (Werner и сар. 2001). Показано је и да блокада ослобађања глутамата из микроглијалних ћелија умногоме ублажава клиничке симптоме ЕАЕ (Shijie и сар. 2009). Активација микроглијалних ћелија је присутна у свим клиничким типовима МС (Sriram и Rodriguez 1997), и експериментално је доказано да услед активације, ове ћелије заиста ослобађају велике количине глутамата (Takeuchi и сар. 2005). Касније је откривено да TNF- α , на аутокрини начин може стимулисати глутаминазну активност и ослобађање глутамата из микроглијалних ћелија (Takeuchi и сар. 2006). Имајући у виду да IL-17A активира и стимулише микроглијалне ћелије на секрецију TNF- α , то значи да би IL-17A могао индиректно посредовати у настанку екцитотоксичног оштећења. Још увек није познато да ли IL-17A директно утиче на активност глутаминазе и процес секреције глутамата у микроглијалним ћелијама, међутим имајући у виду да TNF- α своје проинфламацијске ефекте деловања на ћелију остварује активацијом транскрипционог фактора NF- κ B (Wajant и сар. 2003), кога уједно може активирати и IL-17A (Song и Qian 2013), овакви директни ефекти деловања би се могли претпоставити и очекивати.

Директни ефекти деловања IL-17A на астроците су такође мало познати. Имајући у виду да су астроцити основне ћелије одговорне за одржање хомеостазе глутамата у можданом одељку, овај ефекат би био од посебног значаја у разматрању екцитотоксичног оштећења у МС. Из тих разлога, циљ експерименталног дела нашег истраживања је управо био испитивање ефеката IL-17A на способност астроцита да преузимају, метаболишу и секретују глутамат. За сада постоје извесни подаци који указују да астроцити у проинфламацијском окружењу ослобађају али и слабије преузимају глутамат из ванћелијског простора, што је претежно везано за ефекте деловања цитокина IL-6 и TNF- α (Bezzi и сар. 2001, Domercq и сар. 2006).

Интерлеукин 17A може да стимулише глутаматску екцитотоксичност и посредством олигодендроцита. Показано је да IL-17A у садејству са другим цитокинима може бити директно укључен у демиелинизацијске процесима у ЦНС, с'обзиром да условљава дегенерацију олигодендроцита (Paintlia и сар. 2011). Процес демиелинизације је значајан и са аспекта глутаматске екцитотоксичности, јер огољени аксони могу ослобађати значајне количине глутамата у ванћелијски простор (Kukley и сар. 2007). На тај начин може се покренути специфични патогенетски круг, у

коме демиелинизовани аксони ослобађају глутамат који током развоја МС, условљава настанак екситотоксичних оштећења и пропацију процеса демиелинизације и неуродегенерације.

Лимфоцити су ћелије за које се раније веровало да немају способност продукције и секреције глутамата, међутим, данас је овај став доведен у питање (Pithon-Curi и сар. 2004). У демиелинизацијским лезијама експерименталног модела ЕАЕ, MOG специфичне Th-17 ћелије директно комуницирају са нервним ћелијама, и то без укључености Т ћелијског рецептора што указује да ова интеракција није антиген специфичан процес. Током ове интеракције, која умногоме наликује на имунолошку синапсу, Th-17 ћелије условљавају локални пораст концентрације Ca^{2+} у неурону, услед ослобађања значајне количине глутамата (Siffrin и сар. 2010), што указује да су и саме Th-17 ћелије потенцијални извори глутамата у патогенези МС.



Слика 8. Потенцијални механизми којима IL-17A стимулише глутаматску екситотоксичност: IL-17A стимулацијом ћелија крвно-можданe баријере условљава миграцију неутрофила, лимфоцита и моноцита који се у можданом паренхиму трансформишу у макрофаге. Ове ћелије након активације у којој посредује и IL-17A, ослобађају значајне количине глутамата. Иако долази до активације астроцита, још увек нису познати ефекти ове активације на глутаматску екситотоксичност. Под дејством IL-17A, микроглијалне ћелије секретују TNF- α , који у аутокрином маниру условљава ослобађање глутамата. IL-17A посредује у дегенерацији олигодендроцита и демиелинизацији, при чему демиелинизовани аксони се такође понашају као извори глутамата. Саме Th-17 ћелије производе глутамат. (Делови слике су преузете уз модификације са интернет адресе www.biolegend.com).



Потенцијални механизми којима IL-17A стимулише глутаматску ексцитотоксичност у можданом одељку су приказани на *Слици 8*.

Забележено је да пацијенти који болују од МС имају повишен ниво глутамата у ЦС течности (Stover и сар. 1997, Sarchielli и сар. 2003), али и у акутним плаковима демиелинизације (Srinivasan и сар. 2005). За разлику од ових истраживања, у нашој студији ниво глутамата у ЦС течности се није статистички значајно разликовао између контролне групе и групе испитаника оболелих од МС (*Графикон 2.*). Могуће објашњење за овакво неслагање се може наћи у чињеници да током нормалног процеса старења, метаболизам и преузимање глутамата се физиолошки смањује (Danbolt 2001). Испитаници контролне групе у нашој студији су заиста били значајно старији (*Табела 2.*) у односу на пацијенте оболеле од МС, што може објаснити високе вредности глутамата у ЦС течности контролне групе.

6.3 Интерлеукин 17А смањује преузимање и метаболизам глутамата у астроцитима

Последњих година, неколико важних открића је пружио потпуно нови увид о значају астроцита у физиолошким и патофизиолошким процесима у мозгу, чврсто утемељујући концепт по коме астроцити успостављају динамичне и реципрочне везе са осталим резидентним ћелијама мозга (Oberheim и сар. 2012). Астроцити, такође присно комуницирају са имунским системом, с'обзиром да на површини испољавају бројне рецепторе за солубилне медијаторе различитих имунских ћелија (Sofroniew 2014), што све указује на њихов изражен регулаторни значај у остваривању нормалних функција ЦНС. Једна од основних регулаторних улога астроцита је дуготрајно одржавање нивоа глутамата у ниским нетоксичним концентрацијама, што пружа заштиту неуронима и олигодендроцитима од ексцитотоксичног оштећења и последичне дегенерације. Ову функцију остварују на два начина, посредством глутаматских транспортера који насупрот градијенту концентрације, транспортују глутамат из ванћелијског у унутарћелијски простор, и посредством унутарћелијске конверзије глутамата у нетоксични глутамин под дејством ензима глутамин синтетазе (Bröer и Brookes 2001).



Полазећи од претходног налаза директне повезаности нивоа IL-17A и глутамата у ЦС течности пацијената оболелих од МС, у овом делу студије испитано је да ли IL-17A подстиче пораст ванћелијског глутамата посредством астроцита, имајући у виду кључни значај ових ћелија у регулацији хомеостазе глутамата.

Смањено преузимање глутамата из ванћелијског простора је пресудно за настанак глутаматске ексцитотоксичности и претежно је последица поремећаја испољености глутаматских транспортера (Tilleux и Hermans 2007). Иако је сугерисано да проинфламацијски цитокини могу бити укључени у настанак ових поремећаја, за сада у литератури постоје оскудни подаци о ефектима ових цитокина на метаболизам глутамата и глутаматских транспортера. Из тих разлога, у нашој студији испитан је ефекат који IL-17A остварује на способност астроцита да преузимају глутамат, праћењем промена у експресији гена за основне глутаматске транспортере астроцита - протеине GLAST и GLT-1 (Anderson и Swanson 2000). Показано је да IL-17A у нижим концентрацијама (10, 25 и 50 ng/mL) смањује експресију гена за GLAST и GLT-1 (Графикон 8. и 9.), што указује да астроцити у Th-17 поларизованом окружењу могу стимулисати настанак ексцитотоксичног оштећења, услед слабијег преузимања глутамата из ванћелијског простора. Иако су ово први конкретни подаци о ефекту IL-17A на испољеност глутаматских транспортера, овакав налаз је у складу са претходним истраживањима која указују да проинфламацијски цитокини, IL-1 β и TNF- α могу довести до поремећаја експресије ових протеина на астроцитима (Zou и Crews 2005, Prow и Iran 2008, Carmen и сар. 2009). Интерлеукин 17A, слично као и TNF- α , је позитивни регулатор транскрипционог фактора NF- κ B, за кога је парадоксално показано да повећава експресију гена за GLT-1 (Ghosh и сар. 2011, Ji и сар. 2013). То указује да поред NF- κ B и други фактори могу бити укључени у сигнални пут којим IL-17A регулише транскрипцију гена за глутаматске транспортере. Sitcheran и сарадници су заиста показали да изолована активација NF- κ B доводи до појачане експресије гена за GLT-1, међутим, показано је и да TNF- α , осим активације и мобилизације NF- κ B у једру ћелије, активира и протоонкоген Н-мик (енг. *N-myc*), што потом условљава супресију овог гена (Sitcheran и сар. 2005). Интерлеукин 17A такође активира мус транскрипционе факторе (Straus 2013), који би се, уз NF- κ B, могли укључити у сигнални пут IL-17A и смањити испољеност глутаматских транспортера у астроцитима. У прилог томе је чиљеница да током ЕАЕ и аутоимунске инфламације у



ЦНС, експресија транскрипционих фактора NF- κ B и N-тус је знатно већа у односу на контролну групу животиња (Carmody и сар. 2002, van Loo и сар. 2006). Недавно је указано и на кључни значај транскрипционог фактора јин-јанг 1 (енг. *Yin Yang 1*, YY1) у супресији гена за глутаматске транспортере у астроцитима (Karki и сар. 2014), међутим, ефекти IL-17A на активност овог фактора још увек нису испитани.

Интересантан налаз наше студије је да IL-17A у високим концентрацијама (100 ng/mL) не модификује значајно експресију гена за протеине GLAST и GLT-1 (*Графикон 8. и 9.*). Слични ефекти високих концентрација IL-17A на степен експресије гена су и раније забележени, међутим за сада овај феномен није објашњен (Chen и сар. 2003). Могуће је да у вишим концентрацијама IL-17A покреће механизме негативне повратне спрега, који представљају специфичан вид заштитног одговор ћелије на прекомерну стимулацију. Наиме, приликом стимулације IL-17A рецептора, активира се Act1 лигаза и TRAF6 адаптивни протеин у циљу преноса сигнала у унутрашњост ћелије. TRAF6, између осталог, може посредовати и у активацији ИкБ киназа (индуцибилне ИкБ киназе 1 и ТБК1 киназе) који се потом везују за Act1 лигазу и условљавају разлагање комплекса Act1/TRAF6 а самим тим и прекид преноса сигнала са рецептора за IL-17A (Qu и сар. 2012). Такође је показано да IL-17A поред стимулације IL-17A рецептора може стимулирати и IL-17Д рецептор, чија активација такође условљава дисоцијацију комплекса адаптивних протеина Act1 и TRAF6 и блокаду сигнала са рецептора за IL-17A (Rong и сар. 2009, Mellett и сар. 2012). На тај начин IL-17A у вишим концентрацијама, би могао стимулирати IL-17Д рецептор и блокирати сигнале за смањену испољеност гена за глутаматске транспортере који долазе са рецептора за IL-17A, међутим присуство IL-17Д рецептора на површини астроцита још увек није потврђено.

Имајући у виду значајну улогу у метаболизму глутамата (Hertz и Zielke 2004), у овом делу истраживања су испитани и ефекти IL-17A на експресију гена за ензим глутамин синтетазу у астроцитима. Притом је показан сличан тренд као и код глутаматских транспортера, односно ниже концентрације IL-17A смањују експресију гена за глутамин синтетазу, док у већим концентрацијама се овај ефекат губи (*Графикон 10.*). Резултати указују да IL-17A, поред тога што доприноси екситотоксичном оштећењу смањеним преузимањем глутамата из ванћелијског простора, уједно смањује и метаболизам глутамата и тако додатно умањује способност



астроцита да одржавају ниво глутамата у физиолошком опсегу. Овакав налаз је веома значајан с'обзиром да активност глутамин синтетазе у астроцитима умногоме доприноси заштити неурона од екситотоксичног оштећења (Zou и сар. 2010), и уједно експресија овог ензима је драматично смањена у демиелинизацијским лезијама МС (Werner и сар. 2001). Проинфламацијски цитокини IL-1 β и TNF- α такође могу условити смањену испољеност гена за глутамин синтазу у астроцитима (Huang и O'Banion 1998), међутим, сигнални путеви као и транскрипциони фактори који су укључени у овај процес још увек нису идентификовани. За сада је познато да протеин киназа ЦД делује као негативни регулатор гена за глутамин синтазу (Brodie и сар. 1998), посредством активације протеина ц-Јун (енг. *c-Jun*) (Shen и Xu 2009).

С'обзиром да је показано да IL-17А остварује сличне ефекте на испољеност гена за глутаматске транспортере и глутамин синтазу у астроцитима, могуће је да транскрипцију ових гена регулише исти сигнални пут. Идентификација овог сигналног пута и његових компоненти би била од посебног терапијског значаја јер би то могла бити потенцијална места сузбијања екситотоксичних и неуродегенеративних промена у МС. На основу досадашњих истраживања смањена експресија гена за глутаматске транспортере и глутамин синтазу се доводи у везу са активацијом с-Jun протеина (López-Bayghen и Ortega 2004, Liu и сар. 2008, Shen и Xu 2009). Интерлеукин 17А остварује унутарћелијско спровођење сигнала активацијом адаптивног протеина TRAF6 (Schwandner и сар. 2000), који је укључен у активацију транскрипционог фактора NF- κ B (Qian и сар. 2007). Међутим, TRAF6 посредује и у активацији MAP киназног пута и ЈНЦ киназе (енг. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) која потом активира с-Jun (Qian и сар. 2010, Kim и сар. 2013). Интерлеукин 17А дакле може активирати с-Jun али да ли управо овај сигнални пут омогућава модулацију степена експресије гена за глутаматске транспортере и уједно глутамин синтазу још увек није потврђено.

6.4 Интерлеукин 17А стимулише егзоцитозу глутамата из астроцита

Данас је опште прихваћен став да астроцити имају ексклузивну улогу у уклањању слободног глутамата из синаптичког простора и превенцији настанка



глутаматске екцитотоксичности. Међутим, на супрот овом традиционалном ставу, новије студије указују да у извесним патолошким, али и физиолошким околностима астроцити могу и да ослобађају глутамат, посредством механизма који могу бити зависни и независни од Ca^{2+} јона. Ca^{2+} зависни механизми се углавном везују за процес егзоцитозе глутамата из унутарћелијских везикула астроцита, док Ca^{2+} независни механизми су још увек у домену спекулација и обухватају размену глутамата и цистина посредством NKCC (енг. X_c) антипортер система, реверзно функционисање глутаматских транспортера, отварање великих јонских канала укључујући јонотропне пуринаргичне 2 NK_7 (енг. $P2X_7$) канале, волтажне органске анјонске канале, међућелијске канале и друге (Malarkey и Pappas, 2008).

Описано је неколико механизма који повезују глутаматску екцитотоксичност присутну у МС са ослобађањем глутамата из астроцита, при чему сви ови механизми укључују активацију микроглијалних ћелија. Након активације, микроглијалне ћелије убрзано ослобађају молекуле аденозин-трифосфата који активирају пуринаргичне 2 NK_1 (енг. $P2Y_1$) рецепторе на астроцитима и условљавају егзоцитозу глутамата (Pascual и сар. 2012). Као део проинфламацијског цитокиноског миљеа микроглијалних ћелија, $\text{TNF-}\alpha$ такође стимулише астроците на секрецију глутамата (Bezzi и сар. 2001). Интересантно је да и сам глутамат може условити ослобађање овог неуротрансмитера из астроцита услед стимулације метаболитних глутаматских рецептора (Bezzi и сар. 1998).

Имајући у виду да смо претходно показали да IL-17A стимулише глутаматску екцитотоксичност слабијим преузимањем и метаболизмом глутамата у астроцитима, у овом делу студије испитано је да ли IL-17A уједно подстиче астроците на ослобађање глутамата. За сада постоје оскудни подаци који указују да проинфламацијски медијатори, $\text{TNF-}\alpha$ и простагландин E_2 , увећањем концентрације унутарћелијског Ca^{2+} , могу стимулисати секрецију глутамата, међутим, ефекти IL-17A су и даље употпуности непознати (Cali и сар. 2014, Santello и сар. 2011). Наша студија је показала да након стимулације астроцита калцијум јонофором, IL-17A условљава дозно зависан пораст секреције глутамата (*Графикон 12. и 13.*), што сугерише да астроцити могу допринети настанку екцитотоксичних оштећења у МС и процесима појачаног ослобађања глутамата у проинфламацијском окружењу. С'обзиром да је до пораста секреције глутамата дошло тек након повећања унутарћелијског Ca^{2+} - услед

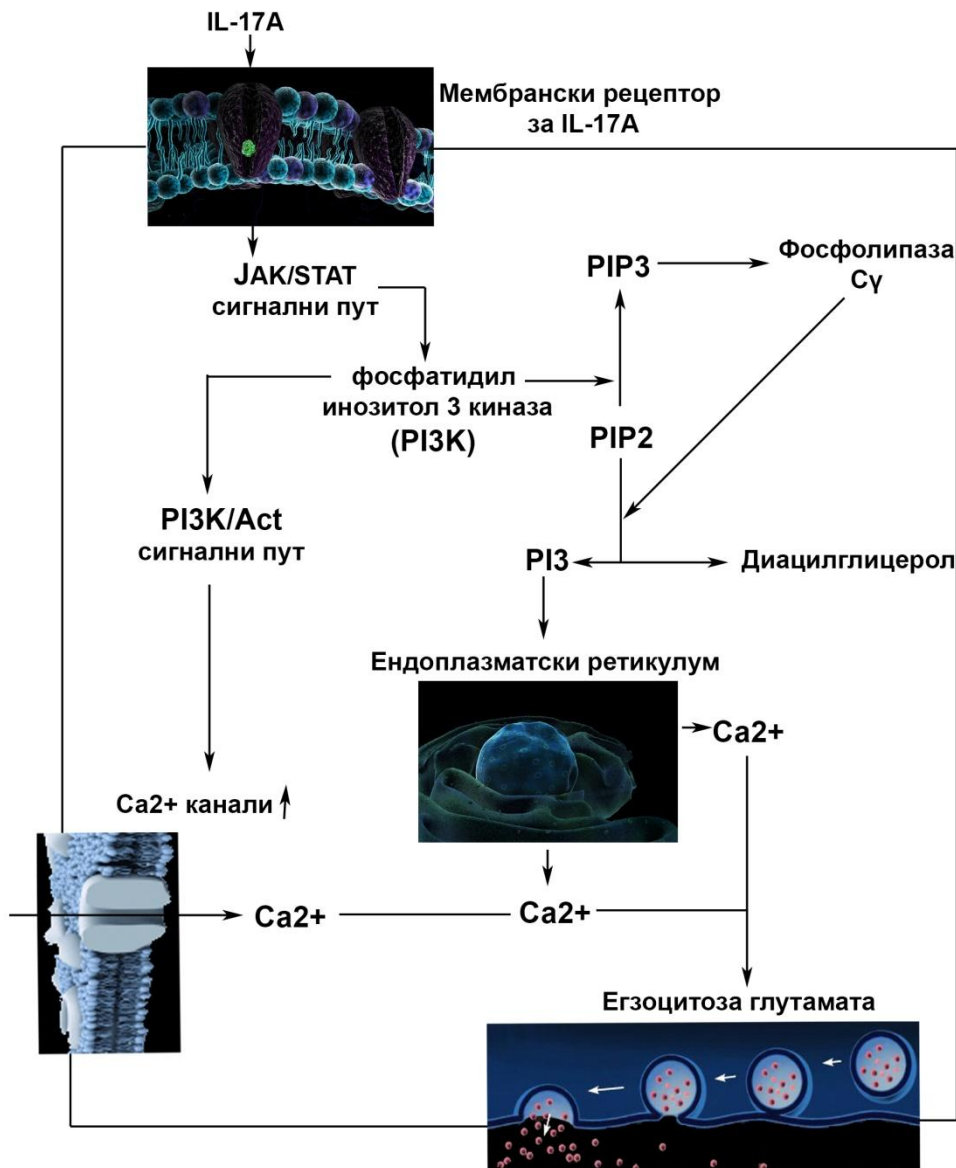


стимулације калцијум јонофором, наши резултати такође указују да IL-17A подстиче Ca^{2+} зависни пут ослобађања глутамата. То је посебно значајно јер пораст унутарћелијског Ca^{2+} се пропагира у виду таласа на друге астроците (Kuga и сар. 2011), што може бити праћено и процесом секреције глутамата, а самим тим и допринети порасту ванћелијског глутамата до екситотоксичних нивоа.

Могући механизми којима IL-17A посредује у Ca^{2+} зависној секрецији глутамата се могу наћи у ћелијској сигнализаци овог цитокина. Наиме, након стимулације рецептора за IL-17A у астроцитима се активира JAK/STAT сигнални пут, у коме долази до активације ензима фосфатидил инозитол 3 киназе (енг. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) (Gaffen 2009, Chen и сар. 2011). Овај ензим фосфорилише мембрански фосфолипид, фосфатидилинозитол 4,5 бифосфонат (енг. *Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*, PIP2) и формира фосфатидил инозитол 3,4,5 трифосфонат (енг. *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*, PIP3) који се понаша као позитивни регулатор ензима фосфолипазе Цγ (енг. *Phospholipase Cγ*, PLCγ) (Rameh и сар. 1998, Maffucci и Falasca 2007). Фосфолипаза Цγ каталише хидролитичку разградњу PIP2 на диацилглицерол и инозитол 1,4,5 фосфат (енг. *Inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP3), при чему IP3 делујући преко рецептора на површини ендоплазматског ретикулума условљава ослобађање Ca^{2+} из ове ћелијске органеле и пораст унутарћелијског Ca^{2+} . Поред тога, PI3K може активирати PI3K/Akt сигнални пут за кога је показано да условљава појачану испољеност волтажне зависних Ca^{2+} канала на површини ћелије, што омогућава интензивнију мобилизацију ванћелијског Ca^{2+} у унутрашњост астроцита (Viard и сар. 2004). Заиста је показано да стимулација ћелије цитокином IL-17A условљава пораст цитоплазматског Ca^{2+} (Јовановић и сар. 1998) (Слика 9.).

Пораст Ca^{2+} је довољан предуслов да дође до ослобађања глутамата из астроцита и то првенствено процесима егзоцитозе (Papura и Haydon 2000). Астроцити поседују везикуле глутамата и неопходну ћелијску машинерију за процес егзоцитозе, која је у виду CHAPE протеина (енг. *Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Activating Protein Receptor*, SNARE) (Montana и сар. 2004). Ови протеини обухватају синаптобrevин 2 и синаптотагмин 4 који се налазе на мембрани глутаматских везикула, и синтаксин 1 и CHAP-23 протеин (енг. *Synaptosome-Associated Protein*) који су локализовани на унутрашњој страни ћелијске мембране астроцита. Конкретно, процес везикуларног ослобађања глутамата у ванћелијски простор је регулисан протеином

синаптотагмин 4, чија активација зависи од концентрације унутарћелијског Ca^{2+} (Zhang и сар. 2004, Сирра и сар. 2006). Такође, протеини одговорни за транспорт глутамата у везикуле тзв. везикуларни глутаматски транспортери, поред неурона идентификовани су и у астроцитима (Anlauf и Derouiche 2005).



Слика 9. Предложени механизам IL-17A стимулисане егзоцитозе глутамата из астроцита

Иако наизглед парадоксално, у прилог хипотезе да IL-17A стимулише Ca^{2+} зависни пут ослобађања глутамата из астроцита, говори и налаз да након уклањања



Ca^{2+} из медијума, IL-17A такође условљава дозно зависан пораст глутаматске секреције (Графикон 14. и 15.). То се може објаснити чињеницом да астроцити реагују на смањене количине ванћелијског Ca^{2+} на тај начин што увећавају концентрацију унутарћелијског Ca^{2+} , појачаном мобилизацијом Ca^{2+} из ћелијских депоа (Zanotti и Charles 1997, Torres и сар. 2012), што може бити подложно деловању IL-17A. Пораст унутарћелијског Ca^{2+} настао на овај начин такође може посредовати у егзоцитози глутамата (Pasti и сар. 2001), и данас се сматра да је овај механизам значајан за развој екситотоксичних оштећења након цереброваскуларног инсульта (Takano и сар. 2009).

7 Закључак



На основу обављених истраживања и добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Пацијенти оболели од мултипле склерозе имају повишене вредности IL-17A у цереброспиналној течности, што указује да IL-17A има значајну улогу у комплексној цитокинској мрежи која посредује у патогенези болести.

2. По први пут је показана директна повезаност нивоа IL-17A и глутамата у цереброспиналној течности пацијената оболелих од мултипле склерозе. Овакав налаз сугерише потенцијалну повезаност Th-17 имунског одговора и глутаматске екцитотоксичности, што би уједно могла бити спона између инфламацијских и неуродегенеративних процеса у мултиплој склерози.

3. Идентификована су три механизма којима IL-17A, посредством астроцита, стимулише пораст ванћелијског глутамата. Показано је да IL-17A:

- смањује способност астроцита да преузимају глутамат, негативном регулацијом експресије гена за основне глутаматске транспортере GLAST и GLT-1 који су одговорни за транспорт глутамата из ванћелијског у унутарћелијски простор;
- смањује способност астроцита да метаболишу глутамат смањењем степена експресије гена за ензим глутамин синтетазу која је одговорна за унутарћелијску конверзију глутамата у нетоксични глутамин;
- стимулише Ca²⁺ зависни пут ослобађања глутамата из астроцита на дозно зависан начин.

8 Литература



- ABBAS, A. 2014. T cell-mediated immune responses. *Basic immunology - functions and disorders of immune system*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- ANDERSON, C. и SWANSON, R. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32, 1-14.
- ANDERSSON, M., YU, M., SÖDERSTRÖM, M., WEERTH, S., BAIG, S., SOLDERS, G. и LINK, H. 2002. Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 9, 243-51.
- ANLAUF, E. и DEROUICHE, A. 2005. Astrocytic exocytosis vesicles and glutamate: a high-resolution immunofluorescence study. *Glia*, 49, 96-106.
- ARCHAMBAULT, A., SIM, J., MA, G. и RUSSELL, J. 2005. Defining antigen-dependent stages of T cell migration from the blood to the central nervous system parenchyma. *Eur J Immunol*, 35, 1076-85.
- ASCHERIO, A. и MUNGER, K. 2007a. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, 61, 288-99.
- ASCHERIO, A. и MUNGER, K. L. 2007b. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*, 61, 504-13.
- BABALOO, Z., YEGANEH, R., FARHOODI, M., BARADARAN, B., BONYADI, M. и AGHEBATI, L. 2013. Increased IL-17A but decreased IL-27 serum levels in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol*, 10, 47-54.
- BAKSHI, R., THOMPSON, A., ROCCA, M., PELLETIER, D., DOUSSET, V., BARKHOF, F., INGLESE, M., GUTTMANN, C., HORSFIELD, M. и FILIPPI, M. 2008. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet Neurol*, 7, 615-25.
- BARNABA, V. 1996. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. *Immunol Rev*, 152, 47-66.
- BETTELLI, E., KORN, T. и KUCHROO, V. 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 19, 652-7.
- BEZZI, P., CARMIGNOTO, G., PASTI, L., VESCE, S., ROSSI, D., RIZZINI, B., POZZAN, T. и VOLTERRA, A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391, 281-5.
- BEZZI, P., DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., GALLI, R., SCHOLS, D., DE CLERCQ, E., VESCOVI, A., BAGETTA, G., KOLLIAS, G., MELDOLESI, J. и VOLTERRA, A. 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*, 4, 702-10.



- BIELEKOVA, B., GOODWIN, B., RICHERT, N., CORTESE, I., KONDO, T., AFSHAR, G., GRAN, B., EATON, J., ANTEL, J., FRANK, J., MCFARLAND, H., MARTIN и R. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med*, 6, 1167-75.
- BIELEKOVA, B., SUNG, M., KADOM, N., SIMON, R., MCFARLAND, H. и MARTIN, R. 2004. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*, 172, 3893-904.
- BØ, L., ESIRI, M., EVANGELOU, N. и KUHLMANN, T. 2012. Demyelination and remyelination in multiple sclerosis. In: DUNCAN, I. и FRANKLIN, R. (eds.) *Myelin repair and neuroprotection in multiple sclerosis*. New York: Springer.
- BOYMAN, O. 2010. Bystander activation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 40, 936-9.
- BRODIE, C., BOGI, K., ACS, P., LORENZO, P., BASKIN, L. и BLUMBERG, P. 1998. Protein Kinase C δ (PKC δ) Inhibits the Expression of Glutamine Synthetase in Glial Cells via the PKC δ Regulatory Domain and Its Tyrosine Phosphorylation. *J Biol Chem*, 273, 30713-18.
- BRÖER, S. и BROOKES, N. 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 77, 705-19.
- BROWN, D. и SAWCHENKO, P. 2007. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol*, 502, 236-60.
- BRUCKLACHER-WALDERT, V., STUERNER, K., KOLSTER, M., WOLTHAUSEN, J. и TOLOSA, E. 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132, 3329-41.
- CALI, C., LOPATAR, J., PETRELLI, F., PUCCI, L. и BEZZI, P. 2014. G-protein coupled receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: role of prostaglandins. *Neural Plast.* 2014;2014:254574., 254574.
- CARLSON, T., KROENKE, M., RAO, P., LANE, T. и SEGAL, B. 2008. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med*, 205, 811-23.
- CARMEN, J., ROTHSTEIN, J. и KERR, D. 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. *Brain Res*, 1263, 143-54.
- CARMODY, R., HILLIARD, B., MAGUSCHAK, K., CHODOSH, L. и CHEN, Y. 2002. Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol*, 133, 95-107.



- CARRITHERS, M., VISINTIN, I., KANG, S. и JANEWAY, C. J. 2000. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain*, 123, 1092-101.
- CARRITHERS, M., VISINTIN, I., VIRET, C. и JANEWAY, C. J. 2002. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol.*, 129, 51-7.
- CHARI, D. 2007. Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*, 79, 589-620.
- CHEN, Y., KIJLSTRA, A., CHEN, Y. и YANG, P. 2011. IL-17A stimulates the production of inflammatory mediators via Erk1/2, p38 MAPK, PI3K/Akt, and NF- κ B pathways in ARPE-19 cells. *Mol Vis*, 17, 3072-7.
- CHEN, Y., THAI, P., ZHAO, Y., HO, Y., DESOUZA, M. и WU, R. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, 278, 17036-43.
- CHUNG, R., MCCORMACK, G., KING, A., WEST, A. и VICKERS, J. 2005. Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. *Exp Neurol*, 193, 481-8.
- CIRIC, B., EL-BEHI, M., CABRERA, R., ZHANG, G. и ROSTAMI, A. 2009. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 182, 5296-305.
- COMPSTON, A. и COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONN, P. и PIN, J. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37, 205-37.
- CONSORTIUM, I. M. S. G. 2007. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med*, 357, 851-62.
- CRANER, M., NEWCOMBE, J., BLACK, J., HARTLE, C., CUZNER, M. и WAXMAN, S. 2004. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8168-73.
- CRIPPA, D., SCHENK, U., FRANCOLINI, M., ROSA, P., VERDERIO, C., ZONTA, M., POZZAN, T., MATTEOLI, M. и CARMIGNOTO, G. 2006. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*, 570, 567-82.
- CUA, D., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S., GORMAN, D., KASTELEIN, R. и SEDGWICK, J. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-8.



- CUPEDO, T., CRELLIN, N., PAPAZIAN, N., ROMBOUTS, E., WEIJER, K., GROGAN, J., FIBBE, W., CORNELISSEN, J. и SPITS, H. 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol*, 10, 66-74.
- D'SOUZA, S., ALINAUSKAS, K., MCCREA, E., GOODYER, C. и ANTEL, J. 1995. Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci*, 15, 7293-300.
- DAIKHIN, Y. и YUDKOFF, M. 2000. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr*, 130, 1026S-31S.
- DANBOLT, N. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65, 1-105.
- DAS SARMA, J., CIRIC, B., MAREK, R., SADHUKHAN, S., CARUSO, M., SHAFAGH, J., FITZGERALD, D., SHINDLER, K. и ROSTAMI, A. 2009. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2009 Apr 28;6:14., 6, 14.
- DE STEFANO, N., MATTHEWS, P., FILIPPI, M., AGOSTA, F., DE LUCA, M., BARTOLOZZI, M., GUIDI, L., GHEZZI, A., MONTANARI, E., CIFELLI, A., FEDERICO, A. и SMITH, S. 2003. Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology*, 60, 1157-62.
- DE STEFANO, N., NARAYANAN, S., FRANCIS, G., ARNAOUTELIS, R., TARTAGLIA, M., ANTEL, J., MATTHEWS, P. и ARNOLD, D. 2001. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*, 58, 65-70.
- DELUCA, G., WILLIAMS, K., EVANGELOU, N., EBERS, G. и ESIRI, M. 2006. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*, 129, 1507-16.
- DHIB-JALBUT, S., VALENZUELA, R., ITO, K., KAUFMAN, M., PICONE, M. и BUYSKE, S. 2013. HLA DR and DQ alleles and haplotypes associated with clinical response to glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2, 340-8.
- DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., PILATI, E., MARCHALAND, J., VOLTERRA, A. и BEZZI, P. 2006. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem*, 281, 30684-96.
- DOMERCQ, M., ETXEBARRIA, E., PÉREZ-SAMARTÍN, A. и MATUTE, C. 2005. Excitotoxic oligodendrocyte death and axonal damage induced by glutamate transporter inhibition. *Glia*, 52, 36-46.
- DURELLI, L., CONTI, L., CLERICO, M., BOSELLI, D., CONTESSA, G., RIPELLINO, P., FERRERO, B., EID, P. и NOVELLI, F. 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol*, 65, 499-509.



- ELYAMAN, W., BRADSHAW, E., UYTENHOVE, C., DARDALHON, V., AWASTHI, A., IMITOLA, J., BETTELLI, E., OUKKA, M., VAN SNICK, J., RENAULD, J., KUCHROO, V. и KHOURY, S. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12885-90.
- ENGELHARDT, B. и RANSOHOFF, R. 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 26, 485-95.
- EVANGELOU, N., ESIRI, M., SMITH, S., PALACE, J. и MATTHEWS, P. 2000. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 47, 391-5.
- FERBER, I., BROCKE, S., TAYLOR-EDWARDS, C., RIDGWAY, W., DINISCO, C., STEINMAN, L., DALTON, D. и FATHMAN, C. 1997. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*, 156, 5-7.
- FERRETTI, S., BONNEAU, O., GR, D., JONES, C. и TRIFILIEFF, A. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol*, 170, 2106-12.
- FLORIS, S., BLEZER, E., SCHREIBELT, G., DÖPP, E., VAN DER POL, S., SCHADEE-EESTERMANS, I., NICOLAY, K., DIJKSTRA, C. и DE VRIES, H. 2004. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain*, 127, 616-27.
- FLÜGEL, A., BERKOWICZ, T., RITTER, T., LABEUR, M., JENNE, D., LI, Z., ELLWART, J., WILLEM, M., LASSMANN, H. и WEKERLE, H. 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14, 547-60.
- FOSSIEZ, F., DJOSSOU, O., CHOMARAT, P., FLORES-ROMO, L., AIT-YAHIA, S., MAAT, C., PIN, J., GARRONE, P., GARCIA, E., SAELAND, S., BLANCHARD, D., GAILLARD, C., DAS MAHAPATRA, B., ROUVIER, E., GOLSTEIN, P., BANCHEREAU, J. и LEBECQUE, S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183, 2593-603.
- FRISCHER, J., BRAMOW, S., DAL-BIANCO, A., LUCCHINETTI, C., RAUSCHKA, H., SCHMIDBAUER, M., LAURSEN, H., SORENSEN, S. и LASSMANN, H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132, 1175-89.



- FURTADO, G., MARCONDES, M., LATKOWSKI, J., TSAI, J., WENSKY, A. и LAFAILLE, J. 2008. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 181, 4648-55.
- GAFFEN, S. 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9, 556-67.
- GEURTS, J., WOLSWIJK, G., BÖ, L., REDEKER, S., RAMKEMA, M., TROOST, D. и ARONICA, E. 2005. Expression patterns of Group III metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*, 158, 182-90.
- GEURTS, J., WOLSWIJK, G., BÖ, L., VAN DER VALK, P., POLMAN, C., TROOST, D. и ARONICA, E. 2003. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain*, 126, 1755-66.
- GHOSH, M., YANG, Y., ROTHSTEIN, J. и ROBINSON, M. 2011. Nuclear factor- κ B contributes to neuron-dependent induction of glutamate transporter-1 expression in astrocytes. *J Neurosci*, 31, 9159-69.
- GILGUN-SHERKI, Y., MELAMED, E. и OFFEN, D. 2004. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol*, 251, 261-8.
- GIMENEZ, M., SIM, J. и RUSSELL, J. 2004. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J Neuroimmunol*, 151, 116-25.
- GOVERMAN, J., WOODS, A., LARSON, L., WEINER, L., HOOD, L. и ZALLER, D. 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, 72, 551-60.
- GRABER, J., ALLIE, S., MULLEN, K., JONES, M., WANG, T., KRISHNAN, C., KAPLIN, A., NATH, A., KERR, D. и CALABRESI, P. 2008. Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 196, 124-32.
- GROOM, A., SMITH, T. и TURSKI, L. 2003. Multiple sclerosis and glutamate. *Ann N Y Acad Sci*, 993, 229-75.
- HARRINGTON, L., HATTON, R., MANGAN, P., TURNER, H., MURPHY, T., MURPHY, K. и WEAVER, C. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6, 1123-32.
- HERTZ, L. и ZIELKE, H. 2004. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*, 27, 735-43.
- HOFSTETTER, H., IBRAHIM, S., KOCZAN, D., KRUSE, N., WEISHAUPT, A., TOYKA, K. и GOLD, R. 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*, 237, 123-30.



- HUANG, T. и O'BANION, M. 1998. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes. *J Neurochem*, 71, 1436-42.
- HUPPERT, J., CLOSHEN, D., CROXFORD, A., WHITE, R., KULIG, P., PIETROWSKI, E., BECHMANN, I., BECHER, B., LUHMANN, H., A, W. и KUHLMANN, C. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*, 24, 1023-34.
- INFANTE-DUARTE, C., HORTON, H., BYRNE, M. и KAMRADT, T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 165, 6107-15.
- ISHIZU, T., OSOEGAWA, M., MEI, F., KIKUCHI, H., TANAKA, M., TAKAKURA, Y., MINOHARA, M., MURAI, H., MIHARA, F., TANIWAKI, T. и KIRA, J. 2005. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, 128, 988-1002.
- IVANOV, I., MCKENZIE, B., ZHOU, L., TADOKORO, C., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J., CUA, D. и LITTMAN, D. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126, 1121-33.
- JI, Q., PERCHELLET, A. и GOVERMAN, J. 2010. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*, 11, 628-34.
- JI, Y., ZHOU, L., XIE, Y., XU, S., ZHU, J., TENG, P., SHAO, C., WANG, Y., LUO, J. и Y, S. 2013. Upregulation of glutamate transporter GLT-1 by mTOR-Akt-NF- κ B cascade in astrocytic oxygen-glucose deprivation. *Glia*, 61, 1959-75.
- JOVANOVIĆ, D., DI BATTISTA, J., MARTEL-PELLETIER, J., JOLICOEUR, F., HE, Y., ZHANG, M., MINEAU, F. и PELLETIER, J. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160, 3513-21.
- KANG, Z., ALTUNTAS, C., GULEN, M., LIU, C., GILTIAY, N., QIN, H., LIU, L., QIAN, W., RANSOHOFF, R., BERGMANN, C., STOHLMAN, S., TUOHY, V. и LI, X. 2010. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 32, 414-25.
- KANG, Z., WANG, C., ZEPP, J., WU, L., SUN, K., ZHAO, J., CHANDRASEKHARAN, U., DICORLETO, P., TRAPP, B., RANSOHOFF, R. и LI, X. 2013. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2+ glial cells. *Nat Neurosci*, 16, 1401-8.
- KANUNNIKOVA, N. 2012. Role of brain glutamic acid metabolism changes in neurodegenerative pathologies. *J Biol Earth Sci*, 2, M1-10.



- KARKI, P., WEBB, A., SMITH, K., JOHNSON, J. J., K, L., SON, D., ASCHNER, M. и LEE, E. 2014. Yin Yang 1 is a repressor of glutamate transporter EAAT2, and it mediates manganese-induced decrease of EAAT2 expression in astrocytes. *Mol Cell Biol.* 2014, 34, 1280-9.
- KAUSHANSKY, N., EISENSTEIN, M., OVED, J. и BEN-NUN, A. 2008. Activation and control of pathogenic T cells in OSP/claudin-11-induced EAE in SJL/J mice are dominated by their focused recognition of a single epitopic residue (OSP58M). *Int Immunol*, 20, 1439-49.
- KAUSHANSKY, N., EISENSTEIN, M., ZILKHA-FALB, R. и BEN-NUN, A. 2010. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP) as a relevant primary target autoantigen in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, 9, 233-6.
- KAWANOKUCHI, J., SHIMIZU, K., NITTA, A., YAMADA, K., MIZUNO, T., TAKEUCHI, H. и SUZUMURA, A. 2008. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*, 194, 54-61.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. и PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-5.
- KIM, B., KAISTHA, S. и ROUSE, B. 2006. Viruses and autoimmunity. *Autoimmunity*, 39, 71-7.
- KIM, G., KHANAL, P., LIM, S., YUN, H., AHN, S., KI, S. и CHOI, H. 2013. Interleukin-17 induces AP-1 activity and cellular transformation via upregulation of tumor progression locus 2 activity. *Carcinogenesis*, 34, 341-50.
- KIVISÄKK, P., IMITOLA, J., RASMUSSEN, S., ELYAMAN, W., ZHU, B., RANSOHOFF, R. и KHOURY, S. 2009. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 65, 457-69.
- KOCH, M., UYTENBOOGAART, M., VAN HARTEN, A. и DE KEYSER, J. 2008. Factors associated with the risk of secondary progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 14, 799-803.
- KOLLS, J. и LINDÉN, A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21, 467-76.
- KOMIYAMA, Y., NAKAE, S., MATSUKI, T., NAMBU, A., ISHIGAME, H., KAKUTA, S., SUDO, K. и IWAKURA, Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 177, 566-73.



- KORN, T., MAGNUS, T. и JUNG, S. 2005. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J*, 19, 1878-80.
- KORNEK, B. и LASSMANN, H. 1999. Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol*, 9, 651-6.
- KORNEK, B., STORCH, M., BAUER, J., DJAMSHIDIAN, A., WEISSERT, R., WALLSTROEM, E., STEFFERL, A., ZIMPRICH, F., OLSSON, T., LININGTON, C., SCHMIDBAUER, M. и LASSMANN, H. 2001. Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 126, 1114-24.
- KORNEK, B., STORCH, M., WEISSERT, R., WALLSTROEM, E., STEFFERL, A., OLSSON, T., LININGTON, C., SCHMIDBAUER, M. и LASSMANN, H. 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol*, 175, 267-76.
- KUGA, N., SASAKI, T., TAKAHARA, Y., MATSUKI, N. и IKEGAYA, Y. 2011. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci*, 31, 2607-14.
- KUKLEY, M., CAPETILLO-ZARATE, E. и DIETRICH, D. 2007. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci*, 10, 311-20.
- KURTZKE, J. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33, 1444-52.
- LANGRISH, C., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. и CUA, D. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-40.
- LEVINE, S. и CHAKRABARTY, A. 2004. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1012, 252-66.
- LI, Z., LI, K., ZHU, L., KAN, Q., YAN, Y., KUMAR, P., XU, H., ROSTAMI, A. и ZHANG, G. 2013. Inhibitory effect of IL-17 on neural stem cell proliferation and neural cell differentiation. *BMC Immunol*, 14, 20.
- LIBBEY, J., MCCOY, L. и FUJINAMI, R. 2007. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*, 79, 127-47.
- LIN, Y., JAMISON, S. и LIN, W. 2012. Interferon- γ activates nuclear factor- κ B in oligodendrocytes through a process mediated by the unfolded protein response. *PLoS One*, 7, e36408.
- LIPTON, S. и ROSENBERG, P. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 330, 613-22.



- LIU, Y., YANG, C. и TZENG, S. 2008. Inhibitory regulation of glutamate aspartate transporter (GLAST) expression in astrocytes by cadmium-induced calcium influx. *J Neurochem*, 105, 137-50.
- LOCK, C., HERMANS, G., PEDOTTI, R., BRENDOLAN, A., SCHADT, E., GARREN, H., LANGER-GOULD, A., STROBER, S., CANNELLA, B., ALLARD, J., KLONOWSKI, P., AUSTIN, A., LAD, N., KAMINSKI, N., GALLI, S., OKSENBERG, J., RAINE, C., HELLER, R. и STEINMAN, L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 8, 500-8.
- LOCKHART, E., GREEN, A. и FLYNN, J. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, 177, 4662-9.
- LOMA, I. и HEYMAN, R. 2011. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuroparmacol*, 9, 409-16.
- LÓPEZ-BAYGHEN, E. и ORTEGA, A. 2004. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC. *J Neurochem*, 91, 200-9.
- LUBLIN, F. и REINGOLD, S. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46, 907-11.
- LUCCHINETTI, C., BRUCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIQUEZ, M. и LASSMANN, H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707-17.
- LUESSI, F., SIFFRIN, V. и ZIPP, F. 2012. Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother*, 12, 1061-76.
- MADSEN, L., ANDERSSON, E., JANSSON, L., KROGSGAARD, M., ANDERSEN, C., ENGBERG, J., STROMINGER, J., SVEJGAARD, A., HJORTH, J., HOLMDAHL, R., WUCHERPFENNIG, K. и FUGGER, L. 1999. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet*, 23, 343-7.
- MAFFUCCI, T. и FALASCA, M. 2007. Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of phospholipase C γ . *Biochem Soc Trans*, 35, 229-30.
- MALARKEY, E. и PARPURA, V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*, 52, 142-54.
- MANJI, H., CONNOLLY, S., DORWARD, N., KITCHEN, N., MEHTA, A. и WILLS, A. 2009. *Oxford Handbook of Neurology*, New York, Oxford University Press.
- MAO, P. и REDDY, P. 2010. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta*, 1802, 66-79.



- MARKOVIC-PLESE, S., FUKAURA, H., ZHANG, J., AL-SABBAGH, A., SOUTHWOOD, S., SETTE, A., KUCHROO, V. и HAFLER, D. 1995. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. *J Immunol*, 155, 982-92.
- MARTIN, R., GRAN, B., ZHAO, Y., MARKOVIC-PLESE, S., BIELEKOVA, B., MARQUES, A., SUNG, M., HEMMER, B., SIMON, R., MCFARLAND, H. и PINILLA, C. 2001. Molecular mimicry and antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS Lyme disease. *J Autoimmun*, 16, 187-92.
- MATSUSHITA, T., TATEISHI, T., ISOBE, N., YONEKAWA, T., YAMASAKI, R., MATSUSE, D., MURAI, H. и KIRA, J. 2013. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One*, 8, e61835.
- MATUTE, C. 1998. Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10229-34.
- MAYAT, E., PETRALIA, R., WANG, Y. и WENTHOLD, R. 1995. Immunoprecipitation, immunoblotting, and immunocytochemistry studies suggest that glutamate receptor delta subunits form novel postsynaptic receptor complexes. *J Neurosci*, 15, 2533-46.
- MCCARTHY, K. и DE VELLIS, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.
- MELLETT, M., ATZEI, P., HORGAN, A., HAMS, E., FLOSS, T., WURST, W., FALLON, P. и MOYNAGH, P. 2012. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nat Commun*, 3, 1119.
- MERRILL, J., KONO, D., CLAYTON, J., ANDO, D., HINTON, D. и HOFMAN, F. 1992. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 574-8.
- MILLER, D. и LEARY, S. 2007. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 6, 903-12.
- MILLER, E., MROWICKA, M., ZOŁYŃSKI, K. и KEDZIORA, J. 2009. Oxidative stress in multiple sclerosis. *Pol Merkur Lekarski*, 27, 499 – 502.
- MILLER, S., VANDERLUGT, C., BEGOLKA, W., PAO, W., YAUCH, R., NEVILLE, K., KATZ-LEVY, Y., CARRIZOSA, A. и KIM, B. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med*, 3, 1133-6.
- MILO, R. и KAHANA, E. 2010. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 9, A387-94.



- MITOSEK-SZEWCZYK, K., SULKOWSKI, G., STELMASIAK, Z. и STRUZYŃSKA, L. 2008. Expression of glutamate transporters GLT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, 155, 45-52.
- MONTANA, V., NI, Y., SUNJARA, V., HUA, X. и PARPURA, V. 2004. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 24, 2633-42.
- MONTES, M., ZHANG, X., BERTHELOT, L., LAPLAUD, D., BROUARD, S., JIN, J., ROGAN, S., ARMAO, D., JEWELLS, V., SOULILLOU, J. и MARKOVIC-PLESE, S. 2009. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol*, 130, 133-44.
- MURARO, P., KALBUS, M., AFSHAR, G., MCFARLAND, H. и MARTIN, R. 2002. T cell response to 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 130, 233-42.
- MURPHY, A., LALOR, S., LYNCH, M. и MILLS, K. 2010. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 24, 641-51.
- NAEGELE, M., TILLACK, K., REINHARDT, S., SCHIPPLING, S., MARTIN, R. и SOSPEDRA, M. 2012. Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol*, 242, 60-71.
- NEWCOMBE, J., UDDIN, A., DOVE, R., PATEL, B., TURSKI, L., NISHIZAWA, Y. и SMITH, T. 2008. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol*, 18, 52-61.
- NEWSHOLME, P., PROCOPIO, J., LIMA, M., PITHON-CURI, T. и CURI, R. 2003. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*, 21, 1-9.
- NILAND, B. и PERL, A. 2004. Evaluation of autoimmunity to transaldolase in multiple sclerosis. *Methods Mol Med*, 102, 155-71.
- NYGÅRDAS, P., MÄÄTTÄ, J. и HINKKANEN, A. 2000. Chemokine expression by central nervous system resident cells and infiltrating neutrophils during experimental autoimmune encephalomyelitis in the BALB/c mouse. *Eur J Immunol*, 30, 1911-8.
- OBERHEIM, N., GOLDMAN, S. и NEDERGAARD, M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*, 814, 23-45.
- OBRADOVIĆ, D., KATARANOVSKI, M., DINČIĆ, E., OBRADOVIĆ, S. и COLIĆ, M. 2012. Tumor necrosis factor-alfa and interleukin-4 in cerebrospinal fluid and plasma in different clinical forms of multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl*, 69, 151-6.



- OHGOH, M., HANADA, T., SMITH, T., HASHIMOTO, T., UENO, M., YAMANISHI, Y., WATANABE, M. и NISHIZAWA, Y. 2002. Altered expression of glutamate transporters in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 125, 170-8.
- OPDENAKKER, G. и VAN DAMME, J. 1994. Cytokine-regulated proteases in autoimmune. *Immunol Today*, 15, 103-7.
- OUARDOUZ, M., CODERRE, E., BASAK, A., CHEN, A., ZAMPONI, G., HAMEED, S., REHAK, R., YIN, X., TRAPP, B. и STYS, P. 2009a. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors. *Ann Neurol*, 65, 151-9.
- OUARDOUZ, M., E, C., ZAMPONI, G., HAMEED, S., YIN, X., TRAPP, B. и STYS, P. 2009b. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: II. AMPA and GluR5 receptors. *Ann Neurol*, 65, 160-6.
- OUYANG, W., KOLLS, J. и ZHENG, Y. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28, 454-67.
- PAINTLIA, M., PAINTLIA, A., SINGH, A. и SINGH, I. 2011. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J Neurochem*, 116, 508-21.
- PANITCH, H., HIRSCH, R., HALEY, A. и JOHNSON, K. 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*, 1, 893-5.
- PAPPAS, D. и OKSENBERG, J. 2010. Multiple sclerosis pharmacogenomics: maximizing efficacy of therapy. *Neurology*, 74, Suppl 1:S62-9.
- PARPURA, V. и HAYDON, P. 2000. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8629-34.
- PASCUAL, O., BEN ACHOUR, S., ROSTAING, P., A, T. и BESSIS, A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E197-205.
- PASTI, L., M, Z., POZZAN, T., VICINI, S. и CARMIGNOTO, G. 2001. Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci*, 21, 477-84.
- PATRUCCO, L., ROJAS, J., MIGUEZ, J. и E, C. 2013. Application of the McDonald 2010 criteria for the diagnosis of multiple sclerosis in an Argentinean cohort of patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler*, 19, 1297-301.
- PEGHINI, P., JANZEN, J. и STOFFEL, W. 1997. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J*, 16, 3822-32.



- PELLETIER, M., MAGGI, L., MICHELETTI, A., LAZZERI, E., TAMASSIA, N., COSTANTINI, C., COSMI, L., LUNARDI, C., ANNUNZIATO, F., ROMAGNANI, S. и CASSATELLA, M. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115, 335-43.
- PETERSON, J., BÖ, L., MÖRK, S., CHANG, A. и TRAPP, B. 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 50, 389-400.
- PIANI, D., FREI, K., DO, K., CUÉNOD, M. и FONTANA, A. 1991. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett*, 133, 159-62.
- PIANI, D., SPRANGER, M., FREI, K., SCHAFFNER, A. и FONTANA, A. 1992. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol*, 22, 2429-36.
- PITHON-CURI, T., DE MELO, M. и CURI, R. 2004. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct*, 22, 321-6.
- PITT, D., NAGELMEIER, I., WILSON, H. и RAINE, C. 2003. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology*, 61, 1113-20.
- POLMAN, C., REINGOLD, S., BANWELL, B., CLANET, M., COHEN, J., FILIPPI, M., FUJIHARA, K., HAVRDOVA, E., HUTCHINSON, M., KAPPOS, L., LUBLIN, F., MONTALBAN, X., O'CONNOR, P., SANDBERG-WOLLHEIM, M., THOMPSON, A., WAUBANT, E., WEINSHENKER, B. и WOLINSKY, J. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69, 292-302.
- PRINEAS, J., KWON, E., CHO, E., SHARER, L., BARNETT, M., OLESZAK, E., HOFFMAN, B. и MORGAN, B. 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50, 646-57.
- PROW, N. и IRAN, I. D. 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. *J Neurochem*, 105, 1276-86.
- QIAN, Y., KANG, Z., LIU, C. и LI, X. 2010. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*, 7, 328-33.
- QIAN, Y., LIU, C., HARTUPEE, J., ALTUNTAS, C., GULEN, M., JANE-WIT, D., XIAO, J., LU, Y., GILTIAY, N., LIU, J., KORDULA, T., ZHANG, Q., VALLANCE, B., SWAIDANI, S., ARONICA, M., TUOHY, V. и HAMILTON, T. L., X 2007. The



- adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol*, 8, 247-56.
- QU, F., GAO, H., ZHU, S., SHI, P., ZHANG, Y., LIU, Y., JALLAL, B., YAO, Y., SHI, Y. и QIAN, Y. 2012. TRAF6-dependent Act1 phosphorylation by the I κ B kinase-related kinases suppresses interleukin-17-induced NF- κ B activation. *Mol Cell Biol*, 32, 3925-37.
- QUANDT, J., BAIG, M., YAO, K., KAWAMURA, K., HUH, J., LUDWIN, S., BIAN, H., BRYANT, M., QUIGLEY, L., NAGY, Z., MCFARLAND, H., MURARO, P., MARTIN, R. и ITO, K. 2004. Unique clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice. *J Exp Med*, 200, 223-34.
- RACHITSKAYA, A., HANSEN, A., HORAI, R., LI, Z., VILLASMIL, R., LUGER, D., NUSSENBLATT, R. и CASPI, R. 2008. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol*, 180, 5167-71.
- RAMEH, L., RHEE, S., SPOKES, K., KAZLAUSKAS, A., CANTLEY, L. и CANTLEY, L. 1998. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Phospholipase C γ -mediated Calcium Signaling. *J Biol Chem*, 273, 23750-7.
- RANSOHOFF, R., KIVISÄKK, P. и KIDD, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 3, 569-81.
- REBOLDI, A., C, C., BAUMJOHANN, D., BENVENUTO, F., BOTTINELLI, D., LIRA, S., UCCELLI, A., LANZAVECCHIA, A., ENGELHARDT, B. и SALLUSTO, F. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*, 10, 514-23.
- RENNO, T., KRAKOWSKI, M., PICCIRILLO, C., LIN, J. и OWENS, T. 1995. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol*, 154, 944-53.
- RONG, Z., WANG, A., LI, Z., REN, Y., CHENG, L., LI, Y., WANG, Y., REN, F., ZHANG, X., HU, J. и CHANG, Z. 2009. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Res*, 19, 208-15.
- SANTARLASCIO, V., MAGGI, L., CAPONE, M., FROSALI, F., QUERCI, V., DE PALMA, R., LIOTTA, F., COSMI, L., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. и ANNUNZIATO, F. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*, 39, 207-15.
- SANTELLO, M., BEZZI, P. и VOLTERRA, A. 2011. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, 69, 988-1001.



- SARCHIELLI, P., GRECO, L., FLORIDI, A., FLORIDI, A. и GALLAI, V. 2003. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*, 60, 1082-8.
- SCHIRMER, L., ANTEL, J., BRÜCK, W. и STADELMANN, C. 2011. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 21, 428-40.
- SCHOUSBOE, A. и HERTZ, L. 1981. Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 27, 103-13.
- SCHWANDNER, R., YAMAGUCHI, K. и CAO, Z. 2000. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med*, 191, 1233-40.
- SENDROWSKI, K., RUSAK, M., SOBANIEC, P., ILENDÓ, E., DĄBROWSKA, M., BOĆKOWSKI, L., KOPUT, A. и SOBANIEC, W. 2013. Study of the protective effect of calcium channel blockers against neuronal damage induced by glutamate in cultured hippocampal neurons. *Pharmacol Rep*, 65, 730-6.
- SHARP, C., HINES, I., HOUGHTON, J., WARREN, A., JACKSON, T., JAWAHAR, A., NANDA, A., ELROD, J., LONG, A., CHI, A., MINAGAR, A. и ALEXANDER, J. 2003. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 258, H2592-8.
- SHEN, X. и XU, G. 2009. Role of IL-1beta on the glutamine synthetase in retinal Müller cells under high glucose conditions. *Curr Eye Res*, 34, 727-36.
- SHIJE, J., TAKEUCHI, H., YAWATA, I., HARADA, Y., SONOBE, Y., DOI, Y., LIANG, J., HUA, L., YASUOKA, S., ZHOU, Y., NODA, M., KAWANOKUCHI, J., MIZUNO, T. и SUZUMURA, A. 2009. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J Exp Med*, 217, 87-92.
- SIDDHARAMA, P. и SUBRAMANIAM, S. 2010. The role of infections in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol*, 13, 80-6.
- SIFFRIN, V., RADBRUCH, H., GLUMM, R., NIESNER, R., PATERKA, M., HERZ, J., LEUENBERGER, T., LEHMANN, S., LUENSTEDT, S., RINNENTHAL, J., LAUBE, G., LUCHE, H., LEHNARDT, S., FEHLING, H., GRIESBECK, O. и ZIPP, F. 2010. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity*, 33, 424-36.
- SITCHERAN, R., GUPTA, P., FISHER, P. и BALDWIN, A. 2005. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *EMBO J*, 24, 510-20.



- SOFRONIEW, M. 2014. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist*, 20, 160-72.
- SONG, X. и QIAN, Y. 2013. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*, 62, 175-82.
- SOSPEDRA, M. и MARTIN, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 23, 683-747.
- SRINIVASAN, R., SAILASUTA, N., HURD, R., NELSON, S. и PELLETIER, D. 2005. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 2005 May;:1016-25., 128, 1016-25.
- SRIRAM, S. и RODRIGUEZ, M. 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. *Neurology*, 48, 464-70.
- STARNES, T., ROBERTSON, M., SLEDGE, G., KELICH, S., NAKSHATRI, H., BROXMEYER, H. и HROMAS, R. 2001. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol*, 167, 4137-40.
- STORCH, M., STEFFERL, A., BREHM, U., WEISSERT, R., WALLSTRÖM, E., KERSCHENSTEINER, M., OLSSON, T., LININGTON, C. и LASSMANN, H. 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*, 8, 681-94.
- STOVER, J., PLEINES, U., MORGANTI-KOSSMANN, M., KOSSMANN, T., LOWITZSCH, K. и KEMPSKI, O. 1997. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*, 27, 1038-43.
- STRAUS, D. 2013. TNF α and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer*, 12, 78.
- TAKAHASHI, J., GIULIANI, F., POWER, C., IMAI, Y. и YONG, V. 2003. Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol*, 53, 588-95.
- TAKANO, T., OBERHEIM, N., COTRINA, M. и NEDERGAARD, M. 2009. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke*, 40, S8-12.
- TAKEUCHI, H., JIN, S., WANG, J., ZHANG, G., KAWANOKUCHI, J., KUNO, R., SONOBE, Y., MIZUNO, T. и SUZUMURA, A. 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 281, 21362-8.
- TAKEUCHI, H., MIZUNO, T., ZHANG, G., WANG, J., KAWANOKUCHI, J., KUNO, R. и SUZUMURA, A. 2005. Neuritic beading induced by activated microglia is an early



- feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. *J Biol Chem*, 280, 10444-54.
- TAS, M., BARKHOL, F., VAN WALDERVEEN, M., POLMAN, C., HOMMES, O. и J, V. 1995. The effect of gadolinium on the sensitivity and specificity of MR in the initial diagnosis of multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 16, 259-64.
- TILLEUX, S. и HERMANS, E. 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res*, 85, 2059-70.
- TONCEV, G., MILETIC DRAKULIC, S., KNEZEVIC, Z., BOSKOVIC MATIC, T., GAVRILOVIC, A., TONCEV, S., DRULOVIC, J. и PEKMEZOVIC, T. 2011. Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Sumadija. *Neuroepidemiology*, 37, 102-6.
- TORRES, A., WANG, F., XU, Q., FUJITA, T., DOBROWOLSKI, R., WILLECKE, K., TAKANO, T. и NEDERGAARD, M. 2012. Extracellular Ca²⁺ acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal*, 5, ra8.
- TRAJKOVIC, V., STOSIC-GRUJICIC, S., SAMARDZIC, T., MARKOVIC, M., MILJKOVIC, D., RAMIC, Z. и MOSTARICA STOJKOVIC, M. 2001. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol*, 119, 183-91.
- TZARTOS, J., FRIESE, M., CRANER, M., PALACE, J., NEWCOMBE, J., ESIRI, M. и FUGGER, L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172, 146-55.
- VALLI, A., SETTE, A., KAPPOS, L., OSEROFF, C., SIDNEY, J., MIESCHER, G., HOCHBERGER, M., ALBERT, E. и ADORINI, L. 1993. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 91, 616-28.
- VAN DER VALK, P. и DE GROOT, C. 2000. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26, 2-10.
- VAN LOO, G., DE LORENZI, R., SCHMIDT, H., HUTH, M., MILDNER, A., SCHMIDT-SUPPRIAN, M., LASSMANN, H., PRINZ, M. и PASPARAKIS, M. 2006. Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol*, 7, 954-61.
- VANDERLUGT, C. и MILLER, S. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2, 85-95.
- VERCELLINO, M., MEROLA, A., PIACENTINO, C., VOTTA, B., CAPELLO, E., MANCARDI, G., MUTANI, R., GIORDANA, M. и CAVALLA, P. 2007. Altered



- glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66, 732-9.
- VERKHRATSKY, A. и STEINHÄUSER, C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev*, 32, 380-412.
- VESCE, S., ROSSI, D., BRAMBILLA, L. и VOLTERRA, A. 2007. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol*, 82, 57-71.
- VIARD, P., BUTCHER, A., HALET, G., DAVIES, A., NÜRNBERG, B., HEBLICH, F. и DOLPHIN, A. 2004. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci*, 7, 939-46.
- VIGEVENO, R., WIEBENGA, O., WATTJES, M., GEURTS, J. и BARKHOF, F. 2012. Shifting imaging targets in multiple sclerosis: from inflammation to neurodegeneration. *J Magn Reson Imaging*, 36, 1-19.
- VOLLMER, T., WYNN, D., ALAM, M. и VALDES, J. 2011. A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*, 17, 181-91.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K. и SCHEURICH, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
- WALDNER, H., COLLINS, M. и KUCHROO, V. 2004. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*, 1137, 990-7.
- WALDNER, H., WHITTERS, M., SOBEL, R., COLLINS, M. и KUCHROO, V. 2000. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3412-7.
- WEISSERT, R., J. K., DE GRAAF, K., WIENHOLD, W., HERRMANN, M., MÜLLER, C., FORSTHUBER, T., WIESMÜLLER, K. и MELMS, A. 2002. High immunogenicity of intracellular myelin oligodendrocyte glycoprotein epitopes. *J Immunol*, 169, 548-56.
- WERNER, P., PITT, D. и RAINE, C. 2001. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol*, 50, 169-80.
- WILSON, N., BONIFACE, K., CHAN, J., MCKENZIE, B., BLUMENSCHNEIN, W., MATTSON, J., BASHAM, B., SMITH, K., CHEN, T., MOREL, F., LECRON, J., KASTELEIN, R., CUA, D., MCCLANAHAN, T., BOWMAN, E. и DE WAAL



- MALEFYT, R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 8, 950-7.
- WONG, R. 2006. NMDA receptors expressed in oligodendrocytes. *Bioessays*, 28, 460-4.
- WOOLDRIDGE, L., EKERUCHE-MAKINDE, J., VAN DEN BERG, H., SKOWERA, A., MILES, J., TAN, M., DOLTON, G., CLEMENT, M., LLEWELLYN-LACEY, S., PRICE, D., PEAKMAN, M. и SEWELL, A. 2012. A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J Biol Chem*, 287, 1168-77.
- WU, F., CAO, W., YANG, Y. и LIU, A. 2010. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*, 133, 313-22.
- YAWATA, I., TAKEUCHI, H., DOI, Y., LIANG, J., MIZUNO, T. и SUZUMURA, A. 2008. Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life Sci*, 82, 1111-6.
- ZAMVIL, S. и STEINMAN, L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, 8, 579-621.
- ZANOTTI, S. и CHARLES, A. 1997. Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem*, 69, 594-602.
- ZHANG, J., MARKOVIC-PLESE, S., LACET, B., RAUS, J., WEINER, H. и HAFLER, D. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 179, 973-84.
- ZHANG, Q., FUKUDA, M., VAN BOCKSTAELE, E., PASCUAL, O. и HAYDON, P. 2004. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9441-6.
- ZHANG, X., TANG, Y., SUJKOWSKA, D., WANG, J., RAMGOLAM, V., SOSPEDRA, M., ADAMS, J., MARTIN, R., PINILLA, C. и MARKOVIC-PLESE, S. 2008. Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction of autoreactive T cells: implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*, 38, 1297-309.
- ZOU, J. и CREWS, F. 2005. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*, 1034, 11-24.
- ZOU, J., WANG, Y., DOU, F., LÜ, H., MA, Z., LU, P. и XU, X. 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int*, 56, 577-84.

9 Биографија аутора



Др Милош Костић је рођен 1982. године у Нишу, где је завршио основну школу и гимназију. Медицински факултет, Универзитета у Нишу уписао је 2001. године. Дипломирао је на Катедри за неурологију 2008. године са оценом 10 и високом просечном оценом током студирања 9.92. За време студија био је демонстратор на предмету Патологија и стипендиста града Ниша. Учествовао је на бројним студентским конгресима. Докторске академске студије, студијски програм Молекуларна медицина, уписао је 2008. године и постао стипендиста Министарства науке и технолошког развоја Републике Србије.

На Медицинском факултету у Нишу, изабран је у звање сарадника у настави за ужу научну област Имунологија 2012. год., и од тада је ангажован у реализацији наставе на предметима Основи имунологије и Фармацеутска имунологија. Здравствене специјалистичке студије из Имунологије уписао је 2013. године.

Аутор је 8 научних радова објављених у целости у научним часописима од којих су 3 са SCI листе из области докторске дисертације, и више апстрактних радова. Током своје професионалне каријере био је ангажован на два пројекта која се реализују на Медицинском факултету у Нишу, под покровитељством Министарства науке и технолошког развоја, најпре као истраживач стипендиста, а затим као истраживач сарадник.

10 Изјаве аутора



10.1 Изјава о ауторству



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ИНТЕРАКЦИЈА Th-17 ИМУНСКОГ ОДГОВОРА И ГЛУТАМАТСКЕ
ЕКСЦИТОТОКСИЧНОСТИ У ПАТОГЕНЕЗИ МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ -
КЛИНИЧКА И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА

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

У Нишу, 10.06.2013. год.

Аутор дисертације: др Милош Костић

Потпис докторанда:



10.2 Изјава о истоветности штампане и електронске верзије доктората



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: Милош Костић

Студијски програм: МОЛЕКУЛАРНА МЕДИЦИНА

Наслов рада: ИНТЕРАКЦИЈА Th-17 ИМУНСКОГ ОДГОВОРА И ГЛУТАМАТСКЕ ЕКСЦИТОТОКСИЧНОСТИ
У ПАТОГЕНЕЗИ МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ - КЛИНИЧКА И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА
СТУДИЈА

Ментор: АКАДЕМИК ПРОФ. ДР МИОДРАГ ЧОЛИЋ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 10.06.2015 год.

Аутор дисертације: др Милош Костић

Потпис докторанда:



10.3 Изјава о коришћењу



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНТЕРАКЦИЈА Th-17 ИМУНСКОГ ОДГОВОРА И ГЛУТАМАТСКЕ ЕКСЦИТОТОКСИЧНОСТИ У ПАТОГЕНЕЗИ МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ – КЛИНИЧКА И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА
која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 10.06.2014 год.

Аутор дисертације: др Милош Костић

Потпис докторанда: