

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Ivana G. Nikolić

**Uloga donora ugljen-monoksida CORM-A1 u
modulaciji eksperimentalno indukovanog
dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

University of Belgrade

Faculty of Biology

Ivana G. Nikolić

**The role of carbon monoxide-releasing molecule
CORM-A1 in modulation of experimentally
induced type 1 diabetes in C57BL/6 mice**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

dr Tamara Saksida, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Milena Kataranovski, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komisija:

dr Tamara Saksida, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Milena Kataranovski, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Stanislava Stošić-Grujičić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Ivana Stojanović, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Đorđević, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Hvala,

dr Tamari Saksida, mojoj mentorki, što je uvek bila tu za mene i imala ogromno strpljenje i razumevanje za sva moja pitanja, nedoumice i poteškoće koje su pratile izradu ove doktorske disertacije, kao i moje naučno sazrevanje. Svojim mentorstvom učinila je da naizgled nesavladive prepreke sa izvesnom dozom lakoće prebrodim, a naročito hvala na prijateljstvu i van naučnih okvira.

dr Stanislavi Stošić-Grujičić, što mi je dala priliku da postanem deo tima kojim rukovodi i upoznam se sa naučnoistraživačkim radom, što mi je prenela delić svog ogromnog znanja i što me svojim entuzijazmom podstiče da uvek idem napred, borim se i usavršavam.

dr Ivani Stojanović, na izvanrednoj saradnji i pomoći tokom tokom svih faza izrade ove disertacije, kao i motivaciji, stručnoj i moralnoj podršci.

dr Mileni Kataranovski, na predustreljivosti i velikom zalaganju, na korisnim sugestijama tokom konačne izrade ove doktorske disertacije.

dr Jeleni Đorđević, na ukazanom vremenu, poverenju i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

Milici Vujičić, dugujem zahvalnost za sve prekovremene sate i vikende koje smo zajedno provele tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove disertacije, kao i za optimizam, podršku i prijateljstvo.

Tamari Krajnović, što me bodri i širi pozitivnu energiju, i što mi je nesebična prijateljica koja je uz mene još od prvih dana diplomskih studija.

Jani Blaževski, mojoj koleginici, a prvenstveno prijateljici što je podelila sa mnom sve lepe i one manje lepe trenutke i što je verovala u mene.

Mojim kolegama **Đorđu, Danijeli, Sanji, Miljani, Mariji, Mirni i Filipu** na dobroj energiji, podršci i drugarskoj atmosferi bez kojih bi moj istraživački rad bio mnogo teži.

Ivani, Sandri, Jeleni i Marini, bilo je zadovoljstvo deliti laboratoriju sa vama.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, sestri Jeleni, bratu Gligoriju, mami Zorki i tati Gligoriju što su mi večita podrška i što uvek veruju u mene i daju mi snagu i neustrašivost za moje podvige. Bez vas ništa ne bi bilo moguće.

Uloga donora ugljen-monoksida CORM-A1 u modulaciji eksperimentalno indukovanog dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa

Sažetak

Dijabetes tipa 1 (DT1) je autoimunska inflamatorna bolest koja se razvija kao posledica uništavanja β ćelija pankreasa posredstvom autoagresivnih ćelija i njihovih pro-inflamatornih medijatora. Glavno obeležje DT1 je insulitis – infiltracija pankreasa populacijama imunskih ćelija. Makrofagi se smatraju prvim ćelijama koje infiltriraju pankreasna ostrvca i imaju važnu ulogu u aktivaciji autoreaktivnih T ćelija. Smatra se da klasično aktivisani M1 makrofagi doprinose razvoju i progresiji bolesti, dok alternativno aktivisani M2 makrofagi učestvuju u njenom sprečavanju. B limfociti imaju ulogu u produkciji autoantitela, dok su T ($CD4^+$ i $CD8^+$) ćelije jedne od glavnih efektorskih ćelija koje su uključene u ubijanje β ćelija. Citokini koje sekretuju različite imunske ćelije, uključujući makrofage i T ćelije, mogu da regulišu u kom smeru će se razviti imunski odgovor: ka Th1 (engl. *T helper*) dijabetogenom odgovoru ili Th2 protektivnom odgovoru. Aktivisani makrofagi, pomoćnički i citotoksični T limfociti, kao i sekretovani pro-inflamatorni medijatori, sinergistički učestvuju u razaranju β ćelija i različitim mehanizmima pokreću apoptozu ovih ćelija, što rezultuje nastankom autoimuskog DT1. Kako terapija DT1 uglavnom podrazumeva primenu egzogenog insulina, sve više se istražuju novi terapijski pristupi koji bi sprečili ili usporili pokrenuti autoimunski odgovor. Ugljen monoksid (CO) je potencijalni kandidat za tretman autoimunskih bolesti, kao što je DT1, zbog svojih anti-inflamatornih i anti-apoptotskih karakteristika. CO nastaje u organizmu delovanjem enzima hem oksigenaze (HO) koja razgrađuje hem do CO, biliverdina i gvožđa. Uprkos izuzetnoj toksičnosti u visokim koncentracijama, primenjen u niskim koncentracijama egzogeni CO ima terapijski potencijal kao anti-inflamatorni agens koji moduliše brojna imuno-inflamatorna stanja. Sintetisana metalo-organska jedinjenja koja oslobađaju CO (CORM engl. *Carbon Monoxide Releasing Molecule*) predstavljaju grupu jedinjenja sposobnih da otpuštaju CO na kontrolisani način u ćelijskim sistemima. Jedno od brojnih CORM

je i CORM-A1 koji se izdvaja od ostalih jedinjenja jer je rastvorljiv u vodi, ne sadrži prelazne metale u svojoj strukturi i vreme poluživota ovog jedinjenja u fiziološkim uslovima je 21,4 minut.

U ovoj studiji je po prvi put ispitivan terapijski potencijal CORM-A1 u modelu DT1 izazvanog davanjem višestrukih malih doza streptozotocina (VMDS). Utvrđivani su ćelijski i molekularni mehanizmi pokrenuti u odgovoru na tretman CORM-A1 u imunskim ćelijama, kao i efekti donora CO na nivou ciljnog tkiva, β ćelija pankreasnih ostrvaca u *in vitro* uslovima.

U *in vitro* uslovima tretman CORM-A1 nije bio toksičan za ćelije limfnog čvora, niti je uticao na proliferaciju i aktivaciju ovih ćelija stimulisanih anti-CD3/anti-CD28 antitelima. Međutim, u prisustvu CORM-A1 bila je smanjena sekrecija pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17, kao i procenat ćelija koje produkuju ove citokine, Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) i Th17 (CD4⁺IL-17⁺) ćelija, respektivno, dok je procenat Th2 (CD4⁺IL-4⁺) ćelija bio povećan. Takođe, pod uticajem donora CO bila je smanjena ekspresija transkripcionog faktora ROR γ T, koji učestvuje u diferencijaciji Th17 ćelija, dok ekspresija transkripcionih faktora Th1 i Th2 ćelija nije bila promenjena. Davanje CORM-A1 u ranom ili kasnom profilaktičkom, kao i terapijskom režimu, sprečilo je razvoj hiperglikemije u modelu DT1 izazvanim VMDS kod osetljivog visokosrodnog soja miševa C57BL/6. Klinička slika bila je praćena povećanom sekrecijom insulina, smanjenim insulitisom i manjim oštećenjem pankreasnih ostrvaca nakon tretmana CORM-A1. Kod eksperimentalnih miševa koji su primali CORM-A1 bio je smanjen procenat pro-inflamatornih M1 makrofaga i produkcija njihovih medijatora u peritoneumskoj šupljini, kao i Th1 odgovor u slezini, dok je u pankreasnim drenirajućim limfnim čvorovima bila favorizovana diferencijacija Th2 ćelija. Na nivou pankreasa davanje agensa koji oslobađa CO smanjilo je ulazak M1 makrofaga, B, CD4⁺ i CD8⁺ limfocita. Takođe, imunomodulatorni efekti CORM-A1 na nivou ciljnog tkiva uključivali su smanjeno prisustvo Th1 ćelija i povećanu zastupljenost anti-inflamatornih Th2 ćelija. Smanjena diferencijacija Th1 ćelija merena *ex vivo* bila je povezana sa manjom aktivacijom transkripcionog faktora STAT4 kod miševa koji su primali VMDS + CORM-A1. Osim efekata na imunske ćelije, tretman CORM-A1 ispoljio je direktno citoprotektivno dejstvo na nivou pankreasnih ostrvaca i β ćelija u *in vitro* uslovima.

Naime, primena donora CO redukovala je smrt pankreasnih ostrvaca i ćelija insulinoma poreklom iz miša (MIN6) i pacova (RINm5F) izazvanu pro-inflamatornim citokinima. Anti-apoptotsko dejstvo CORM-A1 uključivalo je smanjenu količinu citohroma c i manju aktivaciju egzekutorske kaspaze-3. Citoprotektivni efekti bili su poništeni kada je primenjena inaktivna forma CORM-A1, koja ne otpušta CO, ili hemoglobin, koji funkcioniše kao hvatač CO.

Rezultati ove disertacije ukazuju da se farmakološka primena CO upotrebom donora CORM-A1 predstavlja potencijalni terapijski pristup za tretman inflamatornih i autoimunskih oboljenja, uključujući i DT1.

Ključne reči: dijabetes tipa 1, donor ugljen monoksida CORM-A1, streptozotocin, diferencijacija pomoćničkih T ćelija, citokini, apoptoza β ćelija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj: [543.272.61:[616-097+591.437]]:616.379-008.64(043.3)

The role of carbon monoxide-releasing molecule CORM-A1 in modulation of experimentally induced type 1 diabetes in C57BL/6 mice

Abstract

Type 1 diabetes (T1D), an autoimmune inflammatory disorder, develops as a consequence of pancreatic beta cell destruction mediated by various pro-inflammatory mediators. The major hallmark of T1D is infiltration of different populations of immune cells into pancreas called insulinitis. Macrophages are the first cell types to infiltrate the pancreatic islets and play essential role in the development and activation of autoreactive T cells. Classically activated M1 macrophages are involved in disease development and progression, while alternatively activated M2 macrophages participate in disease suppression. B lymphocytes produce autoantibodies against pancreatic β cell antigens, and T cells are known to play a crucial role as final effectors that kill β cells. Cytokines secreted by various immune cells, including macrophages and T cells, may regulate the direction of the immune response toward helper T (Th) 1 cells, related to diabetes development, or Th2 response, which has protective role in T1D. Therefore, the activated macrophages, Th and cytotoxic T cells, as well as secreted pro-inflammatory mediators, act synergistically in destruction of β cells through different mechanisms, resulting in development of autoimmune T1D. Since current T1D therapy mainly involves insulin replacement, constant efforts are being directed toward establishing novel therapeutic approaches that could inhibit or suppress autoimmune response. Carbon monoxide (CO) could be a potential therapeutic molecule for the treatment of autoimmune diseases, such as T1D, due to its anti-inflammatory and anti-apoptotic abilities. CO, together with biliverdin and iron, arises endogenously from degradation of heme molecules by heme oxygenase (HO) enzyme. Despite extreme toxicity when given at high concentrations, exogenous CO delivered at low concentrations is showing therapeutic potential as an anti-inflammatory agent and, as such, can modulate numerous immunoinflammatory states. The carbon monoxide-releasing molecules (CORMs) represent a group of compounds capable of liberating

controlled quantities of CO in the cellular systems. Among various CORMs synthesized, CORM-A1 is one of the most promising because it is soluble in water, does not contain a transition metal and liberates CO at a much slower rate under physiological conditions (half-life 21.4 min). In our study for the first time we evaluated the therapeutic potential of CORM-A1 in preclinical model of T1D induced by multiple low doses of streptozotocin. We determined cellular and molecular mechanisms initiated in response to the CORM-A1 treatment in the immune cells, and the effects of CO donor at the target tissue, β cells of pancreatic islets, *in vitro*.

CORM-A1 did not show toxicity against lymph node cells (LNC) and did not affect proliferation and activation of LNC *in vitro* stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies. However, CORM-A1 successfully reduced the secretion of pro-inflammatory cytokines, IFN- γ and IL-17, as well as the percentage of cells that secrete these cytokines, Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) and Th17 (CD4⁺IL-17⁺) cells, respectively, whereas Th2 (CD4⁺IL-4⁺) cell population increased after the treatment. In addition, CORM-A1 significantly reduced expression of transcription factor ROR γ T, necessary for Th17 development, but the expression of Th1- and Th2-related transcription factors remained unchanged. CORM-A1, given at early or late prophylactic, as well as therapeutic treatment, suppressed hyperglycemia development in model of T1D induced by multiple low doses of streptozotocin in C57BL/6 mice. Clinical features of the disease were followed by increased insulin secretion, reduced insulinitis and lesser damage of pancreatic islets after CORM-A1 treatment. The percentage of pro-inflammatory M1 macrophages and production of their mediators in the peritoneal cavity, as well as Th1 response in the spleen were decreased, while differentiation of Th2 cells was favored in the pancreatic draining lymph nodes of mice treated with CORM-A1. Application of CO donor reduced the influx of M1, B, CD4⁺ and CD8⁺ cells in pancreas. Furthermore, immunomodulating effects of CORM-A1 in target tissue included decreased proportion of Th1 cells and increased percentage of anti-inflammatory Th2 cells. Reduced differentiation of Th2 cells *ex vivo* was followed by lower activation of transcription factor STAT4 in mice treated with VMDS + CORM-A1. Besides the effects on immune cells, CORM-A1 treatment showed direct cytoprotective effects in the pancreatic islets and β cells *in vitro*. CORM-A1 reduced cytokine-induced death of pancreatic islets and mouse (MIN6) and rat (RINm5F) insulinoma cells. Anti-apoptotic effect of CORM-A1

was mediated through the downregulation of cytochrome c amount and suppression of caspase 3 activity. Finally, the cytoprotective effect of CORM-A1 was lost when iCORM-A1, which does not liberate CO in the cellular environment, was applied or when haemoglobin, a scavenger of CO, was present.

Our findings generate valuable proof of concept of how pharmacological application of CO delivered by CORM-A1 can be exploited for potential translation to clinical settings for treatment of inflammatory and autoimmune diseases, including T1D.

Key words: type 1 diabetes, carbon monoxide-releasing molecule CORM-A1, streptozotocin, Th cell differentiation, cytokines, β cells apoptosis

Research area: Biology

Area of special interest: Immunobiology

UDK number: [543.272.61:[616-097+591.437]]:616.379-008.64(043.3)

Lista skraćenica

Apaf – faktor koji aktivira apoptotske kaspaze (engl. *Apoptotic Protease Activating Factor*)

APC – alofikocijanin (engl. *Allophycocyanin*)

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

BB –engl. *BioBreeding*

BSA - goveđi albumin iz seruma (engl. *Bovine Serum Albumine*)

CD –engl. *Cluster of differentiation*

CNS – centralni nervni sistem

CO – ugljen-monoksid

ConA – konkanavalin A (engl. *Concanavalin A*)

CORM – metalo-organska jedinjenja koja oslobađaju ugljen-monoksid (CORM engl. *Carbon Monoxide-Releasing Molecule*)

ĆLČ – ćelije limfnog čvora

DĆ – dendritske ćelije

DEPC – engl. *Diethylpyrocarbonate*

DMEM – engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DT1 – dijabetes tipa 1

DTT – ditiotritol

EAE – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

ELISA – engl. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FACS – protočna citofluorimetrija (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

FCBS – rastvor za protočnu citofluorimetriju (engl. *Flow Cytometry Staining Buffer*)

FCS – serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Calf Serum*)

FITC – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

FoxP3 – engl. *Forkhead Box P3*

GAD65 – dekarboksilaza glutaminske kiseline 65 (engl. *Glutamic Acid Decarboxylase*)

GATA-3 – engl. *GATA Binding Protein 3*

GLUT2 – transporter za glukozu 2 (engl. *Glucose Transporter 2*)

GM-CSF – faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

HBSS – Henksov rastvor (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*)

Hgb – hemoglobin

HLA – humani leukocitni antigen (engl. *Human Leukocyte Antigen*)

HO – hem oksigenaza

HRP – peroksidaza poreklom iz rena (engl. *Horse Radish Peroxidase*)

IA-2 – antigen ostrvaca 2 engl. *Islet Antigen 2*

iCORM-A1 – inaktivna forma CORM-A1

IFN- γ – interferon- γ

IGRP – protein povezan sa katalitičkom subjedinicom glukoze-6-fosfata specifičnom za ostrvca (engl. *Islet-Specific Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit-Related Protein*)

IL – interleukin

iNOS – inducibilna sintaza azot-monoksida

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza

LPS – lipopolisaharid

MAPK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MFI – srednji intenzitet fluorescencije (engl. *Mean Fluorescence Intensity*)

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*)

MIN6 – ćelije insulinoma poreklom iz miša (engl. *Mouse Insulinoma*)

MTT – (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

NBT – nitroplavo tetrazolijum (engl. *Nitroblue Tetrazolium*)

NFκB – nukleusni faktor κ B

NO – azot monoksid

NOD – engl. *Nonobese Diabetic*

PB – rastvor za permeabilizaciju ćelija (engl. *Permeabilization Buffer*)

PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PC – ćelije peritoneumskog ispirka

PDLČ – pankreasni drenirajući limfni čvorovi

PE – fikoeritrin (engl. *Phycoerythrin*)

PE-Cy5 – fikoeritrin cijanin 5 (engl. *Phycoerythrin -Cyanine 5*)

PMA – engl. *Phorbol Myristate Acetate*

PMČ – mononukleusne ćelija koje infiltriraju pankreas

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

RINm5F – ćelije insulinoma poreklom iz pacova (engl. *Rat Insulinoma*)

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne vrste azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROR γ T – engl. *RAR-related orphan receptor γ*

ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygene Species*)

RPMI – engl. *Roswell Park Memorial Institute*

SMĆ – mononukleusne ćelije slezine

STAT – prenosnik signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

T-bet – engl. *T-box Transcription Factor TBX21*

TGF- β – transformišući faktor rasta β

Th – pomoćnički T limfociti (engl. *T helper*)

TMB – trimetilbenzidin

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

Treg – regulatorne T ćelije

VMDS – višestruke male doze streptozotocina

SADRŽAJ

1.	Uvod	1
1.1.	Dijabetes tipa 1	1
1.2.	Patogeneza dijabetesa tipa 1	2
1.2.1.	Genetička osnova dijabetesa tipa 1	2
1.2.2.	Uloga spoljašnjih faktora na razvoj dijabetesa tipa 1	3
1.2.3.	Autoantigeni	3
1.3.	Eksperimentalni modeli bolesti	4
1.3.1.	Dijabetes tipa 1 indukovano streptozotocinom	4
1.3.2.	Uloga ćelija urođene imunosti u nastanku dijabetesa tipa 1	5
1.3.3.	Uloga T ćelija u dijabetesa tipa 1	6
1.3.4.	Uloga citokina u oštećenju β ćelija	9
1.3.5.	Apoptoza β ćelija pankreasa	10
1.4.	Ugljen monoksid	10
2.	Ciljevi	13
3.	Materijali i metode	
3.1.	Reagensi i rastvori	15
3.2.	Dizajn eksperimenta	16
3.2.1.	<i>In vitro</i> eksperimenti	16
3.2.2.	Eksperimentalne životinje	18
3.2.3.	<i>In vivo</i> eksperimenti	18
3.2.4.	<i>Ex vivo</i> eksperimenti	19
3.3.	Izolovanje ćelija i tkiva	20
3.3.1.	Izolovanje ćelija peritoneumskog ispirka	20
3.3.2.	Izolovanje ćelija slezine, cervikalnih i pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova	20
3.3.3.	Izolovanje mononukleusnih ćelija koje infiltriraju pankreas	21
3.3.4.	Izolovanje pankreasnih ostrvaca	21
3.4.	Tehnike	22

3.4.1.	Tripsinizacija ćelija	22
3.4.2.	Određivanje broja i vijabiliteta ćelija tripan plavom bojom	22
3.4.3.	MTT test za određivanje vijabiliteta i proliferativnog indeksa ćelija	22
3.4.4.	Test za utvrđivanje apoptoze	23
3.4.5.	Merenje sekrecije proteina ELISA testom	24
3.4.6.	Merenje akumulacije nitrita Grisovom reakcijom	24
3.4.7.	Merenje oksidativnog metabolizma reakcijom redukcije nitro plavo tetrazolijum	25
3.4.8.	Metoda protočne citofluorimetrije	25
3.4.8.1.	Detekcija apoptoze aneksin V-FITC/propidijum jodid bojenjem	26
3.4.8.2.	Detekcija površinskih markera ćelija	27
3.4.8.3.	Detekcija unutarćelijskih citokina	27
3.4.8.4.	Detekcija Treg ćelija	28
3.4.8.5.	Detekcija transkripcionih faktora	29
3.4.9.	Priprema uzoraka i izolovanje RNK	29
3.4.10.	Reakcija reverzne transkripcije	30
3.4.11.	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	30
3.4.12.	Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju	32
3.4.13.	Imunoblot analiza za određivanje količine proteina	33
3.4.14.	Fluorometrijski test za detekciju aktivnosti kaspaze-3	34
3.4.15.	Priprema histoloških preparata u parafinu	34
3.4.16.	Imunohistohemijsko bojenje	35
3.5.	Statistička obrada podataka	36

4. Rezultati

4.1.	Uticaj CORM-A1 na imunske ćelije u <i>in vitro</i> uslovima	37
4.1.1.	Uticaj CORM-A1 na proliferaciju i aktivaciju ćelija limfnog čvora	37
4.1.2.	Uticaj CORM-A1 na diferencijaciju ćelija limfnog čvora	39
4.1.3.	Efekat CORM-A1 na ekspresiju transkripcionih faktora T-bet, ROR γ T i GATA-3 kod ćelija limfnog čvora	41
4.2.	Uticaj CORM-A1 na indukciju i kliničke parametre dijabetesa tipa 1	42
4.2.1.	Efekat CORM-A1 na razvoj dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa	42

4.2.2.	Efekat CORM-A1 na funkcionalnost pankreasnih ostrvaca	44
4.2.3.	Histološka analiza oštećenja pankreasnih ostrvaca	44
4.3.	Ispitivanje ćelijskih mehanizama dejstva CORM-A1	46
4.3.1.	CORM-A1 tretman smanjuje sekreciju IL-6, IFN- γ i IL-17, a povećava sekreciju IL-4 u serumu	46
4.3.2.	Ispitivanje dejstva CORM-A1 na fenotip i funkcionalnost ćelija peritoneumske šupljine	48
4.3.3.	Efekat CORM-A1 na ćelijski fenotip, ekspresiju i sekreciju citokina mononukleusnih ćelija slezine	50
4.3.4.	Uticao CORM-A1 na ćelijski fenotip, ekspresiju i sekreciju citokina u pankreasnom drenirajućem limfnom čvoru	54
4.3.5.	Efekat CORM-A1 na infiltraciju imunskih ćelija u pankreas	58
4.3.9.	Analiza prisustva subpopulacija Th ćelija u pankreasnim infiltratima	60
4.3.10.	Molekulski mehanizmi regulacije diferencijacije Th ćelija pankreasnih infiltrata	62
4.4.	Uticao CORM-A1 na β ćelije pankreasa	63
4.4.1.	Uticao CORM-A1 na funkciju pankreasnih ostrvaca u <i>in vitro</i> uslovima	63
4.4.2.	Uticao CORM-A1 na preživljavanje i apoptozu β ćelija pankreasa	64
4.4.3.	Molekulski mehanizmi kojima CORM-A1 štiti pankreasna ostrvaca od apoptoze indukovane pro-inflamatornim citokinima	66
5.	Diskusija	68
6.	Zaključci	79
7.	Literatura	81

1. Uvod

1.1. Dijabetes tipa 1

Dijabetes tipa 1 (DT1), koji se naziva i juvenilni ili insulin-zavisni dijabetes, je organ-specifična autoimunska bolest. Nastaje kao posledica ubijanja β ćelija pankreasnih ostrvaca koje proizvode insulin od strane imunskog sistema. Ovi razarajući procesi dovode do umerenog ili potpunog nedostatka insulina. U odsustvu insulina i njegovog delovanja na ciljna tkiva: jetru, mišićno i masno tkivo, nastaju poremećaji u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina. Ukoliko se bolest ne leči, ovi metabolički poremećaji mogu dovesti do sistemske depresije centralnog nervnog sistema (CNS), kome i smrti. Stoga, osobe obolele od DT1 zahtevaju doživotni tretman lečenja egzogenim insulinom. DT1 se najčešće javlja kod dece i adolescenata, mada se bolest može razviti i kasnije u životu (Kelly i sar, 2003). Prevalenca bolesti se razlikuje u zavisnosti od lokacije i kreće se od 0,1/100000 godišnje u Kini i Venecueli pa do 36,5–36,8/100000 godišnje u Finskoj i Sardiniji, dok je najviša incidenca primećena kod dece uzrasta 10 do 14 godina (Maahs i sar, 2010). U poslednjih 30 godina, prevalenca bolesti je u porastu u razvijenim zemljama. Preko 5,3 miliona ljudi u svetu ima DT1 i svake godine više od 218000 ljudi razvije ovu bolest (Cooke i sar, 2004).

DT1 obuhvata dve različite faze: insulitis, tokom koga različite populacije imunskih ćelija infiltriraju pankreasna ostrvca, i dijabetes, kada je većina β ćelija ubijena, što za posledicu ima pojavu hiperglikemije usled nedovoljne produkcije insulina koji bi regulisao nivo glukoze u krvi. Osobe obolele od DT1 mogu imati insulitis dugi niz godina pre ispoljavanja kliničkih znakova dijabetesa (Mathis i sar, 2001). Smatra se da se klinički znaci pojavljuju kada je razoreno 80–90% β ćelija, kada preostale β ćelije ne mogu povećanom sekrecijom da nadomeste nedostatak insulina. Pretpostavlja se da tokom patogeneze bolesti postoje dve kontrolne tačke. Prva kontrolna tačka je prepoznavanje autoantigena ostrvaca. Oslobađanje autoantigena β ćelija je povezano sa apoptozom ovih ćelija, koja može posledica ćelijskog oštećenja ili programiranog razvića β ćelija. Prelazak iz nedestruktivnog u destruktivni insulitis predstavlja drugu kontrolnu tačku i ovaj proces je takođe potpomognut ćelijskim oštećenjima. Moguće je da druga kontrolna tačka uključuje sticanje novih efektorskih funkcija T ćelija, povećanu produkciju pro-inflamatornih medijatora, oslobađanje prethodno nedostupnih autoantigena β ćelija koji ubrzavaju progresiju bolesti ili gubitak

regulatornih mehanizama zbog poremećaja u broju ili funkciji regulatornih T ćelija (Treg) (Herold i sar, 2013).

1.2. Patogeneza dijabetesa tipa 1

I pored intenzivnih istraživanja na polju rasvetljavanja etiologije DT1, uzrok nastanka bolesti i dalje je nepoznanica. Smatra se da ne postoji pojedinačni uzročnik bolesti, već da je DT1 rezultat kompleksne interakcije genetičke predispozicije i faktora spoljašnje sredine (Bluestone i sar, 2010).

1.2.1. Genetička osnova dijabetesa tipa 1

Tokom brojnih studija na ljudima i animalnim modelima bolesti, otkriveni su lokusi za koje se pretpostavlja da povećavaju rizik za razvoj DT1. Od svih do sada otkrivenih lokusa, najčešći polimorfizam asociran sa pojavom bolesti primećen je kod alela II klase glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC II engl. *Major Histocompatibility Complex*). Kombinacija specifičnih alela gena MHC II klase, kao što su humani leukocitni antigen (HLA engl. *Human Leukocyte Antigen*)-DQ2 ili HLA-DQ8 i HLA-DR3 ili HLA-DR4, povezuje se sa povećanim rizikom za razvoj DT1. Naime, pretpostavlja se da kod nosioca ovih polimorfizama dolazi do neodgovarajuće prezentacije sopstvenih antigena naivnim limfocitima tokom procesa njihovog sazrevanja u timusu, što dovodi do nepotpunog uklanjanja autoreaktivnih limfocita (Pirot i sar, 2008). Osim lokusa MHC II klase, i polimorfizam lokusa za insulin koji se dovodi u vezu sa povećanom predispozicijom za razvoj DT1 ogleda se u broju varijabilnih tandemskih ponovaka (VNTR engl. *Variable Numbers of Tandem Repeat*) koji se nalaze 365 baznih parova uzvodno od početka translacije i utiču na nivo ekspresije gena za insulin. Naime, mali broj VNTR uzrokuje povećanu ekspresiju gena u pankreasu, a smanjenu ekspresiju u timusu, što takođe može dovesti do neefikasnog ubijanja autoreaktivnih T ćelija tokom procesa njihovog sazrevanja (Kim i Polychronakos, 2005). Takođe, i polimorfizmi gena uključenih u prezentaciju antigena i imunski odgovor, mogu uticati na podložnost osoba da razviju brži inflamatorni i imunski odgovor na određeni stimulus, te povećati rizik od pojave autoimunosti (Todd i sar, 2007).

1.2.2. Uloga spoljašnjih faktora na razvoj dijabetesa tipa 1

Osim genetičke strukture, i faktori spoljašnje sredine doprinose razvoju DT1. Pretpostavlja se da neke virusne infekcije, komponente hrane, kao što su žitarice, gluten, kravlje mleko, zatim vaccine, toksini, stres i klimatski faktori mogu biti okidači koji će dovesti do razvoja DT1 (Knip i sar, 2005). Patogeni mogu biti okidači direktnom infekcijom β ćelija, oslobađanjem pro-inflamatornih citokina u odgovoru na infekciju, naročito na mestu pankreasnog tkiva, ili usled molekulske mimikrije antigena (Craig i sar, 2013). Pojedine virusne infekcije dovode se u vezu sa DT1, ali njihova uloga nije još potvrđena. Poznato je da kongenitalna infekcija rubela virusom može da izazove oštećenje β ćelija i nosi rizik od 20% da inficirane osobe razviju DT1 (Menser i sar, 1978). Smatra se da enterovirusi mogu da uzrokuju oštećenje β ćelija na dva načina: mogu direktno da inficiraju i unište β ćelije ili pokrenu autoimunski odgovor protiv njih. Ove ideje podržava činjenica o homologiji koksaki virusa B4 i dekarboksilaze glutaminske kiseline 65 (GAD65 engl. *Glutamic Acid Decarboxylase*), koja je jedan od autoantigena u DT1, kao i podaci o povećanom titru antitela za koksaki B4 virus kod osoba obolelih od DT1 (Hyöty H, 1979; Yoon i sar, 1979; Jaïdane i Hober, 2008).

1.2.3. Autoantigeni

Prvi znaci autoimunosti usmerene protiv β ćelija, koji često mogu da se detektuju mesecima, pa čak i godinama pre nego što se pojave klinički simptomi bolesti, predstavljaju cirkulišuća antitela specifična za autoantigene β ćelija koja podukuju B limfociti (Pihoker i sar, 2005). Još su 1974. godine Bottazzo i saradnici otkrili autoantitela u serumu bolesnika što je bio direktan dokaz da je DT1 autoimunska bolest (Bottazzo i sar, 1974). Najčešća autoantitela kod predijabetičnih osoba usmerena su protiv GAD65, proteina sličnog tirozin fosfatazi, IA-2 (engl. *Islet Antigen 2*), insulina, proinsulina i nedavno otkrivenog autoantigena specifično eksprimiranog na β ćelijama, transportera cinka ZnT8 (Wenzlau i sar, 2007). Preko 90% novodijagnostikovanih osoba obolelih od DT1 imaju autoantitela za jedan ili više ovih autoantigena (Pihoker Ci sar, 2005). Studije humanog genoma i funkcijske studije na animalnim modelima DT1 ukazuju da je insulin (ili proinsulin) primarni autoantigen za inicijaciju bolesti, dok su drugi molekuli specifični za ostrvca, kao što su hromogranin A i IGRP (engl. *Islet-*

Specific Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit-Related Protein), uključeni u progresiju bolesti (Krishnamurthy i sar, 2006; Nakayama i sar, 2005).

1.3. Eksperimentalni modeli bolesti

Studije na eksperimentalnim modelima značajno su doprinele razumevanju antigena, ćelija i mehanizama koji se nalaze u osnovi razvoja i progresije DT1. Takođe, u širokoj su upotrebi prilikom ispitivanja potencijalnih terapeutika za lečenje DT1. Eksperimentalni modeli bolesti mogu da se uspostave na više načina, od hemijskog uklanjanja β ćelija do stvaranja glodara koji spontano razvijaju DT1. Dva modela DT1 koja se najčešće koriste u istraživanjima jesu modeli kod kojih se bolest razvija spontanom putem, NOD (engl. *Nonobese Diabetic*) miševi i BB (engl. *BioBreeding*) pacovi (Yang i Santamaria P, 2006). Osim spontanog razvoja bolesti, eksperimentalnim životinjama se DT1 može indukovati i upotrebom hemijskih agenasa, kao što su streptozotocin i aloksan. Oba agensa specifično uništavaju β ćelije pankreasa, jer imaju hemijsku strukturu sličnu glukozi i na taj način bivaju prepoznati od strane β ćelija.

1.3.1. Dijabetes tipa 1 indukovano streptozotocinom

Streptozotocin [2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrozoureido)-D-glukopiranoza] je antibiotik koga sintetiše mikroorganizam *Streptomyces achromogenes* i poseduje anti-tumorske, onkogene i dijabetogene karakteristike (Szkudelski, 2001). Nakon intraperitoneumske ili intravenske administracije, streptozotocin ulazi u β ćelije pankreasa preko transportera za glukozu GLUT2 (engl. *Glucose Transporter 2*). Kada se nađe u ćeliji, dovodi do alkilovanja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), što ima za posledicu aktivaciju poli adenzindifosfat ribozo-sintaze i smanjenje nikotinamid-dinukleotida, redukovanje ćelijskog adenzin-3-fosfata i inhibiciju produkcije insulina (Wang i Gleichmann H, 1998). S obzirom na to da je streptozotocin donor azot monoksida (NO), pretpostavlja se da u β ćelijama streptozotocin predstavlja i izvor slobodnih radikala koji doprinose oštećenju DNK i smrti ćelija (Lenzen, 2008b).

Eksperimentalni model DT1 može da se indukuje primenom višestrukih malih doza streptozotocina (VMDS). U ovom modelu se streptozotocin primenjuje kod osetljivih sojeva miševa ili pacova davanjem subtoksičnih doza tokom 4 do 5 uzastopnih dana koje dovode do blagog oštećenja β ćelija, oslobađanja autoantigena i

postepenog razvoja insulitisa kod eksperimentalnih životinja (Like i Rossini, 1976; Lukic i sar, 1998). Doze primenjenog streptozotocina u ovom modelu bolesti kreću se od 20 do 40 mg/kg telesne mase dnevno, zavisno od vrste i soja životinja. U VMDS modelu DT1 bolest se razvija sporo, 2–3 nedelje nakon početka primene streptozotocina (Elias i sar, 1994). Tokom indukcije bolesti dolazi do smanjenja broja i veličine pankreasnih ostrvaca što je praćeno i smanjenom sekrecijom insulina (Lenzen, 2008b). Za razliku od ovog modela, koji podrazumeva autoimunske procese (Elliott II i sar, 1997), primena streptozotocina u pojedinačnoj visokoj dozi (100–200 mg/kg telesne mase miševa) dovodi do brzog razaranja β ćelija pankreasa i razvoja hiperglikemije. Ovakav način davanja streptozotocina indukuje „toksični“ dijabetes, koji nije u osnovi autoimunski i često se koristi u modelima transplantacije pankreasnih ostrvaca ili embrionskih i indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija ispod kapsule bubrega (Deeds i sar, 2011; Song i sar, 2009).

1.3.2. Uloga ćelija urođene imunosti u nastanku dijabetesa tipa 1

Brojne studije ukazuju da ćelije urođenog imunskog sistema imaju ulogu i u inicijaciji i u razvoju DT1. Studije na životinjama nakon tretmana VMDS pokazale su da su makrofagi prve ćelije koje infiltriraju ostrvca (Lukic i sar, 1998; Kolb-Bachofen i sar, 1988) i sa dendritskim ćelijama (DĆ) predstavljaju najbrojniju populaciju ćelija u infiltratima pankreasnih ostrvaca tokom rane faze insulitisa. Ključna uloga makrofaga je obrada i prezentacija autoantigena β ćelija T limfocitima. Nakon preuzimanja autoantigena β ćelija, makrofagi migriraju u pankreasne drenirajuće limfne čvorove (PDLČ) gde prezentuju antigene, regrutuju pomoćničke T limfocite (Th engl. *T helper*) i pokreću autoimunski odgovor (Calderon i Unanue, 2012; Calderon i sar, 2014).

Makrofage odlikuje visoka plastičnost zavisno od okruženja u kome se nalaze. Dva glavna fenotipa su klasično aktivisani M1 makrofagi i alternativno aktivisani M2 makrofagi. M1 makrofage odlikuje pro-inflamatorni fenotip i ove ćelije imaju ključnu ulogu u odbrani organizma od bakterijskih i virusnih infekcija. M2 makrofagi imaju prvenstveno anti-inflamatorne osobine i povezani su sa odgovorom organizma na infekcije helminata, remodelovanjem tkiva, hroničnom inflamacijom, fibrozom i kancerom (Akira i sar, 2013). Dok M1 makrofagi učestvuju u indukovanju i progresiji bolesti, smatra se da M2 imaju protektivnu ulogu u DT1 (Espinoza-Jiménez i sar, 2012).

Pokazano je da je u prisustvu interleukina 4 i 13 (IL-4 i IL-13) favorizovana diferencijacija alternativno aktivisanih M2 makrofaga čiji adoptivni transfer štiti NOD miševu od razvoja DT1 (Parsa, 2012). Takođe, kod miševa, kojima je bolest izazvana primenom VMDS, transfer M2 makrofaga doveo je do smanjenja hiperglikemije i insulitisa u pankreasu, kao i smanjenja sekundarnih posledica, kao što je oštećenje bubrega (Zheng i sar, 2011). Takođe, miševu koji su imali hroničnu infekciju helmintom *Taenia crassiceps* i kojima je DT1 indukovani VMDS karakterisalo je odsustvo insulitisa, povećani broj M2 makrofaga i sekrecija IL-4 citokina, dok je sekrecija faktora nekroze tumora (TNF engl. *Tumor Necrosis Factor*) bila smanjena (Espinoza-Jiménez i sar, 2010).

Pored uloge u prezentaciji antigena β ćelija autoreaktivnim limfocitima i usmeravanju njihove diferencijacije, makrofagi imaju i direktan uticaj na uništavanje ćelija pankreasnih ostrvaca koje produkuju insulin. Aktivisani makrofagi produkuju pro-inflamatorne citokine IL-1 β , TNF, reaktivne vrste kiseonika (ROS engl. *Reactive Oxygene Species*) i reaktivne vrste azota (RNS engl. *Reactive Nitrogen Species*) koji mogu sami ili sinergistički da indukuju oštećenja i smrt β ćelija (Yoon i Jun, 2005; Arnush i sar, 1998; Lukic i sar, 1998).

1.3.3. Uloga T ćelija u dijabetesu tipa 1

Osim što makrofagi i DC obrađuju i prezentuju autoantigene β ćelija, oni učestvuju i u oblikovanju adaptivnog imunskog odgovora posredovanog T i B limfocitima. Produkcijom pro-inflamatornih ili supresivnih citokina ćelije urođene imunosti definišu milje u kojem će se antigen-specifične T ćelije aktivirati i dovesti do štetnog odgovora, posredovanog dijabetogenim efektorskim T ćelijama, ili, pak, protektivnog lokalnog imunskog odgovora u pankreasu, posredovanog Treg ćelijama (Lehuen i sar, 2010). Pomoćničke T ćelije (Th engl. *T helper*) mogu da se diferenciraju u različite efektorske subpopulacije, uključujući Th1, Th2 i Th17 ćelije, što je dirigovano kombinacijom ko-stimulatornih molekula, citokina prisutnih u njihovom mikrookruženju i specifičnih transkripcionih faktora (Zhou i sar 2009). Th1 ćelije učestvuju u odbrani organizma od unutarćelijskih patogena, pojačavaju pro-inflamatornu imunost posredovanu ćelijama i indukuju reakciju kasne preosetljivosti. U odgovoru na stimulaciju antigen-prezentujućim ćelijama (APC) Th1 ćelije produkuju

citokine interferon γ (IFN- γ), IL-2, faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF) i IL-3. Osim prepoznavanja antigena na APC ćelijama, da bi se razvile Th1 ćelije potrebno je i prisustvo citokina IL-12 i IFN- γ , koji iniciraju unutarćelijsku fosforilaciju tirozina na transkripcionim faktorima: prenosniku signala i aktivatoru transkripcije 4 (STAT4 engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*), STAT1 i aktivaciju T-bet (engl. *T-box Transcription Factor TBX21*) (Zhou i sar, 2009; Jiang i Dong, 2001). Th2 ćelije proizvode citokine IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 i učestvuju u humoralnoj imunosti, odbrani organizama od vanćelijskih patogena i alergijskim reakcijama. U prisustvu IL-4 aktiviraju se transkripcioni faktori uključeni u razvoj Th2 limfocita, GATA-3 (engl. *GATA Binding Protein 3*) i STAT6 (Zheng i Flavell, 1997; Zhu, 2010). Th17 ćelije, subset CD4⁺ T limfocita koje prvenstveno proizvode IL-17, učestvuju u uklanjanju ekstraćelijskih bakterija i gljiva i bitne su u patogenezi autoimunskih bolesti (Chen i sar, 2007). Smatra se da su ključni citokini koji usmeravaju diferencijaciju naivnih CD4⁺ T ćelija u Th17 ćelije transformišući faktor rasta β (TGF- β), IL-6, IL-23 i IL-21, dok su ROR γ t (engl. *RAR-related orphan receptor γ*) i STAT3 transkripcioni faktori neophodni za razvoj ovih ćelija (Korn i sar, 2007).

Studije na NOD miševima ukazuju da je Th1 populacija ćelija, koja između ostalih sekretuje citokine IFN- γ i IL-2, ključni medijator autoreaktivnosti β ćelija pankreasa. Naime, transfer Th1 ćelija kod neonatalnih NOD miševa uzrokuje DT1 (Katz i sar, 1995), dok su transgeni NOD miševi BDC2.5 koji nemaju receptor za IFN- γ rezistentni na indukovanje dijabetesa ciklofosfamidom (Wang i sar, 1997). Takođe, u modelu bolesti indukovanom davanjem VMDS dolazi do pokretanja Th1 odgovora uz istovremeno smanjenje Th2 odgovora (Müller i sar, 2002). Uloga Th17 ćelija u patologiji autoimunskih bolesti se sve više ispituje i postoje studije koje pokazuju da su možda Th17 ćelije uključene i u početak i razvoj DT1. Nagoveštaj o vezi između DT1 i Th17 ćelija dala je studija na NOD miševima koja je pokazala da je IL-17 visoko eksprimiran u pankreasu ovih miševa (Vukkadapu i sar, 2005). U drugoj studiji pokazano je da dolazi do ubrzanog razvoja DT1 kada se citokin IL-23, koji promovise ekspanziju Th17 ćelija, daje istovremeno sa subdijabetogenim VMDS što sugerise o potencijalnoj ulozi Th17 ćelija u ovom modelu bolesti (Mensah-Brown i sar, 2006). Osim u eksperimentalnim modelima, povećana ekspresija i sekrecija IL-17 primećena je

u perifernoj krvi dece obolele od DT1 (Honkanen i sar, 2010). Nasuprot tome, subpopulacija Th2 ćelija i njihovih citokina IL-4, IL-5 i IL-13 imaju protektivan efekat u autoimunskom DT1 (Suarez-Pinzon i sar, 2001).

Osim efektorskih T ćelija, CD4⁺ T limfociti mogu da se diferenciraju i u Treg, koje poseduju imunosupresorne karakteristike. Ove ćelije karakteriše ekspresija visokoafinitetnog receptora za IL-2 (CD25) i aktivnost FoxP3 transkripcionog faktora (Jiang i Dong, 2013). Smatra se da je imunska tolerancija regulisana finim balansom Treg i efektorskih T ćelija. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T ćelije, koje poseduju regulatornu funkciju *in vitro* i *in vivo*, imaju bitnu ulogu u kontrolisanju odgovora efektorskih T ćelija i održavanju periferne tolerancije. Pokazano je da je razvoj DT1 kod NOD miševa ubrzan i njegov intenzitet pojačan nakon tretmana anti-CD25 antitelom ili u odsustvu FoxP3, ističući važan doprinos Treg ćelija u DT1 (Wang i sar, 2008; Mellanby i sar, 2007; Chen i sar, 2005).

Pored pomoćničkih i regulatornih T ćelija, studije na NOD miševima pokazale su da razvoj autoimuskog dijabetesa zavisi i od citotoksičnih CD8⁺ T ćelija, s obzirom na to da DT1 može da se prenese na imunokompromitovane singene primaocce kombinacijom CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija iz donorskih NOD miševa, ali ne i ako se transferom prenese samo jedan subset T ćelija (Phillips i sar, 2009). CD8⁺ T ćelije mogu da ubiju β ćelije preko citotoksičnosti posredovane MHC molekulom I klase eksprimiranom na β ćelijama ili da sekretuju perforine koji prave pore na β ćelijama, a potom granzime koji ih ubijaju. Zajedno sa CD4⁺ ćelijama mogu da produkuju citokine, kao što je IFN-γ koji dalje indukuje ekspresiju FAS receptora smrti i produkciju hemokina od strane β ćelija. Aktivacija FAS preko FAS liganda koji se nalazi na aktiviranim T ćelijama može da inicira apoptozu β ćelija, dok produkcijom hemokina β ćelije pankreasa dodatno privlače mononukleusne ćelije i time pojačavaju inflamaciju (Eizirik i sar, 2009). Osim toga, IFN-γ može da aktivira makrofage i dovede do povećane produkcije pro-inflamatornih citokina, uključujući IL-1β i TNF. Ova interakcija T ćelija i makrofaga pojačava stres β ćelija posredovan imunskim sistemom i doprinosi njihovoj destrukciji.

1.3.4. Uloga citokina u oštećenju β ćelija

Prisustvo citokina u pankreasnim ostrvcima može imati dvojak efekat, jer citokini mogu podsticati autoimunost i uništavanje β ćelija (destruktivni insulitis) ili mogu suprimirati autoimunske i inflamatorne procese koji bi doveli do oštećenja β ćelija (benigni insulitis). Primećena je veza između destruktivnog insulitisa β ćelija i ekspresije pro-inflamatornih citokina, kao što su IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-2 i IL-12 kod NOD miševa i BB pacova, dok ekspresija citokina Th2 ćelija (IL-4 i IL-10) i TGF- β ima protektivan efekat u DT1 (Rabinovitch i Suarez-Pinzon, 2003). Studije na izolovanim pankreasnim ostrvcima pokazale su da IL-1 β , TNF i IFN- γ mogu imati citostatski efekat na β ćelije, tako što inhibiraju sintezu i sekreciju insulina, ali i citotoksični efekat jer je pokazano da, najčešće primenjeni u kombinaciji, uništavaju β ćelije pacovskih i humanih pankreasnih ostrvaca (Wang i sar, 2009; Rabinovitch i Suarez-Pinzon, 1998). U modelu bolesti indukovanom VMDS dolazi do povećanja produkcije IFN- γ i TNF i na proteinskom i genskom nivou u pankreasnim ostrvcima, uz istovremeno smanjenje količine anti-inflamatornih citokina IL-4 i IL-10 (Müller i sar, 2002).

U β ćelijama pankreasnih ostrvaca pro-inflamatorni citokini TNF, IL-1 β i IFN- γ pokreću različite unutarćelijske signalne mehanizme. U *in vitro* studiji na modelu β ćelija pankreasa, odnosno ćelijama insulinoma poreklom iz pacova, pokazano je da TNF izaziva fosforilaciju i aktivaciju p38 i c-Jun N-terminalne kinaze (JNK). Ove kinaze pripadaju porodici mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), aktiviraju se u odgovoru na stres i pro-inflamatorne citokine (Saldeen i sar, 2001) i učestvuju u apoptozi ćelija (Liu i Lin, 2005). Vezivanje IL-1 β za svoj receptor na β ćelijama pokreće aktivaciju nukleusnog faktora κ B (NF κ B), MAPK i protein kinaze C (Eizirik i Mandrup-Poulsen, 2001). Nakon vezivanja za svoj receptor IFN- γ aktivira familiju Janus kinaza i sledstveno STAT1 transkripcioni faktor i pokreću ekspresiju gena kao što su kaspaze, Fas i inducibilna sintaza azot-monoksida (iNOS) (Battle i Frank, 2002). Na ovaj način citokini mogu sinergističkim delovanjem da naruše stabilnost β ćelija i dovedu do njihove apoptoze (Padgett i sar, 2013).

1.3.5. Apoptoza β ćelija pankreasa

Intenzivna, specifična destrukcija β ćelija pankreasnih ostrvaca predstavlja obeležje DT1. Apoptoza se smatra glavnim tipom ćelijske smrti β ćelija pankreasa i odvija se na dva načina: spoljašnjim putem apoptoze, koji podrazumeva aktivaciju receptora smrti, ili unutrašnjim, mitohondrijskim putem (Eizirik i Mandrup-Poulsen, 2001). Ova dva puta konvergiraju aktivacijom zajedničkih nizvodnih cistein-protein kaspaza, koje seku veliki broj unutarćelijskih proteina i tako vode ćeliju u smrt (Siegel, 2006). Unutrašnji ili mitohondrijski put apoptoze karakteriše oslobađanje pro-apoptotskih molekula iz intermembranskog prostora mitohondrija, kao što je citohrom c, koji zajedno sa faktorom koji aktivira apoptotske kaspaze (Apaf engl. *Apoptotic Protease Activating Factor*) formira apoptozom i aktivira kaspazu-9 (Würstle i sar, 2012; Yuan i Akey, 2013). Aktivirana kaspaza-9 pokreće aktivaciju efektorskih kaspaza-3, -6 i -7 koje vode ćeliju u apoptozu. Članovi Bcl-2 (engl. *B-cell Lymphoma 2*) familije proteina predstavljaju glavne regulatore mitohondrijskog apoptotskog puta (Marsden i Strasser, 2003; Degli Esposti i Dive, 2003). Anti-apoptotski članovi, koje karakteriše prisustvo četiri Bcl-2 homologa domena (BH engl. *Bcl-2 Homology*) i u koje spadaju Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1, smanjuju permeabilnost spoljašnje membrane mitohondrija i posledično oslobađanje citohroma c, tako da imaju kritičnu ulogu u ćelijskom preživljavanju (Kroemer i sar, 2007). Pro-apoptotski članovi (Bax, Bak i Bok) i članovi koji poseduju samo BH3 domen (Bid, Bad, Bak, Bim, Bmf, Hrk, Noxa i Puma; engl. *BH3-only*) promovišu permeabilnost spoljašnje membrane mitohondrija, formiraju dimere koji prave kanale na membrani mitohondrija i omogućavaju izlazak citohroma c, tako da su esencijalni za apoptozu (Strasser, 2005).

1.4. Ugljen monoksid

Ugljen monoksid (CO) poznat je kao tihi ubica, jer prekomerno udisanje ovog gasa bez boje i mirisa ima letalan ishod. Takođe je zagađivač životne sredine, koji nastaje usled nepotpune oksidacije fosilnog goriva, te je prisutan u visokoj koncentraciji u izduvnim gasovima vozila, kao i dimu cigareta (Von Burg, 1999). Međutim, ovoj dogmi protivi se činjenica da svaka sisarska ćelija eksprimira enzim hem oksigenazu (HO), koja razgrađuje hem grupu do CO, pored biliverdina i gvožđa. Postoje konstitutivna HO-2 i inducibilna HO-1 izoforma HO. Zbog svojih osobina da modulišu

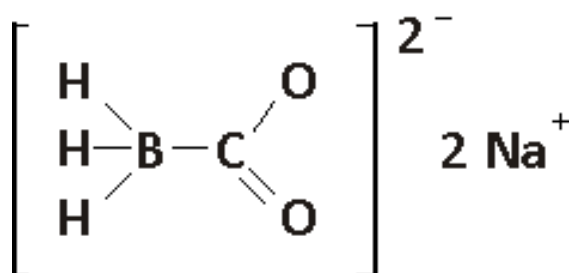
brojne fundamentalne ćelijske funkcije, HO sistem se smatra regulatorom homeostaze. Ovo se posebno odnosi na inducibilnu formu enzima, koja ima ulogu senzora ćelijskog stresa, kao što su oksidativni, nitrozativni, inflamatorni i metabolički, i ćelijskog oštećenja, a takođe i ulogu efektoru jer ispoljava citoprotektivno dejstvo (Motterlini i Foresti, 2014).

Studije u kojima je korišćen gasoviti CO u niskim koncentracijama, pokazale su da ovaj gas reguliše nekoliko fundamentalnih bioloških procesa, uključujući i regulaciju vaskularnog tonusa (Durante i sar, 2006), inflamacije (Otterbein i sar, 2000), neurotransmisije (Boehning i sar, 2003), ćelijske proliferacije (Song i sar, 2002), programirane ćelijske smrti (Brouard i sar, 2000) i autofagije (Lee i sar, 2011). Brojne *in vivo* prekliničke studije pokazale su da primena egzogenog CO može predstavljati efikasan tretman za bolesti koje karakteriše poremećeni inflamatorni odgovor, uključujući kolagenom indukovani artritis (Takagi i sar, 2009), akutni pankreatitis (Chen i sar, 2010) ili kolitis (Sheikh i sar, 2011). Zatim, primena CO smanjuje i inflamatorni odgovor u sepsi (Qin i sar, 2013), sprečava oštećenje pluća (Hoetzel i sar, 2009), a takođe dovodi do poboljšanja kliničkih simptoma autoimunske bolesti posredovane T ćelijama, kao što je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) (Fagone i sar, 2011). Preventivni efekti CO u navedenim bolestima uglavnom se pripisuju njegovoj sposobnosti da moduliše imunski odgovor u smeru favorizovanja anti-inflamatornog odgovora.

Osim imunomodulatornih efekata, HO-1/CO sistem ima anti-apoptotske osobine i sprečava razvoj autoimunskih bolesti, kao što je DT1. Naime, pokazano je da prekomerna ekspresija HO-1 u ćelijama insulinoma β TC3 poreklom iz miša, kao i izlaganje izolovanih pankreasnih ostrvaca CO, štiti ćelije, odnosno pankreasna ostrvca od apoptoze indukovane pro-inflamatornim citokinom TNF (Günther i sar, 2002). Takođe, studija sa transgenim NOD miševima koji su ekspimirali HO-1 u pankreasnim β ćelijama, pokazala je da su ovi miševi imali smanjeni stepen insulitisa i smanjenu frekvenciju spontanog razvoja bolesti (Huang i sar, 2010).

U cilju ispitivanja terapijskog potencijala CO mogu se primeniti tri pristupa: inhalacija gasovitog CO, indukcija ekspresije HO-1 enzima i primena sintetisanih metalo-organskih jedinjenja koja oslobađaju CO (CORM engl. *Carbon Monoxide-*

Releasing Molecule) (Fagone i sar, 2012). Kako su gasovite supstance komplikovane za čuvanje i za aplikaciju u organizam na bezbedan način, CORM predstavljaju dobru zamenu gasovitom CO, jer kontrolisano oslobađaju CO, mogu se primeniti različitim načinima davanja i tako vernije imitirati biološku aktivnost endogenog sistema HO-1/CO (Motterlini i sar, 2003; Foresti i sar, 2008). Do sada je sintetisan veliki broj donora CO koji sadrže u svojoj strukturi mangan (CORM-1), rutenijum (CORM-2 i -3), gvožđe (CORM-F3, -F7, -F8 i -F11) i bor (CORM-A1) (Gullotta i sar, 2012). Od svih sintetisanih donora, CORM-A1 ($\text{Na}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$, slika 1) izdvaja se zbog toga što se u potpunosti rastvara u vodi, ne sadrži prelazne metale u svojoj strukturi i pri fiziološkim uslovima vreme poluživota CORM-A1 i otpuštanja CO je 21,4 minuta (Motterlini i sar, 2005), što ga čini obećavajućim agansom za terapijsku primenu.



Slika 1. Strukturna formula CORM-A1.

Uprkos velikim naporima istraživača, precizni mehanizmi dejstva CORM-A1 nisu u potpunosti razjašnjeni. Pored kreiranja nove terapije, farmakološko modulisanje autoimunskih poremećaja, između ostalih i DT1, primenom CORM-A1 dalo bi i uvid u patogenezu bolesti, te zbog svega navedenog u ovoj studiji opredelili smo se da ispitamo imunomodulatorni potencijal i mehanizme delovanja CORM-A1 u modelu autoimuskog dijabetesa indukovanoj davanjem VMDS.

2. Ciljevi

Zbog svojih anti-inflamatornih i anti-apoptotskih osobina ugljen monoksid (CO) identifikovan je kao potencijalni terapeutik za tretman autoimunskih oboljenja. Kako je poznato da CO štiti β ćelije od apoptoze, kao i da prekomerna ekspresija HO-1, enzima odgovornog za nastanak endogenog CO, štiti NOD miševе od razvoja autoimunskog dijabetesa, osnovni cilj ovih istraživanja bio je ispitivanje **potencijalne uloge sintetskog jedinjenja koje na kontrolisani način otpušta CO, CORM-A1 [Na₂(BH₃CO₂)], u regulaciji autoimunosti usmerene ka β ćelijama pankreasa i definisanje njegovih ćelijskih i molekulskih meta.**

U sprovođenju navedenog opšteg cilja postavljeni su sledeći specifični ciljevi:

1. Uticaj CORM-A1 na preživljavanje i diferencijaciju subpopulacija Th ćelija limfnog čvora miševa visokosrodnog soja C57BL/6 u *in vitro* uslovima:

- Utvrđivanje efekata CORM-A1 na preživljavanje, proliferaciju i aktivaciju ćelija limfnog čvora;
- Utvrđivanje efekata CORM-A1 na produkciju citokina karakterističnih za Th1, Th17 i Th2 ćelije na nivou unutarćelijske ekspresije i na proteinskom nivou;
- Utvrđivanje efekata CORM-A1 na unutarćelijske signalne puteve uključene u diferencijaciju Th1, Th17 i Th2 ćelija.

2. Uticaj primene CORM-A1 na razvoj DT1 izazvanog davanjem VMDS miševima genetski osetljivog visokosrodnog soja C57BL/6:

- Ispitivanje dejstva ranog i kasnog profilaktičkog, kao i terapijskog režima CORM-A1 na razvoj hiperglikemije u DT1;
- Ispitivanje dejstva CORM-A1 primenjenom u ranom profilaktičkom i terapijskom tretmanu na infiltraciju imunskih ćelija u pankreas;
- Ispitivanje dejstva CORM-A1 primenjenog u ranom profilaktičkom režimu na sekreciju insulina kod eksperimentalnih životinja.

3. Utvrđivanje *ex vivo* ćelijskih i molekulskih mehanizama farmakološke modulacije DT1 primenom CORM-A1 u ranom profilaktičkom režimu kod C57BL/6 soja miševa:

- Ispitivanje uticaja CORM-A1 na sekreciju pro- i anti-inflamatornih citokina na sistemskom nivou;
- Ispitivanje uticaja CORM-A1 na fenotip i funkcijske karakteristike imunskih ćelija poreklom iz peritonealne šupljine, slezine i pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova;
- Ispitivanje efekata CORM-A1 na fenotip imunskih ćelija koje infiltriraju pankreas;
- Ispitivanje efekata CORM-A1 na unutarćelijske signalne mehanizme uključene u diferencijaciju Th ćelija u infiltratima pankreasa.

4. Utvrđivanje citoprotektivnog efekta CORM-A1 u *in vitro* uslovima na β ćelije pankreasa:

- Ispitivanje efekata CORM-A1 na sekreciju insulina pankreasnih ostrvaca u inflamatornom miljeu simuliranom dodavanjem pro-inflamatornih citokina IL-1 β +IFN- γ +TNF;
- Ispitivanje efekata CORM-A1 na preživljavanje pankreasnih ostrvaca i β ćelija u prisustvu pro-inflamatornih citokina IL-1 β +IFN- γ +TNF;
- Ispitivanje efekata CORM-A1 na molekulske mehanizme uključene u apoptozu pankreasnih ostrvaca prouzrokovanu dejstvom pro-inflamatornih citokina IL-1 β +IFN- γ +TNF.

3. Materijali i metode

3.1. Reagensi i rastvori

U eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći reagensi: medijum za uzgajanje ćelija RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*)-1640, medijum za uzgajanje ćelija DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Henksov rastvor (HBSS, engl. *Hank's Balanced Salt Solution*), serum fetusa govečeta (FCS, engl. *Fetal Calf Serum*) (PAA Laboratories, Pašing, Austrija); jugocilin, gentamicin, nistatin (Galenika, Beograd, Srbija); Folin-Ciocalteu-ov reagens (Mol, Beograd, Srbija); kolagenaza V, (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), tripsin, hemoglobin (Hgb), propidijum jodid, etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA), RNAza, dimetil sulfoksid (DMSO), ditiotreitol (DTT), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), ExtrAvidin®-peroksidaza, Triton X-100, Tween-20, aprotinin, bromfenol plavo, rastvor za izolovanje ćelija po gustini (Histopaque-®1077) (Sigma, Sent Luis, SAD); natrijum nitrit (NaNO_2), dinatrijum hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), hloroform (Merck, Darmstadt, Nemačka); natrijum karbonat (Na_2CO_3 ; Carlo Erba, Milano, Italija); kalijum natrijum tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum dihidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Analytika, Prag, Češka); natrijum hlorid (NaCl ; ICN, Aurora, Ohajo, SAD); glicerol, kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), kalijum hlorid (KCl) (LachNer, Neratovice, Češka); bakar sulfat-5-hidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), vodonik peroksid (H_2O_2), metanol, etanol (Zorka, Šabac, Srbija); konkanavalin A (Con A, Pharmacia, Upsala, Švedska); nitro plavo tetrazolijum (NBT, engl. *Nitroblue Tetrazolium*, ICN Pharmaceutical, Kosta Mesa, SAD), tripan plavo, goveđi albumin iz seruma (BSA engl. *Bovine Serum Albumine*), Tris (Fluka, Buh, Nemačka); HEPES (Flow Laboratories, Irvin, Velika Britanija); dezoksiribonukleotid-trifosfati (dNTP), nasumični heksamerni prajmeri, komercijalni pufer za reverznu transkripciju, reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije, inhibitor RNaze (Fermentas, Vilnius, Litvanija); komplet za izolovanje totalne RNK (mi-Total RNA Isolation Kit), prajmeri za gene od interesa koji su navedeni u tabeli 2 (Metabion, Martinsrid, Nemačka); prajmeri za β -aktin gen (Integrated DNA Technologies, Koralvil, SAD); komercijalna smeša za Real-Time PCR - SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija); amonijum persulfat (APS), β -merkptoetanol, natrijum dodecil sulfat (SDS) (Applichem, Darmstadt, Nemačka); paraformaldehid (PFA), glicin, N, N, N', N'-tetrametiletilen diamin (TEMED), akrilamid / bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva,

Hajdelberg, Nemačka); ECL sistem za detekciju (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija); Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija); glicergel (Dako, Glostrup, Danska); diaminobenzidin (DAB) (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD); aneksinV-FITC (BD Pharmingen, San Dijego, SAD).

Za uzgajanje ćelija insulinoma poreklom iz pacova (RINm5F engl. *Rat Insulinoma*), pankreasnih ostrvaca, ćelija peritonealnog ispirka (PĆ), mononukleusnih ćelija slezine (SMĆ), ćelija pankreasnog drenirajućeg limfnog čvora (PDLČ), mononukleusnih ćelija koje infiltriraju pankreas (PMĆ) i ćelija cervikalnog limfnog čvora (ĆLČ) korišćen je RPMI-1640 medijum, za uzgajanje ćelija insulinoma poreklom iz miša (MIN6 engl. *Mouse Insulinoma*) korišćen je DMEM medijum. U medijume za kultivisanje dodavani su: 2-merkaptotanol (50 μ M), antibiotici jugocilin (100 IU/ml) i gentamicin (100 μ g/ml), antimikotik nistatin (10 U/ml) i 10% FCS, u daljem tekstu označeni kao medijumi za kultivisanje. FCS je inkubiran 30 minuta na 56° C kako bi se inaktivirale komponente komplementa, a onda je dodavan u medijum u cilju kultivacije ćelija. PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) rastvor u vodi pravljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH = 7,4.

3.2. Dizajn eksperimenta

3.2.1. In vitro eksperimenti

In vitro eksperimenti izvedeni su na ćelijama cervikalnog limfnog čvora (ĆLČ) izolovanim iz miševa C57BL/6 soja stimulisanim anti-CD3/anti-CD28 antitelima ili na izolovanim pankreasnim ostrvcima i ćelijama koje su pandan β ćelija pankreasa (ćelije insulinoma poreklom iz miša i pacova) u simuliranim uslovima koji vode razvoju inflamacije (u prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ).

Sve ćelijske kulture gajene su u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, pri koncentraciji CO₂ od 5% i na temperaturi od 37° C (u daljem tekstu inkubacija).

Ćelije cervikalnog limfnog čvora (ĆLČ) (5 x 10⁶ po uzorku) inkubirane su 24h u prisustvu anti-CD3/anti-CD28 antitela (1 μ g/ml, eBioscience, San Dijego, SAD) i prisustvu ili odsustvu različitih doza CORM-A1 (3-25 μ M) za merenje vijabilteta i proliferativnog indeksa ćelija, dok su supernatanti ćelijskih kultura korišćeni za merenje

produkcije citokina IFN- γ , IL-17 i IL-4 ELISA testom. Protočnom citofluorimetrijom detektovana je apoptoza i nekroza ČLČ (1×10^6 po uzorku) dvostrukim bojenjem aneksin V-FITC/propidijum jodid, aktivacija ćelija fluorescentno obeleženim antitelom za površinski marker CD25, i analiza diferencijacije ćelija antitelima za površinske i unutarćelijske markere karakteristične za Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺), Th17 (CD4⁺IL-17⁺) i Th2 (CD4⁺IL-4⁺) ćelije ili za transkripcione faktore T-bet, ROR γ T i GATA-3.

RINm5F i MIN6 ćelije gajene su u sterilnim plastičnim flašicama (25 cm³) (Sarstedt, Njuton, SAD) u 5 ml medijuma za kultivisanje. Na svaka tri dana sipan je svež medijum, a ćelije su po dostizanju 80% konfluentnosti presađivane u nove plastične flašice ili su korišćene u eksperimentima. U ploče sa 96 mesta (Sarstedt) sađeno je 10⁴ RINm5F ili MIN6 ćelija po bunariću u 200 μ l medijuma.

RINm5F ćelije inkubirane su 48h u odsustvu (kontrola) ili prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu CORM-A1 (25 μ M) za merenje vijabiliteta ćelija. Za ispitivanje efekata CO RINm5F ćelije tretirane su 48h sa TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) u prisustvu ili odsustvu inaktivne forme CORM-A1 koja nema mogućnost da oslobađa CO (iCORM-A1, 25 μ M) i određivan je vijabilitet ćelija.

MIN6 ćelije inkubirane su 48h u odsustvu (kontrola) ili prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu CORM-A1 (25 μ M) za merenje vijabiliteta ćelija. Za ispitivanje efekata CO MIN6 ćelije tretirane su 48h sa TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) u prisustvu ili odsustvu hemoglobina (50 μ M, Hgb), koji vezuje CO i sprečava njegovo delovanje, i prisustvu CORM-A1 (25 μ M) i određivan je vijabilitet ćelija.

Pankreasn ostrvca (n=30) inkubirana su 48h u odsustvu (kontrola) ili prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu CORM-A1 (25 μ M) za merenje vijabiliteta i apoptoze ćelija. Za ispitivanje efekata CO pankreasna ostrvca (n=30) tretirane su 48h sa TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) u prisustvu ili odsustvu iCORM-A1 (25 μ M) i određivan je vijabilitet ćelija. S obzirom na to da je poluzivot CORM-A1 i oslobađanja CO u fiziološkim uslovima 21 minut, iCORM-A1 dobijen je rastvaranjem CORM-A1 u medijumu za kultivisanje i korišćen je nakon 24h.

Pankreasna ostrvca (n=80) inkubirana su 24h u prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu ili odsustvu CORM-A1 (25 μ M) za određivanje sekrecije insulina ELISA testom, količine proteina (citohrom c, p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-NF κ B, NF κ B i tubulin) imunoblotom i fluorometrijsko merenje aktivnosti kaspaze-3.

3.2.2. Eksperimentalne životinje

U ovom istraživanju korišćeni su miševi muškog pola soja C57BL/6 starosti 8 do 12 nedelja. Miševi su dobijeni iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu i čuvani pod standardnim uslovima sa neograničenim pristupom hrani i vodi.

Svi eksperimenti odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, odluka broj 2-26/10 od 15.01.2011.

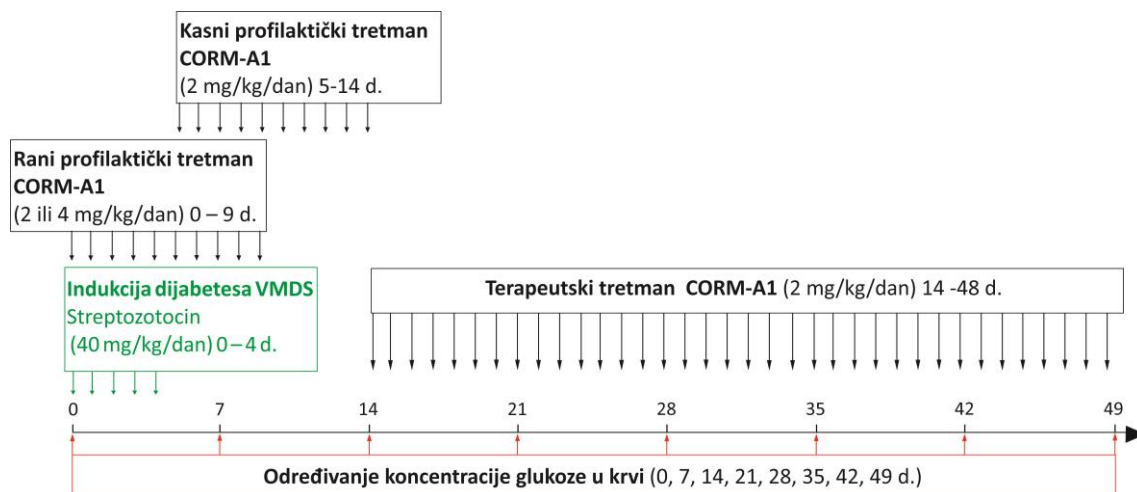
3.2.3. *In vivo* eksperimenti

DT1 indukovan je intraperitonealnim davanjem višestrukih malih doza streptozotocina (40 mg/kg telesne mase životinja, VMDS) u trajanju od 5 uzastopnih dana (0-4. dan) (slika 2). Streptozotocin je rastvaran neposredno pred primenu u hladnom 0,1 M natrijum-citratnom puferu (pH = 4,5). Dan 0 definisan je kao prvi dan davanja streptozotocina.

Jedna grupa životinja primala je VMDS + CORM-A1 u tri različita režima:

1. Rani profilaktički tretman životinja: CORM-A1 davan je u dozi od 2 mg/kg ili 4 mg/kg telesne mase životinja, svakodnevno u trajanju od 10 dana (0-9. dan);
2. Kasni profilaktički tretman: CORM-A1 davan je u dozi od 2 mg/kg telesne mase životinja, svakodnevno u trajanju od 10 dana počevši od 5. dana;
3. Terapijski tretman: CORM-A1 davan je u dozi od 2 mg/kg telesne mase životinja, svakodnevno u trajanju od 28 dana počevši od 14. dana.

Druga grupa životinja primala je VMDS i PBS (rastvarač) umesto CORM-A1.



Slika 2. Shematski prikaz *in vivo* eksperimenata.

Merenje koncentracije glukoze u krvi pomoću ručnog glukometra (GlucoSure glucometer, Apex Biotechnology Group, Hsinšu, Tajvan) iz repne vene i telesne mase, kao osnovnih kliničkih parametara bolesti, rađeno je u sedmodnevnim intervalima tokom trajanja eksperimenata, pri čemu je hiperglikemija definisana kao vrednost glukoze ≥ 11 mM, dok je promena telesne mase (%) izražavana kao promena mase u odnosu na početnu masu životinja izmerenu 0. dana eksperimenata.

Životinje koje su primale rani profilaktički i terapijski tretman CORM-A1 i/ili VMDS žrtvovane su 49. dana eksperimenata za analizu histoloških preseka pankreasa bojenih Majerovim hematoksilinom u cilju ispitivanja insulitisa, a histološki preseki pankreasa izolovanih iz miševa koji su primali rani profilaktički tretman CORM-A1 i/ili VMDS bojeni su i na nitrotirozin. Takođe, životinjama koje su primale rani profilaktički tretman CORM-A1 i/ili VMDS određivana je 49. dana eksperimenata koncentracija insulina u serumu ELISA testom.

3.2.4. *Ex vivo* eksperimenti

Ex vivo analize sprovedene su 10. dana nakon indukcije bolesti kod miševa koji su bili izloženi ranom profilaktičkom tretmanu CORM-A1. Životinjama je izolovan serum gde je određivana koncentracija citokina IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-4 i IL-10 ELISA testom. Fenotip izolovanih ćelija peritoneumskog ispirka (PĆ), mononukleusnih ćelija slezine (SMĆ), ćelija pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova (PDLČ) i mononukleusnih ćelija koje infiltriraju pankreas (PMĆ) ($0,5 \times 10^6$ po uzorku) analiziran

je na protočnom citofluorimetru određivanjem prisustva površinskih markera M1 makrofaga (F4/80⁺CD40⁺), M2 makrofaga (F4/80⁺CD206⁺), B limfocita (B220⁺), CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita i Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) ćelija, dok je 10⁶ ćelija PDLČ, SMĆ i PMĆ po uzorku istovremeno bojeno antitelima za površinske i unutarćelijske markere karakteristične za Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺), Th17 (CD4⁺IL-17⁺) i Th2 (CD4⁺IL-4⁺) ćelije i ćelije koje proizvode IL-10 (IL-10⁺).

Izolovane PC (10⁶ po uzorku), SMĆ (5 x 10⁶ po uzorku) i ćelije PDLČ (3 x 10⁶ po uzorku) posađene su u ploče sa 24 mesta i inkubirane u prisustvu lipopolisaharida (LPS, 1 μ g/ml) PC, odnosno konkanavalina A (Con A, 1 μ g/ml) SMĆ i ćelije PDLČ, 24h, a nakon inkubacije u supernatantima kultura ćelija određivana je koncentracija citokina TNF, IL-1 β , IL-6 i IL-10 u PC i IFN- γ , IL-17, IL-4 i IL-10 u SMĆ i ćelijama PDLČ ELISA testom i akumulacija nitrata PC Grisovom reakcijom. Oksidativni metabolizam PC (5 x 10⁵ po uzorku) meren je inkubacijom ćelija sa nitroplavo tetrazolijumom (NBT engl. *Nitroblue Tetrazolium*).

Iz PMĆ (5 x 10⁶ po uzorku) izolovana je iRNK za određivanje ekspresije gena za *Ifn- γ* , *Il-17*, *Il-4*, *Il-10* i *Ror γ t* metodom RT-PCR u realnom vremenu i za izolovanje proteina i analizu količine proteina p-STAT1, p-STAT4 i GATA-3 imunoblot metodom.

3.3. Izolovanje ćelija i tkiva

3.3.1. Izolovanje ćelija peritoneumskog ispirka

Eksperimentalnim životinjama je intraperitoneumski ubrizgavan hladan PBS, otvarana trbušna duplja i pažljivo, pipetom prislonjenom uz telesni zid, sakupljan ispirak. Ispirak je centrifugiran na 500 g, 5 minuta. Ćelije u talogu resuspendovane su u medijumu za kultivisanje, brojane i korišćene u daljim eksperimentima.

3.3.2. Izolovanje ćelija slezine, cervikalnih i pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova

U cilju izolovanja SMĆ, ĆLČ i ćelija PDLČ, slezina, cervikalni i pankreasni drenirajući limfni čvorovi vađeni su sterilnim priborom iz eksperimentalnih životinja. Jednoćelijska suspenzija pravljena je protiskivanjem tkiva kroz najlonsku mrežicu u Petri šolji sa medijumom za kultivisanje. Dobijena ćelijska suspenzija filtrirana je kroz

konusnu najlonsku mrežicu u epruvete i centrifugirana na 500 g, 5 minuta. Talog ćelija resuspendovan je u medijumu za kultivisanje, ćelije su brojane i korišćene u daljim eksperimentima.

3.3.3. Izolovanje mononukleusnih ćelija koje infiltriraju pankreas

U cilju izolovanja ćelija koje infiltriraju pankreas sterilnim priborom vađen je pankreas i stavljan u Petri šolju sa HBSS sa 10% FCS. Tkivo pankreasa mehaničkim putem je sitnjeno na komadiće 0,5–1 mm i prano centrifugiranjem na 250g, 10 minuta. Zatim je talog tkiva resuspendovan u HBSS sa 10% FCS u koji je dodavana kolagenaza V (2 mg/ml, 10 ml rastvora za jedan pankreas). Tkivo je mućkano 15 minuta na 37° C u vodenom kupatilu i nakon toga dodatno na sobnoj temperaturi 20s. Suspenzija je zatim naslojena na rastvor za izolovanje ćelija po gustini (Histopaque-®1077, Sigma, Sent Luis, SAD) u odnosu 1:1 i centrifugirana na 700 g bez ubrzanja i kočenja, 20 minuta. Nakon centrifugiranja mogao se uočiti prsten mononukleusnih ćelija koji se nalazio na granici dva sloja. Prsten je pažljivo sakupljan, prebacivan u nove epruvete i dva puta centrifugiran u medijumu za kultivisanje na 650g i 600g, respektivno, po 5 minuta. Nakon toga, talog ćelija resuspendovan je u medijumu za kultivisanje, ćelije su brojane i korišćene u daljim eksperimentima.

3.3.4. Izolovanje pankreasnih ostrvaca

Pankreas je vađen sterilnim priborom, stavljan u Petri šolje sa HBSS, seckan na deliće veličine 3–4 mm i prebacivan u epruvete sa HBSS i kolagenazom V (1 mg/ml, 3 ml rastvora za jedan pankreas). Rastvor je mućkan 15 minuta na 37° C u vodenom kupatilu, nakon čega je digestija tkiva kolagenazom prekidana dodavanjem hladnog HBSS. Nakon taloženja tkiva na ledu, odlivan je višak rastvora, a pankreasna ostrvca prikupljana su ručnim i pojedinačnim biranjem pomoću automatske pipete sa sterilnim nastavkom. Rastvor HBSS sa tkivom posmatran je pod svetlosnim mikroskopom i pankreasna ostrvca prebacivana su pipetom u Petri šolju sa medijumom za kultivisanje. Izolovana pankreasna ostrvca inkubirana su preko noći i korišćena u daljim eksperimentima.

3.4. Tehnike

3.4.1. Tripsinizacija ćelija

Kada su RINm5F i MIN6 ćelije dostizale 80% konfluentosti, skidane su sa podloge postupkom tripsinizacije. Medijum za kultivisanje ćelija je uklanjan, a u plastične flašice u kojima su gajene ćelije sipano je 10 ml PBS u cilju uklanjanja mrtvih i neadherentnih ćelija, viška preostalog medijuma i FCS, koji bi mogli da ometaju postupak tripsinizacije. Potom je PBS uklanjan, a na ćelije dodavan 1 ml rastvora tripsina (0,25%) i EDTA (0,02%) u PBS. Tripsin je enzim koji iseca međućelijske veze i tako prekida veze ćelija sa podlogom. Proces odlepljvanja ćelija prekidan je dodavanjem medijuma za kultivisanje u flašice u kojima su gajene ćelije. Ćelijska suspenzija centrifugirana je na 500g, 5 minuta, a talog ćelija resuspendovan u medijumu za kultivisanje, ćelije su brojane i korišćene za dalje eksperimente.

3.4.2. Određivanje broja i vijabiliteta ćelija tripan plavom bojom

Za određivanje ukupnog broja ćelija i relativnog broja živih ćelija korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo u PBS. Tripan plavo je boja koja ulazi u mrtve ćelije kroz oštećenja na njihovoj membrani, pa se na taj način mogu razlikovati mrtve (plavo obojene) od živih (nebojenih) ćelija posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom. Suspenzija ćelija mešana je sa rastvorom tripan plave boje u odnosu 1:1 ili 1:10 nakon čega su ćelije brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Türker-Bürku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po ml suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija / broj polja x 0,5 ili 2,5, zavisno od toga da li su ćelije mešane sa bojom 1:1 ili 1:10, respektivno, x 10^6 . Poznavajući broj raspoloživih ćelija, razblaživanjem suspenzije podešavana je njihova gustina za kultivaciju i dalji ekperimentalni rad. Broj živih ćelija izražen je kao procenat nebojenih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija (izraženih kao 100% ćelija).

3.4.3. MTT test za određivanje vijabiliteta i proliferativnog indeksa ćelija

Za određivanje vijabiliteta ćelija korišćen je MTT test koji se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli (MTT), koju obavljaju dehidrogenaze aktivnih mitohondrija živih ćelija, pri čemu nastaje obojeno jedinjenje formazan. Nakon

tretmana na staložena pankreasna ostrvca ili ćelija dodavano je po 100 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml). Uzorci su inkubirani 15 minuta na 37° C i zatim centrifugirani (500g, 5 min). Po centrifugiranju supernatanti su odbacivani, a na dobijen talog obojenih ćelija dodavano je 100 µl DMSO u cilju liziranja ćelija i rastvaranja formazana. Apsorbancija svetlosti merena je na 540 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006; LKB, Beč, Austrija). Dobijene vrednosti apsorbancije proporcionalne su broju živih ćelija. Proliferativni indeks ČLČ izražen je kao odnos vrednosti apsorbancije dobijene merenjem ćelija stimulisanih anti-CD3/anti-CD28 antitelima i nestimulisanih ČLČ. Rezultati vijabiliteta pankreasnih ostrvaca, RINm5F i MIN6 ćelija prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost apsorbancije kulture gajene samo u medijumu (kontrola).

3.4.4. Test za utvrđivanje apoptoze

U cilju određivanja tipa ćelijske smrti nakon tretmana pankreasnih ostrvaca urađen je ELISA (engl. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) test za detekciju apoptoze. Sam postupak izvođenja ELISA metode obavljen je prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača (Roche Applied Science, Manhajm, Nemačka). Nakon tretmana pankreasna ostrvca su prebacivana u male konusne epruvete, i nakon centrifugiranja na 500g tokom 5 minuta na talog ćelija dodavan je rastvor za liziranje ćelija (Roche Applied Science). Uzorci su lizirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirani na 500g, 5 minuta. Supernatanti uzoraka (20 µl) prebacivani su u mikroploču (Roche Applied Science) i dodavano je 80 µl prethodno napravljenog imunoreagensa. Imunoreagens se sastojao od anti-histon antitela obeleženih biotinom i anti-DNK antitela obeleženih peroksidazom poreklom iz rena (HRP engl. *Horse Radish Peroxidase*), u odnosu 1:1, rastvorenih u puferu za inkubaciju (Roche Applied Science). Uzorci su inkubirani 2h na sobnoj temperaturi, a potom je u ploču dodavan pufer za inkubaciju, 3 puta po 300 µl. Zatim je u svaki bunarić dodavano 100 µl supstrata za peroksidazu (ABTS Substrate, Roche Applied Science) i inkubirano 15–20 minuta do razvijanja boje. Reakcija je prekidana dodavanjem rastvora za prekidanje (ABTS Stop Solution, Roche Applied Science) i apsorbancija je čitana pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče korišćenjem filtera za 405 nm. Dobijene vrednosti merene apsorbancije proporcionalne su broju ćelija u apoptozi.

3.4.5. Merenje sekrecije proteina ELISA testom

Za određivanje koncentracije proteina korišćen je sendvič ELISA test pomoću koga se proteini detektuju visokom specifičnošću i osetljivošću. Korišćeni su komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje proteina: insulin (Merckodia, Upsala, Švedska), IL-17, IL-1 β , TNF (BD Bioscience, Bedford, SAD), IL-6, IL-10 (eBioscience), IFN- γ i IL-17 (R&D systems, Minesota, SAD). Postupak izvođenja ELISA testa obavljan je prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Primarnim antitelom oblagane su ploče sa 96 mesta (MaxiSorp, Nunk, Danska), 50 μ l po bunariću i ostavljane preko noći. Zatim su bunarići ispirani rastvorom PBS + 0,01% Tween (3 puta sa 300 μ l po bunariću) u cilju uklanjanja nevezanog antitela. Nespecifična mesta vezivanja na primarnom antitelu blokirana su sa po 100 μ l blokirajućeg rastvora, 1h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja u ploču je ponovo sipan rastvor PBS + 0,01% Tween (3 puta sa 300 μ l po bunariću), a potom su nanošeni uzorci (supernatanti ili standard) po 50 μ l po bunariću. Nakon dva sata uzorci su prosipani, a u ploču dodavan rastvor PBS + 0,01% Tween (3 puta sa 300 μ l po bunariću) i zatim je nanošeno 50 μ l po bunariću sekundarnog antitela obeleženog biotinom. Nakon 2h višak nevezanog antitela uklanjan je na isti način i sipan je rastvor avidina konjugovanog sa HRP (50 μ l po bunariću) i inkubirano 30 minuta u mraku. Po isteku inkubacije i po uklanjanju nevezanog avidina iz ploče, dodavan je supstrat za peroksidazu tetrametilbenzidin (TMB, 50 μ l po bunariću), pa je boja razvijana u mraku. Po razvijanju boje reakcija je prekidana sa 50 μ l 1M HCl i apsorbancija je očitavana pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče korišćenjem filtera za 405 nm. Koncentracija proteina određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za serijska razblaženja standarda poznatih koncentracija.

3.4.6. Merenje akumulacije nitrita Grisovom reakcijom

Koncentracija nitrita merena je Grisovom reakcijom. Nakon inkubacije ćelija uzimano je po 50 μ l supernatanta i mešano sa istovetnom zapreminom Grisovog reagensa (0,1% rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H₃PO₄) u pločama sa 96 bunarića ravnog dna. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i apsorbancija razvijene boje merena je na 540 nm na automatskom

čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija nitrita računata je na osnovu standardne krive dobijene određivanjem apsorbancija za poznate koncentracije NaNO₂.

3.4.7. Merenje oksidativnog metabolizma reakcijom redukcije nitro plavo tetrazolijum

Oksidativni metabolizam PC^Ć meren je na osnovu njihove sposobnosti da produkcijom superoksidnih anjona redukuju žuto obojeno jedinjenje NBT do plavo obojenog formazana. PC^Ć (5×10^5 po bunariću) inkubirane su sa NBT (500 µg/ml, ICN Pharmaceutical, Kosta Mesa, SAD) i sa PMA (engl. *Phorbol Myristate Acetate*, 100 ng/ml) 30 minuta na 37° C. Formirani formazan ekstrahovan je preko noći sa 10 mmol/l HCl sa dodatkom 10% SDS, a apsorbancija razvijene boje merena je na 540 nm i korigovana na 670 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Dobijene vrednosti merene apsorbancije proporcionalne su količini produkovanih superoksidnih anjona.

3.4.8. Metoda protočne citofluorimetrije

U osnovi metode protočne citofluorimetrije (FACS engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*) nalazi se obeležavanje markera na površini ili unutar ćelije fluorescentnim bojama, ekscitacije fluorofore pomoću jedne talasne dužine (ekscitacioni maksimum) i čitanja emisije fluorofore na emisnoj talasnoj dužini. Intenzitet fluorescencije obeleženih uzoraka detektovan je na CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analiziran korišćenjem softverskog programa FloMax (Partec GmbH, Münster, Nemačka). Prednost korišćenja ove metode ogleda se u mogućnosti detekcije fluorescencije po jednoj ćeliji, pa je moguća primena više različitih fluorofora u istom uzorku. U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće fluorescentne boje: aneksin V konjugovan sa fluorescein izotiocijanatom (FITC engl. *Fluorescein Isothiocyanate*) u kombinaciji sa propidijum jodidom, mišja antitela obeležena sa FITC, fikoeritriinom (PE engl. *Phycoerythrin*), alofikocijaninom (APC engl. *Allophycocyanin*), eFluor®660 ili PE-cijaninom 5 (PE-Cy5 engl. *PE-Cyanine 5*). Ekscitacioni i emisijski maksimumi fluorescentnih boja dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Fluorescentne boje korišćene u eksperimentima.

Fluorescentna boja	Ekscitacioni maksimum (nm)	Emisioni maksimum (nm)
Propidijum jodid	536	617
FITC	488	518
PE	488	578
PE-Cy5	488	667
APC	633	660
eFluor®660	633	668

3.4.8.1. Detekcija apoptoze aneksin V-FITC/propidijum jodid bojenjem

Dvostruko bojenje aneksin V-FITC/propidijum jodid (Biotium, Hejvard, SAD) korišćeno je da bi se detektovala promena lokalizacije fosfatidil serina u plazma membrani ćelija što je rani znak apoptoze. Kod ćelija koje nisu ušle u apoptozu, većina molekula fosfatidil serina nalazi se u citoplazmatskom sloju ćelijske membrane. Fosfatidil serin lokalizovan na površini ćelija moguće je detektovati rekombinantnim aneksinom V, proteinom koji pokazuje snažan afinitet prema fosfatidil serinu. Aneksin V konjugovan je sa FITC da bi mogao da se fluorescentno detektuje. Propidijum jodid je fluorescentna boja kojom je moguće detektovati ćelije u nekrozi, jer ova boja ulazi samo u ćelije kojima je narušen permeabilitet ćelijske membrane. Nakon inkubacije, ČLČ prebacivane su u epruvete sa PBS i centrifugirane 3 minuta, 500g. Talog ćelija resuspendovan je u 100 µl pufera za vezivanje aneksina kome je dodavano 1,5 µl aneksin V-FITC i 1,5 µl propidijum jodida (1 mg/ml). Čelije su inkubirane 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, a bojenje je prekidano dodavanjem 200 µl pufera za vezivanje aneksina. Fluorescencija je detektovana na protočnom citofluorimetru i analizirana softverskim programom. Čelije apoptoze detektovane su kao aneksin V pozitivne, dok su propidijum jodid pozitivne predstavljale nekrotične ćelije.

3.4.8.2. Detekcija površinskih markera ćelija

Po izolovanju ćelijskih suspenzija *ex vivo* kultura PĆ, SMC, ćelija PDLČ i PMĆ utvrđivan je fenotip ćelija fluorescentno obeleženim antitelima za površinske markere ćelija imunskog sistema. Aktivacija ĆLČ detektovana je bojenjem površinskog markera aktivisanih ćelija CD25. Na ćelije je dodavan PBS sa 1% BSA i centrifugirane na 500g tokom 3 minuta. Potom je talog ćelija resuspendovan u PBS sa 1% BSA u koji je dodavano odgovarajuće obeleženo antitelo ili izotipska kontrola. Izotipska kontrola predstavlja antitelo koje nije specifično za ciljni antigen, ali ima nespecifične odlike antitela koje se koristi u eksperimentu. Korišćenjem izotipske kontrole proverava se specifičnost vezivanja primarnog antitela, odnosno da nije zbog nespecifičnih interakcija sa drugim ćelijskim proteinima ili sa receptorom za konstantni deo antitela. Takođe, korišćena je i negativna kontrola u kojoj su ćelije inkubirane bez dodatog antitela (nebojane ćelije). U eksperimentima su korišćena sledeća mišja antitela i odgovarajuće izotipske kontrole: CD4-PE (izotipska kontrola: IgG2b κ lanac iz pacova), CD4-FITC (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova), CD8-PE (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 iz pacova), B220-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), F4/80-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD40 APC (izotipska kontrola IgM iz hrčka) (sva iz eBioscience) ili CD206-PE (izotipska kontrola IgG iz koze) (R&D systems). Nakon 1h inkubacije u mraku na 4° C, uzorci su prani kako bi se uklonio višak nevezanog antitela i finalno resuspendovani u 1 ml PBS. Fluorescencija je detektovana na protočnom citofluorimetru i analizirana pomoću softverskog programa.

3.4.8.3. Detekcija unutarćelijskih citokina

U cilju detekcije unutarćelijskih citokina, ćelijska suspenzija ĆLČ i *ex vivo* kulture SMC, ćelija PDLČ i PMĆ resuspendovana je u 500 µl medijuma za kultivisanje ćelija u koji je dodavano PMA (400 ng/ml) i jonomicin (800 ng/ml), koji služe za *in vitro* stimulaciju i aktivaciju ćelija, i brefeldin A (5 µg/ml). Brefeldin A je inhibitor transporta proteina i omogućava unutarćelijsku detekciju citokina jer sprečava njihovu sekreciju tako što ih akumulira u Goldžijevom kompleksu i endoplazmatskom retikulumu. Uzorci su inkubirani 4h na 37° C. Po završetku inkubacije u uzorke je dodat PBS sa 1% BSA i centrifugirani su na 800g, 3 minuta. Zatim su bojeni površinski

markeri ćelija CD4-FITC antitelom po opisanom protokolu. Nakon bojenja površinskih markera, uzorcima je dodavan rastvor PBS sa 1% BSA i nakon centrifugiranja na 800g, 3 minuta, ćelije su fiksirane 2% rastvorom paraformaldehida (Serva, Hajdelberg, Nemačka) 15 minuta u mraku na 4° C. Fiksacija je proces kojim se zadržava struktura ćelija i sprečava gubitak ćelijskih konstituenata. Potom je ćelijama dodat rastvor PBS sa 1% BSA i nakon centrifugiranja na 800g, 3 minuta, permeabilizovane su rastvorom za permeabilizaciju ćelija (PB engl. *Permeabilization Buffer*, eBioscience) preko noći u mraku na 4° C. Permeabilizacija ćelija služi za pravljenje pora na ćelijskoj membrani i tako molekuli unutar ćelija postaju dostupni. Nakon permeabilizacije, ćelije su prane dva puta u PB uz međukorak centrifugiranja na 800g, 3 minuta, i zatim su dodavana fluorescentno obeležena mišja antitela za IFN- γ -PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-4-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-10-PE (izotipska kontrola IgG2b iz pacova) (sva iz eBioscience) ili IL-17-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova) (BD Bioscience) ili odgovarajuće izotipske kontrole. Po završetku inkubacije 1h u mraku na 4° C, uzorcima je dva puta dodavan PB, uz međukorak centrifugiranja na 800g, 3 minuta i talog ćelija je finalno resuspendovan u 1 ml PBS. Fluorescencija je detektovana na protočnom citofluorimetru i analizirana pomoću softverskog programa.

3.4.8.4. Detekcija Treg ćelija

Treg ćelije detektovane su korišćenjem kompleta za bojenje Treg ćelija miša (eBioscience) prema protokolu obezbeđenim od strane proizvođača. Najpre je ćelijskim suspenzijama *ex vivo* kultura ćelija PDLČ, SMC i PMC dodavan rastvoru za protočnu citofluorimetriju (FCBS engl. *Flow Cytometry Staining Buffer*, eBioscience). Nakon centrifugiranja na 500g tokom 3 minuta, talog ćelija je resuspendovan u FCBS u koji su dodavana CD4-FITC (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova) i CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 iz pacova) i inkubirana 1h u mraku na 4° C. Potom su nevezana antitela uklanjana dodavanjem FCBS u uzorke, 2 puta uz međukorak centrifugiranja na 500g, 5 minuta. Nakon toga ćelije su fiksirane rastvorom za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (eBioscience) preko noći u mraku na 4° C. Potom je usledilo sipanje FCBS u uzorke i nakon centrifugiranja na 500g, 5 minuta, ćelije su permeabilizovane rastvorom za permeabilizaciju za FoxP3 (FoxP3 PB, eBioscience) 30 minuta u mraku na 4° C. Zatim

je u uzorke dodavano mišje antitelo FoxP3-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG2a iz pacova, eBioscience) i uzorci su bojani 1h u mraku na 4° C. U eksperimentu su korišćene odgovarajuće izotipske kontrole, kao i negativna kontrola. Po završetku inkubacije, višak nevezanih antitela uklanja se dva puta sa FoxP3 PB (eBioscience), uz centrifugiranje na 800g, 5 minuta, a ćelije su finalno resuspendovane u FCBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

3.4.8.5. Detekcija transkripcionih faktora

Za detekciju transkripcionih faktora, ĆLĆ i PMĆ su fiksirane rastvorom za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (eBioscience) preko noći u mraku na 4° C. Potom im je dodavan FCBS (eBioscience) uz centrifugiranje na 500g, 5 minuta i permeabilizovane su sa FoxP3 PB (eBioscience) 30 minuta u mraku na 4° C. Zatim su dodavana antitela za humani ili mišji T-bet-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz miša), humani ili mišji GATA-3- eFluor®660 (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova) ili humani ili mišji RORγT-PE (izotipska kontrola IgG2a iz pacova) (svi iz eBioscience), dok su PMĆ bojene samo antitelom za mišji RORγT-PE. Nakon 1h inkubacije u mraku na 4° C, višak nevezanih antitela uklanja se rastvorom FoxP3 PB (eBioscience), uz centrifugiranje na 800g, 3 minuta. Talog ćelija finalno je resuspendovan u FCBS (eBioscience) i analiziran na protočnom citofluorimetru.

3.4.9. Priprema uzoraka i izolovanje RNK

Nakon što je dobijena ćelijska suspenzija *ex vivo* ćelija, one su prebacivane u male konusne epruvete i centrifugirane na 2000g, 3 minuta. Na talog ćelija dodavano je 500 μl reagensa za liziranje (mi-Total RNA Isolation Kit, Metabion, Nemačka), lagano mućkano i ostavljano na 4° C tokom 10 minuta, nakon čega je dodavano 100 μl hloroforma po uzorku. Nakon centrifugiranja na 12000g u trajanju od 20 minuta na 4° C u malim konusnim epruvetama su se jasno izdvojila tri sloja: gornja vodena faza u kojoj se nalazila ribonukleinska kiselina (RNK), intermedijarna faza sa DNK, i donja fenolna faza u kojoj su proteini i lipidi. Vodena faza prebacivana je u nove male konusne epruvete u cilju izolovanja RNK, a fenolna faza je korišćena za izolovanje proteina. RNK je taložena dodavanjem 350 μl izopropanola i držanjem 10 minuta na -20° C. Uzorci su centrifugirani na 12000g, 20 minuta na 4° C, a na talog RNK je dodavan

hladni 70% etanol, 2 puta, uz međukorak taloženja centrifugiranjem uzoraka na 12000 g, 10 minuta na 4° C. Po završetku ispiranja, etanol je uklanjan pipetiranjem, a talog RNK je sušen 5 do 15 minuta (dok ne ispari sav etanol) i potom rastvaran u 20 µl DEPC (eng. *Diethylpyrocarbonate*) vode (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Koncentracija izolovane RNK u uzorcima određivana je merenjem apsorbancije na 260 i 280 nm poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu (odnos A260nm / A280nm između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu korišćen je spektrofotometar (GeneQuant pro, Ameršam, SAD).

3.4.10. Reakcija reverzne transkripcije

Nakon izolovanja i merenja, RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevođena u komplementarnu DNK (cDNK). cDNK predstavlja lanac DNK sintetisan na osnovu lanca iRNK u reakciji koju katalizuje enzim reverzna transkriptaza. U 10 µl izolovane RNK (1.5 µg RNK) dodavano je 1 µl rastvora nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas) i 1 µl rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas). Kao kontrola za eventualnu kontaminaciju služila je destilovana voda kojoj su dodavani nasumični prajmeri i dNTP označena kao negativna kontrola. Uzorci su inkubirani na 70° C u trajanju od 5 minuta, da bi se nasumični prajmeri vezali za RNK, nakon čega je reakcija prekidana prebacivanjem uzoraka na led. Potom je u uzorke dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (Fermentas), po 1 µl enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas) i po 0,5µl inhibitora RNaze (Fermentas). Uzorci su inkubirani na 25° C 15 minuta, a potom na 42° C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze u trajanju od 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70° C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivisanja enzima reverzne transkriptaze, 10 minuta i 95° C, u cilju razvdavanja sintetisanih lanaca cDNK, 3 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na -20° C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

3.4.11. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu („Real-time“ PCR) je metoda koja pored umnožavanja proizvoda omogućava njegovu kvantifikaciju i koristi se za analizu relativne ekspresije gena. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96

bunarića adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmpTM Optical, Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija) i u svaki bunarić dodavano je po 5 µl reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim AmpliTaq Gold koji je DNK polimeraza i dNTP (Applied Biosystems) i po 1 µl specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gen *β-aktin*. Korišćeni parovi prajmera dati su u Tabeli 2. Potom je u svaki bunarić dodavano po 3 µl odgovarajućeg uzorka cDNK. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Ploča je pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), centrifugirana 2 minuta na 1000g i preneti u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95° C u cilju denaturacije lanaca, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95° C, za početnu denaturaciju lanaca i 1 minut na 60° C, za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju postepeno se snižava temperatura termobloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescencije, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbeđuje proveru nastalog proizvoda, i pokazuje da li je eventualno nastao dimer prajmera ili kontaminacija genomskom DNK. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući softverski program (7000 System software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za *β-aktin* detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i *β-aktina*.

Tabela 2. Parovi prajmera korišćeni u eksperimentima.

Gen	Parovi prajmera	Pristupni broj u bazi podataka
<i>β-aktin</i>	5'-CCAGCGCAGCGATATCG-3' 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3'	NM_007393.3
<i>Ifn-γ</i>	5'-CATCAGCAACAACATAAGCGTCA-3' 5'-CTCCTTTTCCGCTTCCTGA-3'	NM_008337.3
<i>Il-17</i>	5'-GGGAGAGCTTCATCTGT-3' 5'-GACCCTGAAAGTGAAGGG-3'	NM_010552.3
<i>Il-4</i>	5'-ATCCTGCTCTTCTTTCTCG-3' 5'-GATGCTCTTTAGGCTTTCC-3'	NM_021283.2
<i>Il-10</i>	5'-TGTGAAAATAAGAGCAAGGCAGTG-3' 5'-CATTCATGGCCTTG TAGACACC-3'	NM_010548.2
<i>Rory2</i>	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3' 5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'	NM_011281.1

3.4.12. Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Fenolna faza PMČ dobijena pri izolovanju RNK prebacivana je u nove konusne epruvete, a proteini su precipitirani dodavanjem acetona u odnosu 1:3, inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirani 10 minuta na 12000g na 4° C. Talog proteina resuspendovan je u 1 ml 0,3 M guanidin hidrohlorida rastvorenog u 95% etanolu i 2,5% glicerolu i sonifikovan 2 puta po 10 sekundi (Sonics & Materials, Inc., Njutaun, SAD), inkubiran 10 minuta na sobnoj temperturi i potom centrifugiran na 8000g, 5 minuta, 4° C. Zatim je uzorcima sipan isti rastvor 2 puta uz centrifugiranje na 8000g, 5 minuta, 4° C. Nakon toga, talog je rastvoren u 1 ml 95% etanola sa 2,5% glicerola, inkubiran u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiran na

8000g tokom 5 minuta na 4° C. Potom je odlivan etanol, a talog proteina sušen 5 do 15 minuta, dok nije ispario sav etanol i finalno rastvaran u 100 µl pufera za liziranje ćelija (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 na 25° C, 2% SDS, 10% glicerola i 50 mM DTT u destilovanoj vodi). Potom je određivana koncentracija proteina i uzorci su čuvani na -20° C do dalje upotrebe.

Nakon tretmana izolovanih pankreasnih ostrvaca, uzorci su lizirani puferom za liziranje ćelija, u koji su neposredno pred upotrebu dodati inhibitori proteaza (10 µg/ml aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF). Zatim su uzorci centrifugirani 20 minuta na 20000g na 4° C, a supernatanti sa rastvorenim proteinima su prebacivani u nove male konusne epruvete dok je talog sa ćelijskim ostatkom i DNK odbacivan. Potom je određivana koncentracija proteina i uzorci su čuvani na -20° C do dalje upotrebe.

Koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija merena je metodom po Loriju (Lowry i sar, 1951). Uzimano je 20 µl uzoraka razblaživanim 10 puta u destilovanoj vodi i mešano sa 300 µl rastvora 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH, 1% CuSO₄ x 5 H₂O i 2% K-Na-tartarat u H₂O, pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 µl Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 minuta, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Apsorbancija uzoraka merena je na 670 nm automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija proteina određena je na osnovu standardne krive rastvora BSA (0,1-1 mg/ml) u destilovanoj vodi.

3.4.13. Imunoblot analiza za određivanje količine proteina

Uzorci (30 µg proteina) su mešani u odnosu 3:1 sa standardnim puferom za nalivanje na gel za elektroforezu (1 M Tris-HCl pH 6,8, 20% SDS, 0,2 M β-merkaptoetanol, 0,004% bromfenol plavo, 20% glicerol) i razdvajani elektroforezom na 12% SDS-poliakrilamidnom gelu. Po završenoj elektroforezi sledio je transfer na polivinil difluoridnu membranu korišćenjem polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka) na 5 mA/cm². Membrana je blokirana korišćenjem 5% BSA u PBS sa 0,1% Tween-20, kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, 1h na sobnoj temperaturi. Zatim je membrana inkubirana preko noći na 4° C sa antitelima

specifičnim za mišji citohrom c (Invitrogen, Kamarilo, SAD) proizvedenim u mišu, GATA3 i T-bet (e Bioscience, SAD) proizvedenim u pacovu, i p-NFκB i NFκB (Abcam, Kembridž, Velika Britanija), JNK, p-JNK, p-p38 i p38 (Cell Signaling Technology, Boston, SAD), ERK, p-ERK, p-STAT1, p-STAT4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Kruz, SAD) i tubulin (Abcam, Kembridž, Velika Britanija) koja su sva proizvedena u kuniću. Potom je usledila inkubacija sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa HRP (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija) koja pokazuje specifičnost za mišji ili kunićev IgG. Vezana antitela detektovana su hemiluminescencijom (ECL, GE Healthcare). Količina proteina merena je denzitometrijski upotrebom programa Scion Image (2000-2001 Scion Corporation) i preračunata u odnosu na količinu tubulina, što je izraženo grafički na slikama.

3.4.14. Fluorometrijski test za detekciju aktivnosti kaspaze-3

Aktivnost kaspaze-3 određena je fluorometrijskim testom (Biotium, Hajvard, SAD) prema uputstvima obezbeđenim od strane proizvođača. Nakon tretmana, pankreasna ostrvca prebacivana su u male konusne epruvete i centrifugirana na 500g, 3 minuta. Talog ostrvaca resuspendovan je u puferu za rastvaranje (Assay Buffer) i ostrvca su lizirana 10 minuta na ledu. Nakon liziranja, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 12000g. Talog sa delovima ćelijskih membrana i jedrima, je odacivan, a supernatanti prebacivani u ploču za merenje fluorescencije. Njima je dodavan supstrat za kaspazu-3 (1 mM, (Ac-DEVD)₂-R110, Biotium, Hajvard, SAD) i pufer za rastvaranje (Biotium) i inkubirani su 45 minuta na 37° C. Potom je vrednost fluorescencije očitavana korišćenjem ekscitacionog filtera na 485 nm i emisionog filtera na 535 nm pomoću Chameleon fluorimetar (Hidex, Oj, Turku, Finska). Dobijena vrednost fluorescencije proporcionalna je aktivnosti kaspaze-3.

3.4.15. Priprema histoloških preparata u parafinu

Pankreas je uklanjan iz životinja i stavljan u 10% rastvor formalina i nakon nedelju dana rađeno je kalupljenje u parafin. Najpre je tkivo dehidratirano držanjem u etanolu rastućih koncentracija (70–100%), onda je stavljano u rastvor 100% etanol-ksilol (u razmeri 1:1), pa u ksilol, 2 puta po 3 minuta, i zatim prebacivano u otopljeni parafin. Tkivo je držano u termostatu 2h, a zatim prebacivano u nov parafin u kome je

držano tokom noći, takođe u termostatu. Nakon toga tkivo je prebacivano u kalupe u kojima se nalazio finalni parafin pri čemu su dobijeni trajni preparati koji su čuvani na sobnoj temperaturi do trenutka sečenja na mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka). Isečci tkivnih preparata debljine 5 µm stavljeni su na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, Braunšvajg, Nemačka) i čuvani na sobnoj temperaturi do bojenja.

3.4.16. Imunohistohemijsko bojenje

Parafinski preparati su deparafinirani držanjem u ksilolu 2 puta po 2 minuta, a zatim hidratirani u etanolima od 100 do 70% i na kraju u destilovanoj vodi. U cilju demaskiranja antigena, tkiva su kuvana 10 minuta u 0,01 M puferu natrijum citrata u mikrotalasnoj pećnici. Endogena peroksidaza blokirana je rastvorom 3% H₂O₂ u metanolu 2 minuta na sobnoj temperaturi. Dalje je inkubirano sa antitelom za nitrotirozin (1:500, rastvoreno u PBS sa 1% BSA) proizvedenim u kuniću 1h na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Detekcija je rađena indirektnom imunoperoksidaznom metodom pomoću komercijalnog seta za antitela kunića (Rabbit ExtrAvidin peroxidase staining kit, Sigma). Preseci su inkubirani 30 minuta sa sekundarnim antitelom kunića obeleženim biotinom i avidinom konjugovanim sa HRP. Između svih opisanih koraka pločice su prane sa PBS 3 puta po 5 minuta kako bi se uklonio višak nevezanog antitela. Nakon toga na preseke je nanošen supstrat za peroksidazu, rastvor DAB. Razvijanje boje praćeno je pod mikroskopom 5 do 15 minuta. Po postizanju braon boje reakcija je prekidana nanošenjem rastvora PBS. Potom je rađeno kontrastno bojenje Majerovim hematoksilinom 3 minuta. Pokrovne pločice lepljene su gelom (DakoCytomation, Kalifornija, SAD), a preparati analizirani na svetlosnom mikroskopu. Prisustvo infiltriranih mononukleusnih ćelija analizirano je pri uveličanju preseka x 40. Na osnovu prisustva insulitisa, pankreasna ostrvca raspoređena su u sledeće kategorije: zdrava ostrvca – nisu bili prisutni infiltrati mononukleusnih ćelija, peri-insulitits – prisutni su infiltrati ćelija oko ostrvaca, ali je očuvana arhitektura ostrvaca, i insulitits – intenzivna infiltracija ćelija u ostrvca, uz gubitak arhitekture ostrvaca. Reprezentativni preseci fotografisani su korišćenjem Leica fotomikroskopa (Leica Microsystems GmbH) pri x 400 uveličanju.

3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati *in vitro* eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD) triplikata kultura jednog reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri izvedena ili SV + SD više nezavisnih eksperimenata. *In vivo* i *ex vivo* eksperimenti izvedeni su tri puta, grupe su imale n=8 životinja, a prikazane su SV \pm SD iz jednog reprezentativnog eksperimenta. Statistička značajnost određivana je analizom varijansi (ANOVA), nakon čega je rađen Student-Newman-Keuls-ov test za višestruka poređenja ili Student-ov *t*-test. Vrednost parametra $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Korišćen je paket Statistika 6.0 (StatSoft, INC, Tulsa, SAD).

4. Rezultati

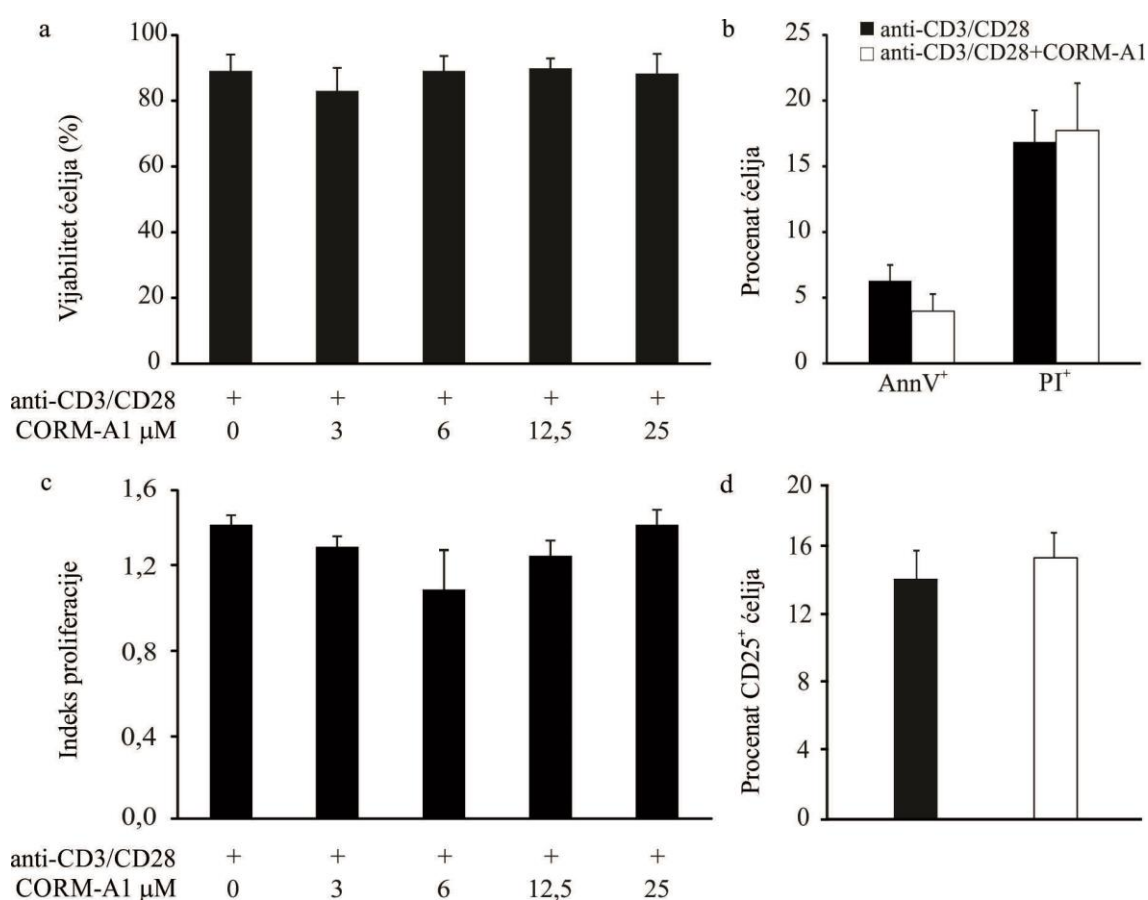
4.1. Uticaj CORM-A1 na imunske ćelije u *in vitro* uslovima

Brojne studije ukazuju da CO primenjen *in vitro* i *in vivo* poseduje anti-apoptotske, anti-oksidativne, anti-ishemične, citoprotektivne i anti-inflamatorne karakteristike (Ryter i sar, 2006). Smatra se da je DT1 bolest prevashodno posredovana T limfocitima (Haskins i Cooke, 2011), te je najpre ispitana uloga donora CO, CORM-A1, u modulaciji proliferacije, aktivacije i diferencijacije limfocita izolovanih iz miševa soja C57BL/6 u *in vitro* uslovima.

4.1.1. Uticaj CORM-A1 na proliferaciju i aktivaciju ćelija limfnog čvora

Prvi korak istraživanja bio je ispitivanje efekta CORM-A1 na ćelije imunskog sistema. Praćeno je preživljavanje, proliferacija i aktivacija ćelija cervikalnog limfnog čvora (ĆLČ) izolovanih iz C57BL/6 soja miševa i stimulisanih anti-CD3/anti-CD28 antitelima. Anti-CD3/anti-CD28 antitela vezuju se za ko-stimulatorne receptore na T ćelijama i obezbeđuju signal koji je, pored prepoznavanja specifičnog antigena od strane T ćelijskog receptora, neophodan za aktivaciju T limfocita (Alegre ML i sar; 2001). Rezultati bojenja tripan plavim, bojom koja prodire u mrtve ćelije, pokazali su da ni jedna primenjena doza (3-25 μM) CORM-A1 u prisustvu anti-CD3/anti-CD28 antitela ne ispoljava toksičnost na ĆLČ (slika 3a). Dobijeni rezultat potvrđen je analizom ĆLČ na protočnom citofluorimetru, pomoću koga je dvostrukim bojenjem ćelija fluorescentno obeleženim aneksinom V i propidijum jodidom analizirano prisustvo apoptoze i nekroze. Tretman CORM-A1 u najvećoj ispitivanoj dozi (25 μM) nije izazivao apoptozu ĆLČ, izraženu kao procenat aneksin V⁺ ćelija, niti nekrozu ovih ćelija, predstavljenu kao procenat propidijum jodid⁺ ćelija (slika 3b). Uticaj CORM-A1 na proliferaciju ĆLČ ispitan je MTT testom. Rezultati MTT testa, izraženi kao odnos ćelija stimulisanih anti-CD3/anti-CD28 antitelima i nestimulisanih ćelija, pokazali su da CORM-A1 ni u jednoj primenjenoj dozi ne utiče na proliferativni indeks ĆLČ stimulisanih anti-CD3/anti-CD28 antitelima (slika 3c). Osim toga, ispitan je i efekat CORM-A1 na aktivaciju ĆLČ, te je praćena ekspresija površinskog molekula CD25 na protočnom citofluorimetru. Za razliku od mirujućih T ćelija koje na svojoj površini imaju veoma malo molekula CD25 ili je on u potpunosti odsutan, aktivisane T ćelije

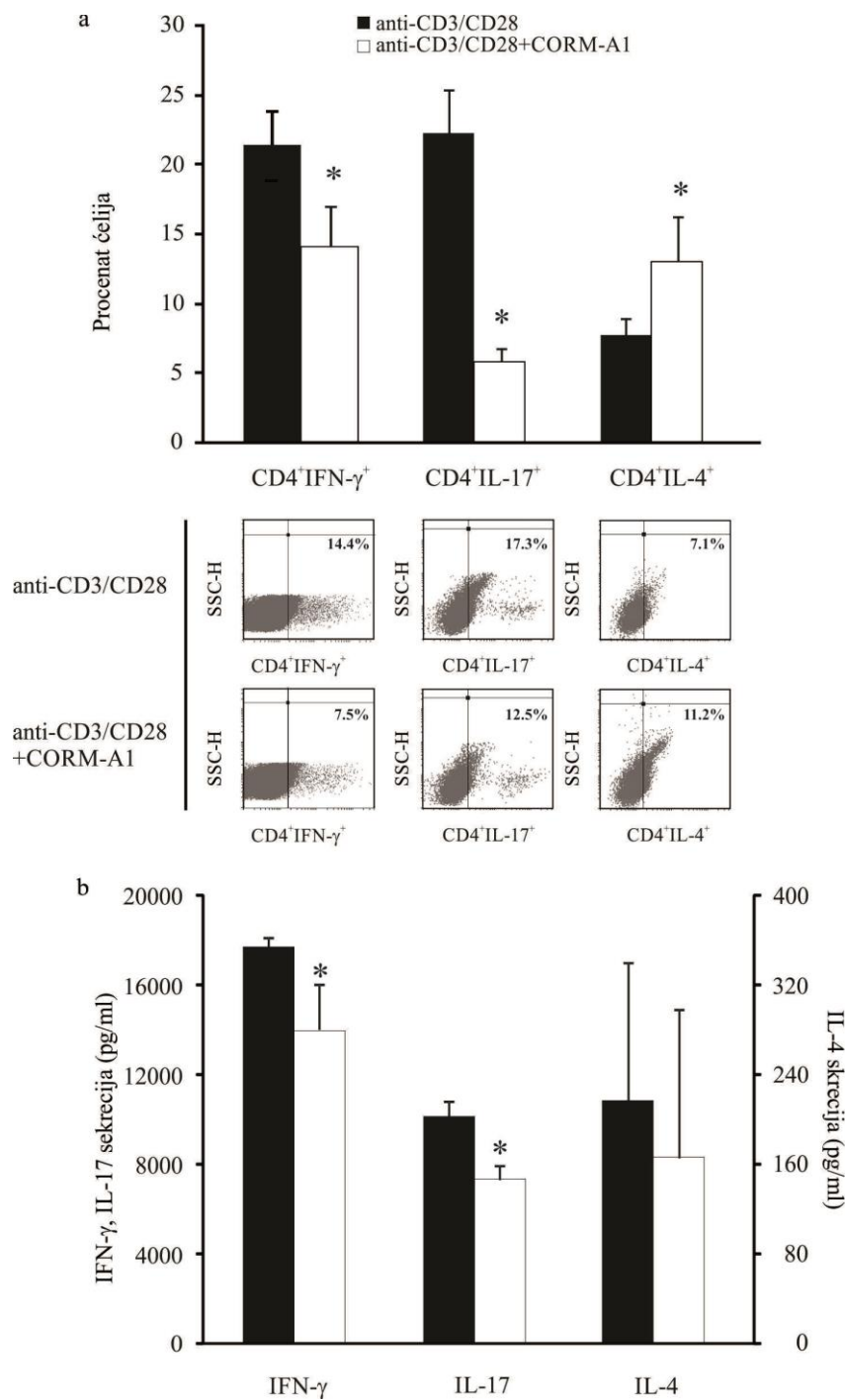
povećavaju ekspresiju ovog markera, receptora visokog afiniteta za plejotropni citokin IL-2, koji je faktor rasta T limfocita i promoviše proliferaciju i preživljavanje T ćelija (Shipkova i Wieland, 2012; Liao i sar, 2013). Rezultati protočne citofluorimetrije pokazali su da *in vitro* stimulacija ČLČ u prisustvu CORM-A1 (25 μ M) nije promenila procenat CD25⁺ ćelija u odnosu ČLČ koje su stimulisane samo anti-CD3/anti-CD28 antitelom (slika 3d). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da CORM-A1 nije toksičan za ČLČ, ne utiče na njihovu proliferaciju niti aktivaciju.



Slika 3. *In vitro* efekat CORM-A1 na ćelije limfnog čvora. ČLČ ćelije izolovane iz C57BL/6 miševa stimulisane su anti-CD3/anti-CD28 antitelima u odsustvu (0) ili prisustvu različitih doza CORM-A1 (3-25 μ M) u trajanju od 24 h. a) Vijabilitet ČLČ ćelija određen tripan plavim. b) AneksinV-FITC/propidijum jodid bojenje ČLČ ćelija. c) Proliferativni indeks ČLČ određen MTT testom. d) Procenat CD25⁺ ČLČ određen protočnom citofluorimetrijom. Prikazane su srednje vrednosti (SV) \pm standardna devijacija (SD) iz tri nezavisna eksperimenata.

4.1.2. Uticaj CORM-A1 na diferencijaciju ćelija limfnog čvora

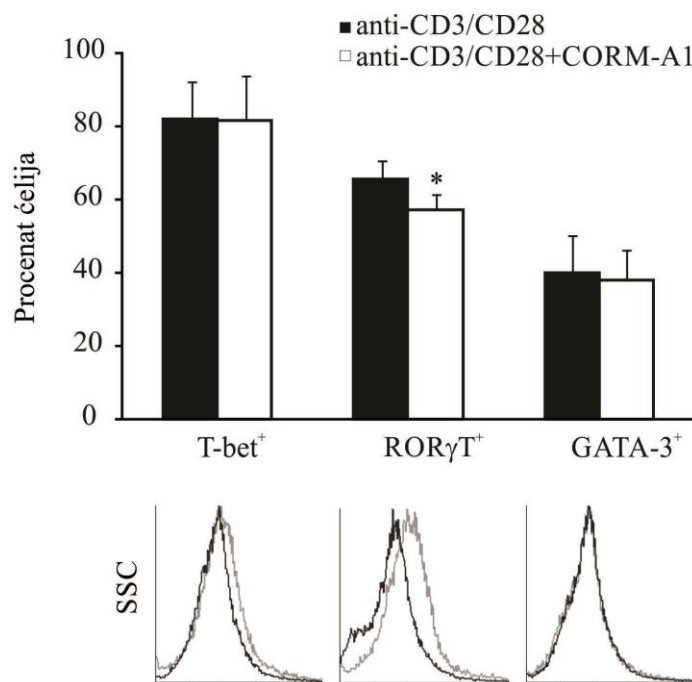
Poznato je da Th ćelije mogu da se diferenciraju u različite subpopulacije (Vahedi i sar, 2013), te je dalje ispitivan uticaj tretmana CORM-A1 na diferencijaciju ĆLĀ. Na protoĀnom citofluorimetru odreĀen je procenat Th1, Th17 i Th2 ćelija nakon tretmana ĆLĀ anti-CD3/anti-CD28 antitelima u prisustvu ili odsustvu CORM-A1. Rezultati su pokazali da je primena CORM-A1 dovela do statistiĀki znaĀajnog smanjenja zastupljenosti pro-inflamatornih Th1 ($CD4^+IFN-\gamma^+$) i Th17 ($CD4^+IL-17^+$) ćelija, dok je istovremeno dovela do znaĀajnog poveĀanja procenta anti-inflamatornih Th2 ($CD4^+IL-4^+$) ćelija u odnosu na ĆLĀ stimulisane samo anti-CD3/anti-CD28 antitelima (slika 4a). Osim ŀto je utvrĀen procenat subpopulacija Th ćelija, ELISA testom merena je i sekrecija citokina karakteristiĀnih za Th1, Th2 i Th17 ćelije. Na slici 4b vidi se da je tretman agensom koji oslobaĀa CO doveo do statistiĀki znaĀajno niŀe sekrecije pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17, tipiĀnih za Th1 i Th17 ćelija, respektivno, dok je produkcija IL-4 citokina Th2 ćelija ostala nepromenjena nakon CORM-A1 tretmana. Ovi rezultati ukazuju da CORM-A1 inhibira pro-inflamatorni Th1/Th17 odgovor i usmerava razvoj ka potencijalno protektivnim Th2 ćelijama u *in vitro* uslovima.



Slika 4. Efekat CORM-A1 na diferencijaciju Th1, Th2 i Th17 ćelija *in vitro*. ČLČ izolovane iz C57BL/6 miševa stimulisane su anti-CD3/anti-CD28 antitelima u odsustvu ili prisustvu CORM-A1 (25 μ M) u trajanju od 24h. a) Procenat CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-17⁺, CD4⁺IL-4⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom. Reprezentativni dot plotovi prikazani su ispod grafika. b) Produkcija IFN- γ , IL-17 i IL-4 citokina merena je ELISA testom iz supernatana dobijenih nakon 24 h inkubacije ČLČ. Prikazane su SV \pm SD iz tri eksperimenata. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije koje su tretirane samo anti-CD3/anti-CD28 antitelima.

4.1.3. Efekat CORM-A1 na ekspresiju transkripcionih faktora T-bet, ROR γ T i GATA-3 kod ćelija limfnog čvora

Sledeći korak bio je da se utvrde unutarćelijski mehanizmi koji se nalaze u osnovi zapaženih efekata CORM-A1 na diferencijaciju ČLČ. Protočnom citofluorimetrijom ispitan je efekat CORM-A1 na ekspresiju transkripcionih faktora uključenih u regulaciju razvića subpopulacija Th ćelija. Rezultati su pokazali da je CORM-A1 tretman ČLČ značajno smanjio ekspresiju ROR γ T transkripcionog faktora, koji diriguje razvoj Th17 ćelija, ali nije uticao na ekspresiju T-bet, regulatora diferencijacije Th1 ćelija, niti GATA-3 transkripcionog faktora, regulatora diferencijacije Th2 ćelija (slika 5). Dobijeni rezultati ukazuju da u *in vitro* uslovima CORM-A1 ima direktan uticaj na razvoj Th17 ćelija inhibicijom transkripcionog faktora ROR γ T.



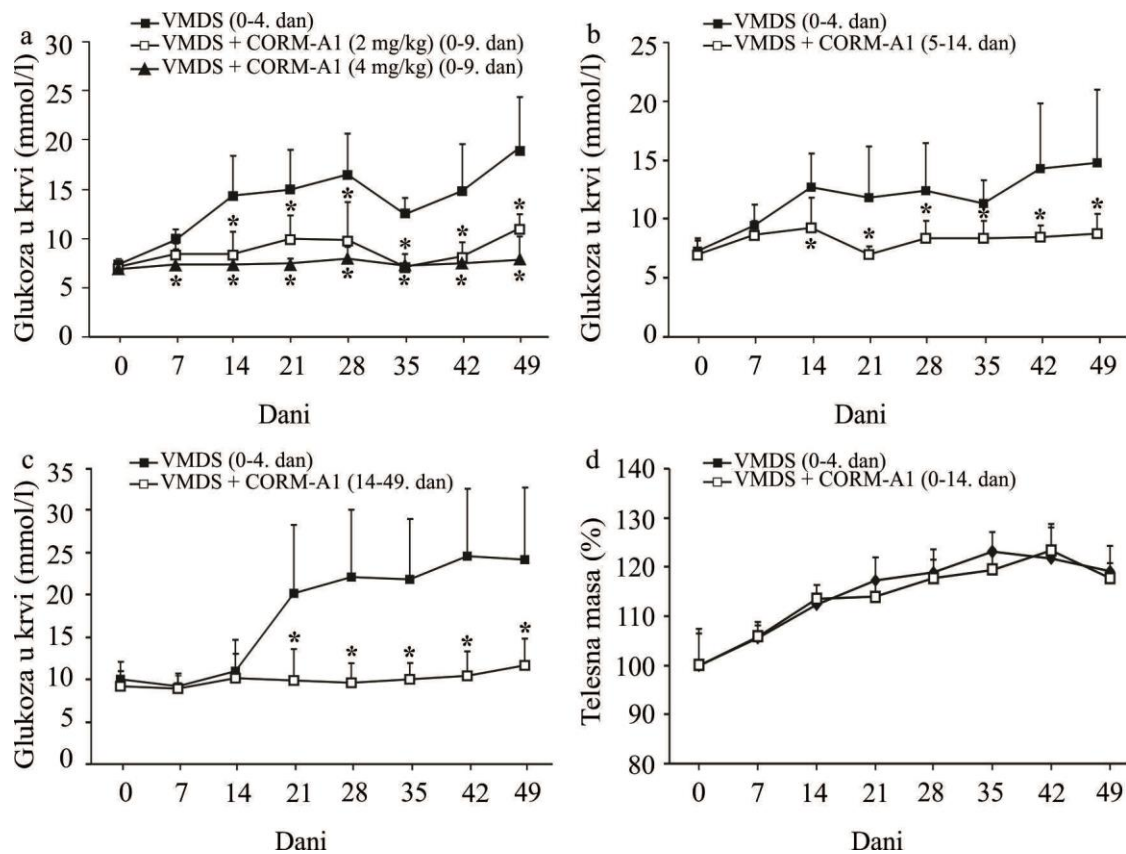
Slika 5. Efekat CORM-A1 tretmana na ekspresiju ROR γ T, T-bet i GATA-3. ČLČ izolovane iz C57BL/6 miševa stimulisane su anti-CD3/anti-CD28 antitelima u prisustvu ili odsustvu CORM-A1 (25 μ M) u trajanju od 24h. Procenat T-bet⁺, ROR γ T⁺ i GATA-3⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom. Reprezentativni histogrami prikazani su ispod odgovarajućeg grafika (siva linija – anti-CD3/anti-CD28; crna linija – anti-CD3/anti-CD28 + CORM-A1). Prikazane su SV \pm SD iz tri nezavisna eksperimenata. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u kojoj ćelije koje su tretirane samo anti-CD3/anti-CD28 antitelima.

4.2. Uticaj CORM-A1 na indukciju i kliničke parametre DT1

U literaturi se DT1 opisuje kao hronična autoimunska bolest koja nastaje usled uništavanja β ćelija pankreasnih ostrvaca posredstvom imunskih ćelija, i to najpre delovanjem T limfocita (Kornete i sar, 2013). Smatra se da su Th1 i Th17 ključne ćelije u patogenezi ove autoimunske bolesti (Haskins i Cooke, 2011), dok Th2 ćelije usporavaju razvoj DT1 (Li i sar, 2014). Kako je u prethodnim eksperimentima pokazano da CORM-A1 *in vitro* ispoljava imunomodulatorno dejstvo, dalja ispitivanja bila su usmerena ka utvrđivanju efekata ovog donora CO na razvoj i kliničke parametre DT1 u eksperimentalnom modelu bolesti kod miševa C57BL/6 soja.

4.2.1. Efekat CORM-A1 na razvoj dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa

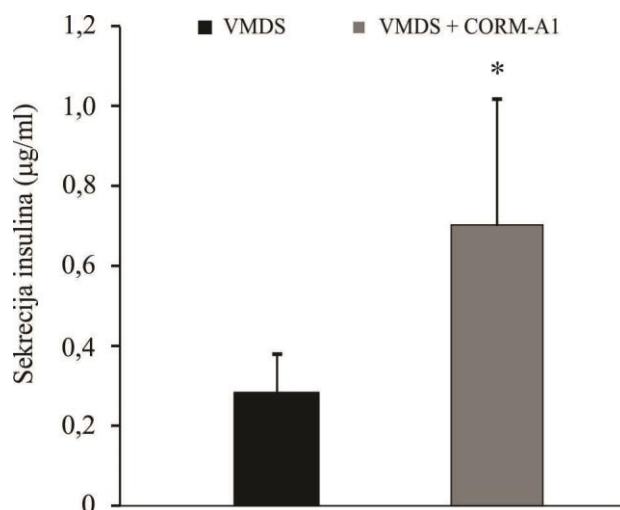
U cilju ispitivanja uticaja CORM-A1 na razvoj DT1, korišćen je eksperimentalni model bolesti indukovano davanjem VMDS kod C57BL/6 miševa. Kod životinja tretiranih VMDS primećeno je postepeno, ali stabilno povećanje koncentracije glukoze u krvi (slike 6a, 6b, 6c). Nasuprot tome, primena CORM-A1 u ranom (slika 6a) i kasnom profilaktičkom (slika 6b), kao i u terapijskom režimu (slika 6c), sprečila je razvoj hiperglikemije indukovane davanjem VMDS. Kako davanje VMDS + CORM-A1 nije menjalo telesne mase miševa u odnosu na grupu miševa tretiranih samo VMDS (slika 6d), može se reći da donor CO nije ispoljio toksična dejstva na eksperimentalne životinje, na šta je ukazivao i opšti izgled i ponašanje tretiranih životinja. Dobijeni rezultati ukazuju na zaštitno svojstvo CORM-A1 u eksperimentalno indukovanom DT1 koje traje i nakon prestanka administracije agensa.



Slika 6. Efekat CORM-A1 na kliničke parametre dijabetesa tipa 1. a) Rani profilaktički tretman CORM-A1 u dozi od 2 mg/kg (□) ili 4 mg/kg (▲) primenjen je 0–9. dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS (■, 40 mg/kg, 0–4. dan). b) Kasni profilaktički tretman CORM-A1 (2 mg/kg) primenjen 5–14. dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS. c) Terapijski tretman CORM-A1 primenjen u dozi od 2 mg/kg i trajao je 14–49. dana. Nivo glukoze u krvi (a, b, c) je meren u naznačenim terminima. d) Porast telesne težine u ranom profilaktičkom tretmanu VMDS + CORM-A1 izražen je u procentima koji predstavljaju promenu mase u odnosu na početnu masu životinja (100%). Rezultati su prikazani kao SV ± SD određivanih parametara iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.2.2. Efekat CORM-A1 na funkcionalnost pankreasnih ostrvaca

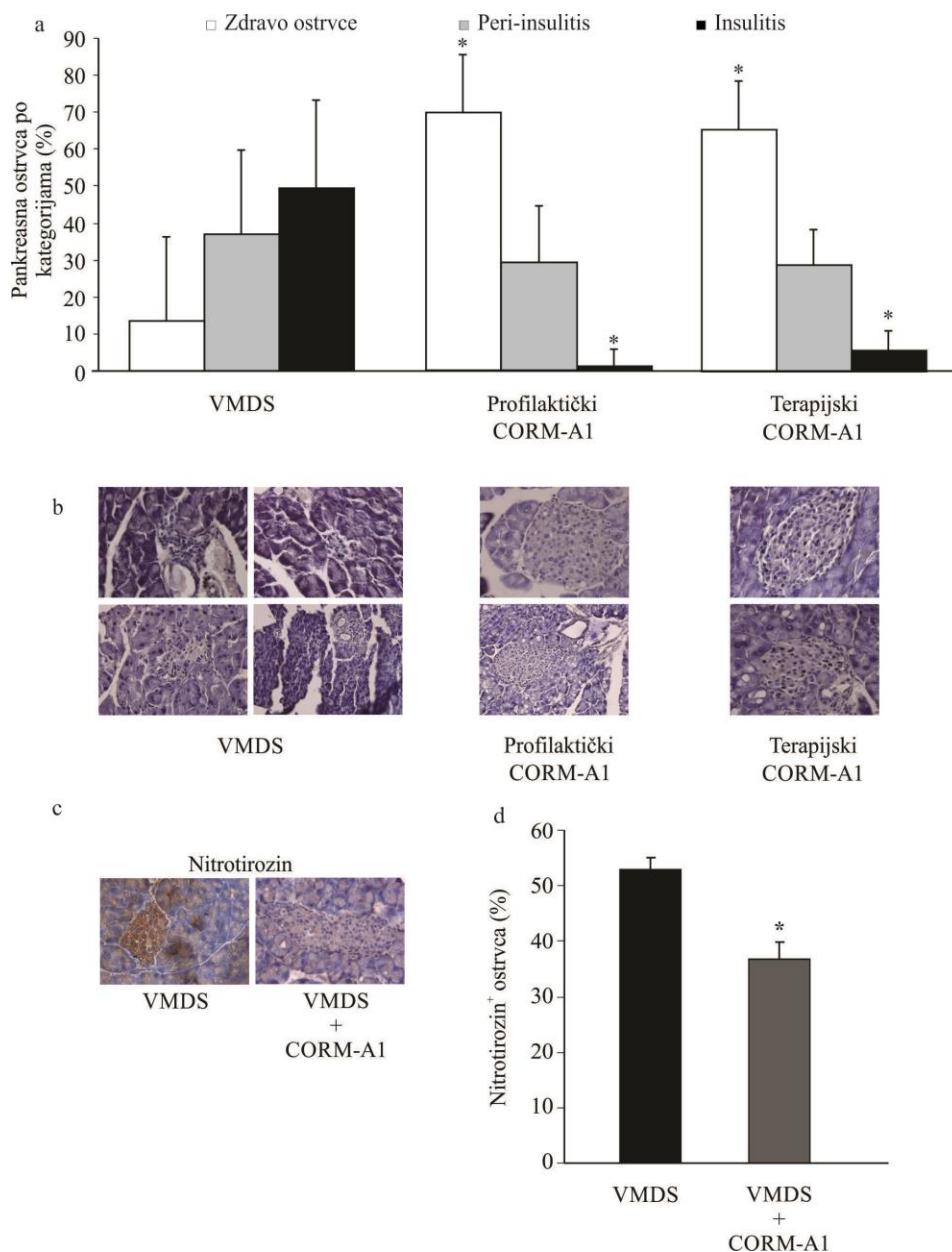
Hiperglikemija u DT1 može nastati zbog smanjenja ili potpunog odsustva sekrecije insulina (Cnop i sar, 2005). Stoga je ispitivan uticaj CORM-A1 na funkcionalnost pankreasnih ostrvaca merenjem koncentracije insulina u serumu eksperimentalnih životinja. Rezultati ELISA testa pokazali su statistički značajno veću sekreciju insulina kod miševa koji su primali VMDS + CORM-A1, u poređenju sa onima koji su primali samo VMDS (slika 7), čime se može objasniti normoglikemično stanje miševa koji su primali CORM-A1.



Slika 7. Uticaj CORM-A1 na sekreciju insulina u serumu. Koncentracija insulina u serumu merena je ELISA testom kod miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 u ranom profilaktičkom režimu. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševе tretirane samo VMDS.

4.2.3. Histološka analiza oštećenja pankreasnih ostrvaca

Da bi se utvrdio efekat CORM-A1 na infiltraciju imunskih ćelija u pankreas, urađena je analiza histoloških preseka pankreasa bojenih hematoksilinom 49. dana nakon indukcije bolesti. U poređenju sa miševima tretiranim VMDS, životinje koje su primale profilaktički ili terapijski tretman CORM-A1 imale su statistički značajno veći procenat zdravih ostrvaca (slika 8a). Njih je odlikovalo odsustvo ili blagi stepen



Slika 8. Efekat CORM-A1 na razvoj insulitisa. a) Prisustvo infiltriranih ćelija detektovano je bojenjem hematoksilinom na parafinskim presecima pankreasa 49. dana od indukcije bolesti. Kvantitativna analiza pankreasnih ostrvaca zahvaćenih insulitismom predstavljena je u vidu % infiltriranih ostrvaca (zdrava ostrvca – nisu bili prisutni infiltrati mononukleusnih ćelija, peri-insulitits – prisutni su infiltrati ćelija oko ostrvaca, ali je očuvana arhitektura ostrvaca, i insulitits – intenzivna infiltracija ćelija u ostrvca, uz gubitak arhitekture ostrvaca). b) Reprerentativni histološki preseki pankreasa 49. dana od indukovanja bolesti. c) Reprerentativne slike pankreasnih ostrvaca bojenih na nitrotirozin kod miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 u ranom profilaktičkom režimu (49. dan) i d) kvantitativna analiza nitrotirozin pozitivnih ostrvaca. Rezultati su prikazani kao procenat od ukupnog broja pankreasnih ostrvaca \pm SD iz reprezentativnog od tri izvedena nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

infiltriranih mononukleusnih ćelija uz očuvanu arhitekturu pankreasnih ostrvaca (slika 8b). Nasuprot tome, miševi VMDS grupe imali su značajno veći procenat ostrvaca koja su imala najteži stepen insulitisa (slika 8a) sa intenzivnom infiltracijom mononukleusnih ćelija, sa atrofijom tkiva i bez pravilnog oblika ostrvaca (slika 8b).

Tokom autoimunskog procesa, imunske ćelije, ali i same β ćelije pankreasa, stvaraju ROS i RNS koje doprinose patološkim procesima i dovode do smrti β ćelija (Lenzen, 2008a). Na histološkim presecima pankreasa ispitivano je prisustvo nitrozilovanog tirozina, koji nastaje kao rezultat delovanja ROS i RNS. Reprezentativni preseki su prikazani na slici 8c, gde se uočava slabiji intezitet bojenja na nitrotirozin kod miševa pod ranim profilaktičkim režimom CORM-A1 u odnosu na eksperimentalne životinje tretirane samo VMDS. Brojanje ostrvaca sa nitrozilovanim proteinima u obe grupe grafički je prikazano na slici 8d, gde je pokazan statistički značajno manji procenat ostrvaca kod miševa koji su primali VMDS + CORM-A1. Dobijeni rezultati sugerišu da je davanje CORM-A1 dovelo do značajnog smanjenja destrukcije pankreasnih ostrvaca u ovom modelu DT1, sprečavanjem infiltracije patogenih imunskih ćelija i inhibicijom produkcije pro-inflamatornih medijatora.

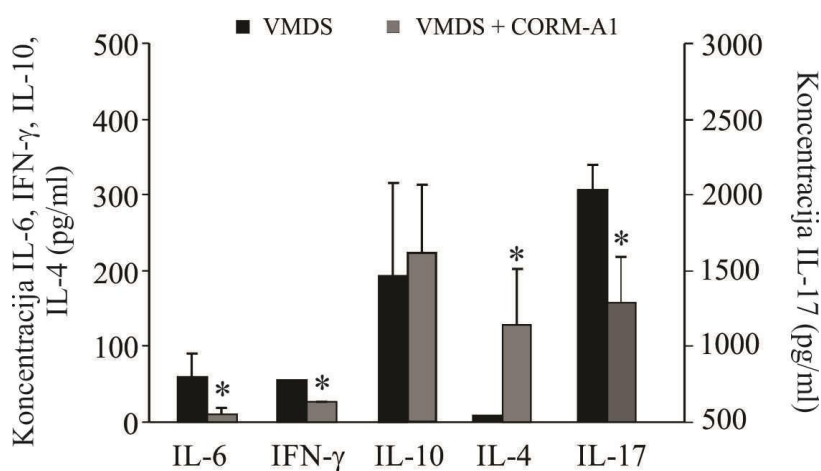
4.3. Ispitivanje ćelijskih mehanizama dejstva CORM-A1

Kako je pokazano da primena CORM-A1 moduliše kliničke parametre DT1 izazvane davanjem VMDS, sledeći eksperimenti imali su za cilj da utvrde ćelijske i molekulske mehanizme koji bi objasnili zapažene efekte ovog donora CO. U tom smislu sprovedene su *ex vivo* analize, 10-og dana nakon indukcije bolesti, kod miševa koji su bili izloženi ranom profilaktičkom tretmanu CORM-A1.

4.3.1. CORM-A1 tretman smanjuje sekreciju IL-6, IFN- γ i IL-17, a povećava sekreciju IL-4 u serumu

Najpre je ispitivano dejstvo CORM-A1 na sistemsku sekreciju pro- i anti-inflamatornih citokina koji učestvuju u razvoju ili sprečavanju bolesti. Rezultati ELISA testa pokazali su da su miševi koji su primali VMDS + CORM-A1 imali značajno

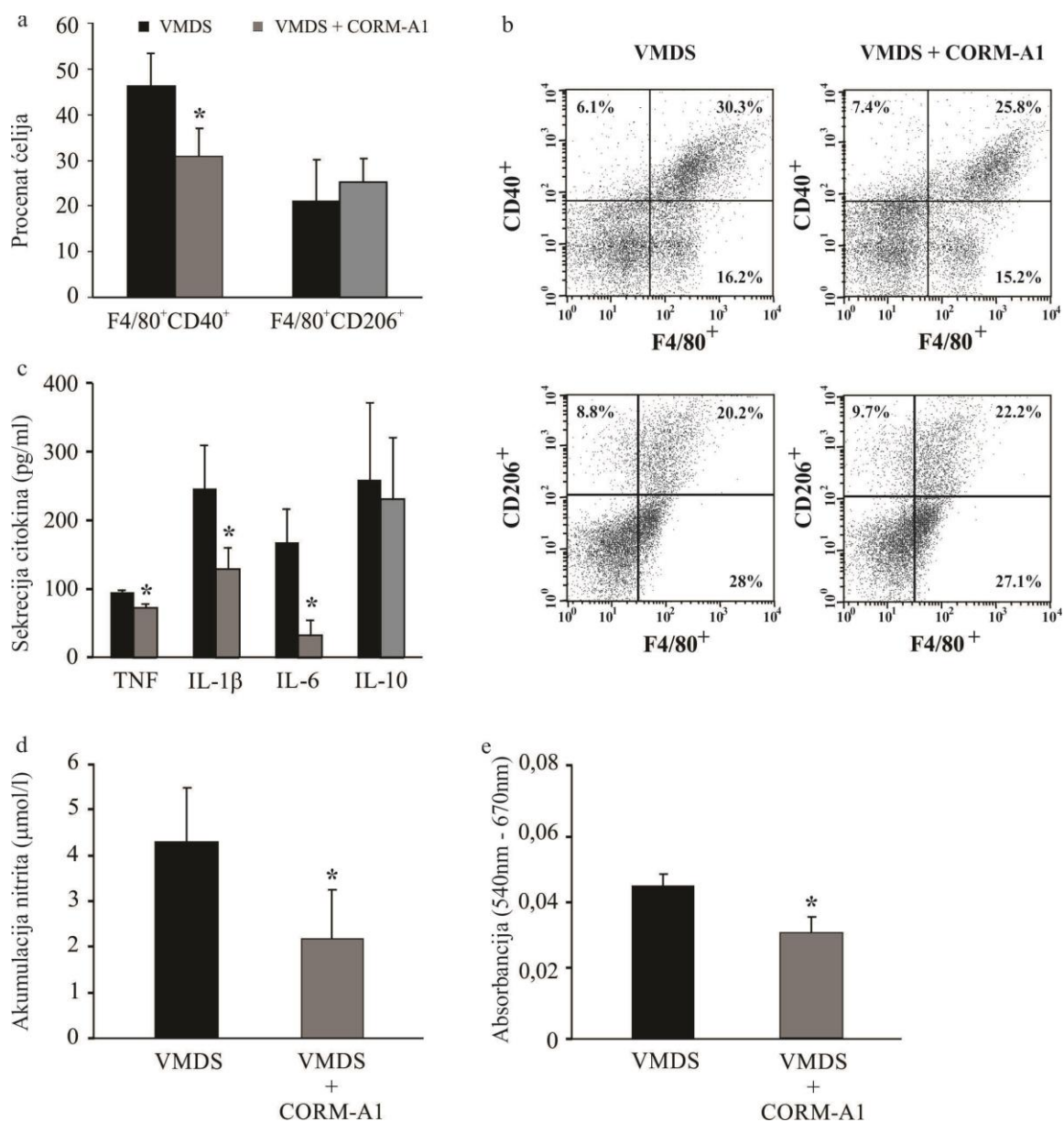
manju sekreciju pro-inflamatornih citokina IL-6, IFN- γ i IL-17 u serumu u odnosu na miševе koji su primali VMDS (slika 9). Istovremeno, primećena je značajno veća produkcija anti-inflamatornog citokina IL-4. Koncentracija anti-inflamatornog citokina IL-10 nije se razlikovala između eksperimentalnih grupa. Ovi rezultati ukazuju da davanje donora CO inhibira sekreciju ispitivanih pro-inflamatornih i povećava lučenje protektivnog anti-inflamatornog citokina u ovom modelu DT1.



Slika 9. Uticaj CORM-A1 na sistemsку produkciju citokina. Koncentracija citokina IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-4 i IL-17 određena je ELISA testom u serumu miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1, žrtvovanih 10-og dana od indukcije bolesti. Rezultati su predstavljeni kao SV \pm SD triplikata uzoraka iz jednog od tri izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševе tretirane samo VMDS.

4.3.2. Ispitivanje dejstva CORM-A1 na fenotip i funkcionalnost ćelija peritoneumske šupljine

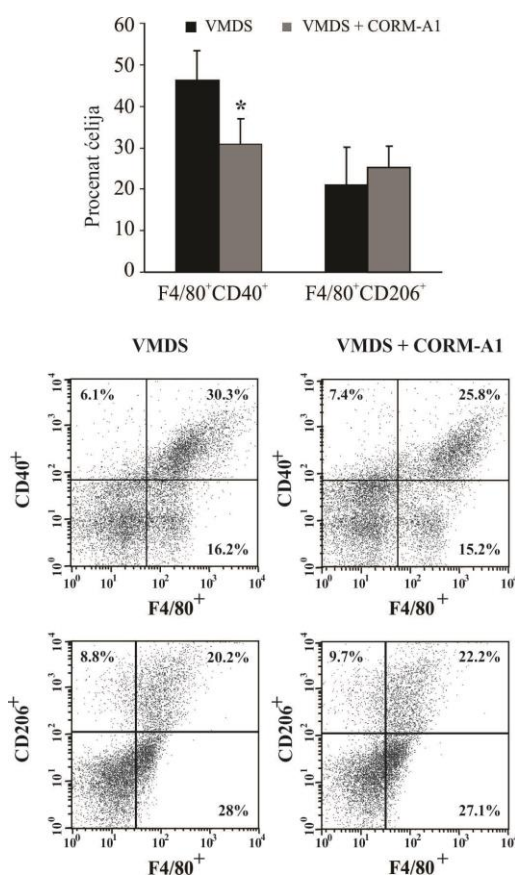
Smatra se da su makrofagi prve ćelije koje infiltriraju pankreas (Kim i Lee, 2009), i da M1 makrofagi doprinose progresiji bolesti, dok se M2 makrofagi smatraju protektivnim u autoimunskom DT1 (Espinoza-Jiménez i sar, 2012). Imajući u vidu imunomodulatorne osobine CORM-A1, ispitan je efekat ovog agensa na fenotip makrofaga u peritoneumskoj šupljini. Izolovane su ćelije peritoneumskog ispirka (PĆ) i analizirano je prisustvo površinskih markera karakterističnih za M1 (F4/80⁺CD40⁺) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) makrofage na protočnom citofluorimetru. Rezultati prikazani na slici 10a i 10b pokazali su da je VMDS + CORM-A1 tretman doveo do statistički značajnog smanjenja procenta M1 ćelija, dok se procenat alternativno aktivisanih M2 makrofaga nije promenio. Osim što prikazuju autoantigene, makrofagi predstavljaju i jedne od glavnih producenata citokina, ROS i RNS, čime doprinose oštećivanju β ćelija u DT1 (Padgett i sar, 2013; Lightfoot i sar, 2012), te je dalje ispitan uticaj CORM-A1 na produkciju ovih medijatora. Rezultati ELISA testa pokazali su da su PĆ izolovane iz miševa koji su primali VMDS + CORM-A1 imale statistički značajno manju produkciju pro-inflamatornih citokina TNF, IL-1β i IL-6 u odnosu na PĆ izolovane iz miševa tretiranih VMDS (slika 10c). Sekretija citokina IL-10 nije se razlikovala između grupa. Dalje je Grisovom metodom određivana akumulacija nitrita u supernatantima kulture izolovanih PĆ, što je indirektan pokazatelj produkcije NO i drugih RNS. PĆ izolovane iz miševa koji su bili izloženi dejstvu VMDS + CORM-A1 odlikovala je značajno manja akumulacija nitrita u odnosu na VMDS grupu (slika 10d). Takođe, miševе koji su primali VMDS + CORM-A1 karakterisala je i statistički značajno manja redukcija NBT, što je pokazatelj produkcije ROS, u odnosu na miševе tretirane VMDS (slika 10e). Ovi rezultati ukazuju da CORM-A1 smanjuje zastupljenost M1 makrofaga i redukuje produkciju pro-inflamatornih medijatora.



Slika 10. Efekat CORM-A1 na fenotip ćelija peritoneumskog ispirka i produkciju pro-inflamatornih medijatora. *Ex vivo* analize PĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. a) Procenat M1 (F4/80⁺CD40⁺) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) makrofaga određen je protočnom citofluorimetrijom PĆ. b) Reprerentativni dot plotovi protočne citofluorimetrije PĆ. U supernatantima ćelija dobijenih nakon 24h inkubacije PĆ merena je c) sekrecija citokina TNF, IL-1 β , IL-6 i IL-10 ELISA testom, d) akumulacija nitrita Grisovom reakcijom i e) oksidativni metabolizam PĆ u reakciji redukcije NBT. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

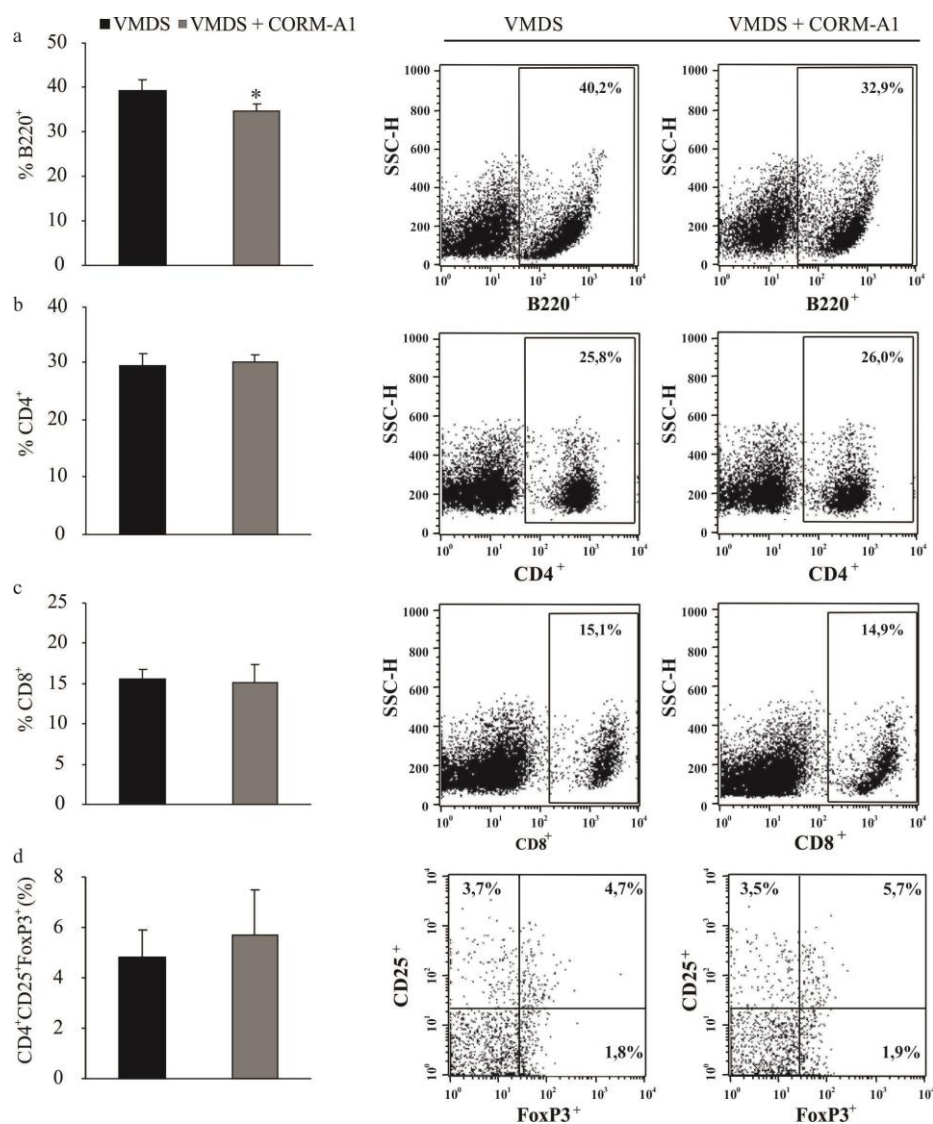
4.3.3. Efekat CORM-A1 na ćelijski fenotip, ekspresiju i sekreciju citokina mononukleusnih ćelija slezine

Kako slezina predstavlja imunski organ u kome može doći do prezentacije autoantigena β ćelija pankreasa i sledstvenog pokretanja autoimunskog odgovora efektorskih ćelija u DT1, ispitan je efekat CO na fenotip mononukleusnih ćelija slezine (SMĆ) miševa nakon tretmana donorom CO. Na protočnom citofluorimetru analiziran je fenotip SMĆ određivanjem prisustva površinskih markera karakterističnih za različite ćelije imunskog sistema. Davanje VMDS + CORM-A1 nije uticalo na procenat M1 makrofaga ($F4/80^+CD40^+$) i M2 makrofaga ($F4/80^+CD206^+$) u odnosu na miševe tretirane VMDS (slika 11).



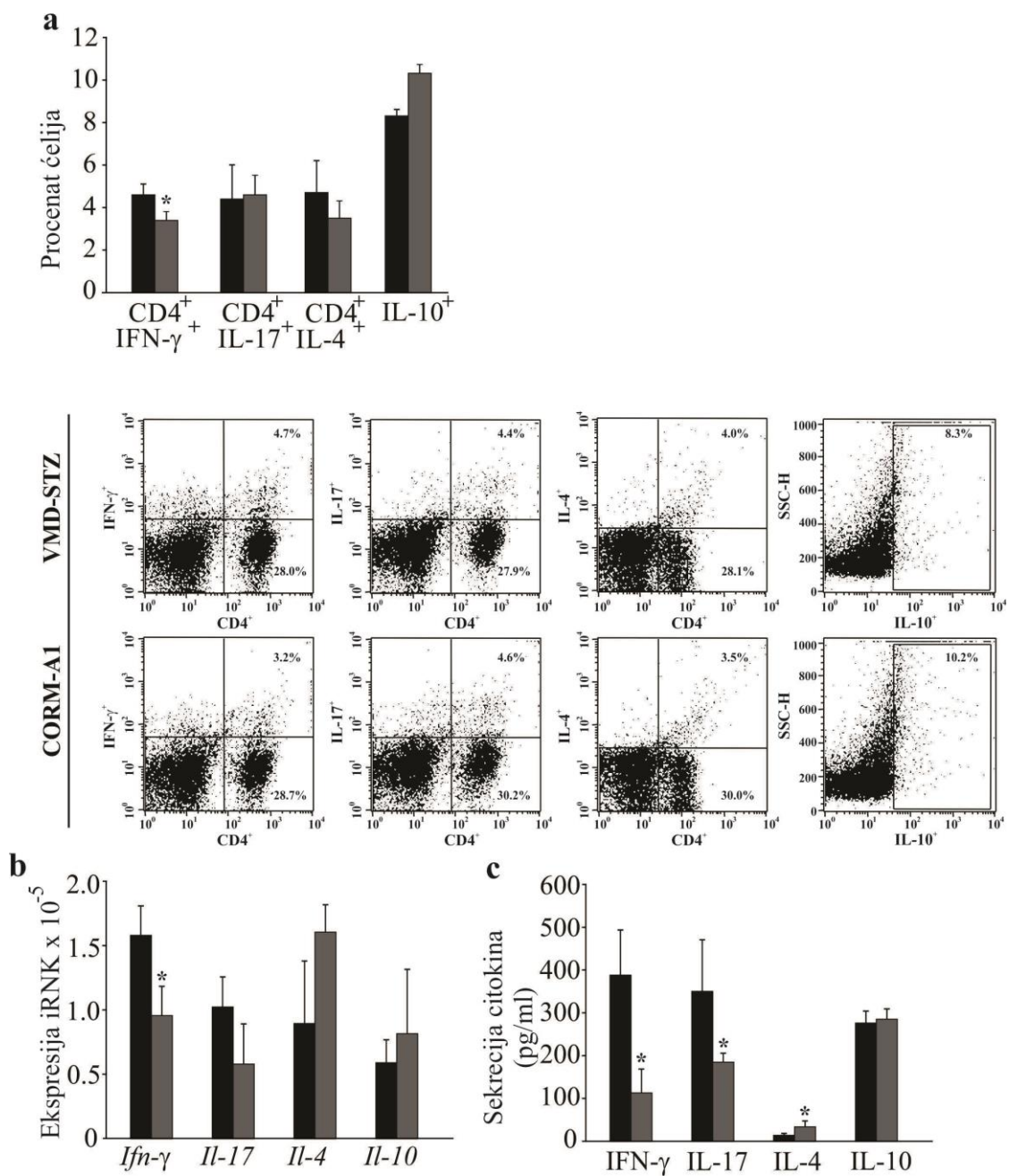
Slika 11. Uticaj CORM-A1 na zastupljenost makrofaga u slezini. a) Procenat $F4/80^+CD40^+$ i $F4/80^+CD206^+$ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom SMĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. Reprezentativni dot plotovi prikazani su ispod grafika. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

Primena VMDS + CORM-A1 dovela je do smanjenja procenta B limfocita (okarakterisanih površinskim markerom B220) u slezini miševa u poređenju sa onima tretiranim VMDS (slika 12a). Međutim, VMDS + CORM-A1 tretman nije uticao na zastupljenost pomoćničkih CD4⁺ (slika 12b), citotoksičnih CD8⁺ (slika 12c) limfocita, kao ni Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) ćelija (slika 12d) u odnosu na VMDS tretirane miševe.



Slika 12. Uticaj CORM-A1 na zastupljenost B, CD4⁺, CD8⁺ i Treg limfocita u slezini. Procentat a) B220⁺, b) CD4⁺, c) CD8⁺ i d) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom SMC⁺ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. Desni panel predstavlja reprezentativne dot plotove. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

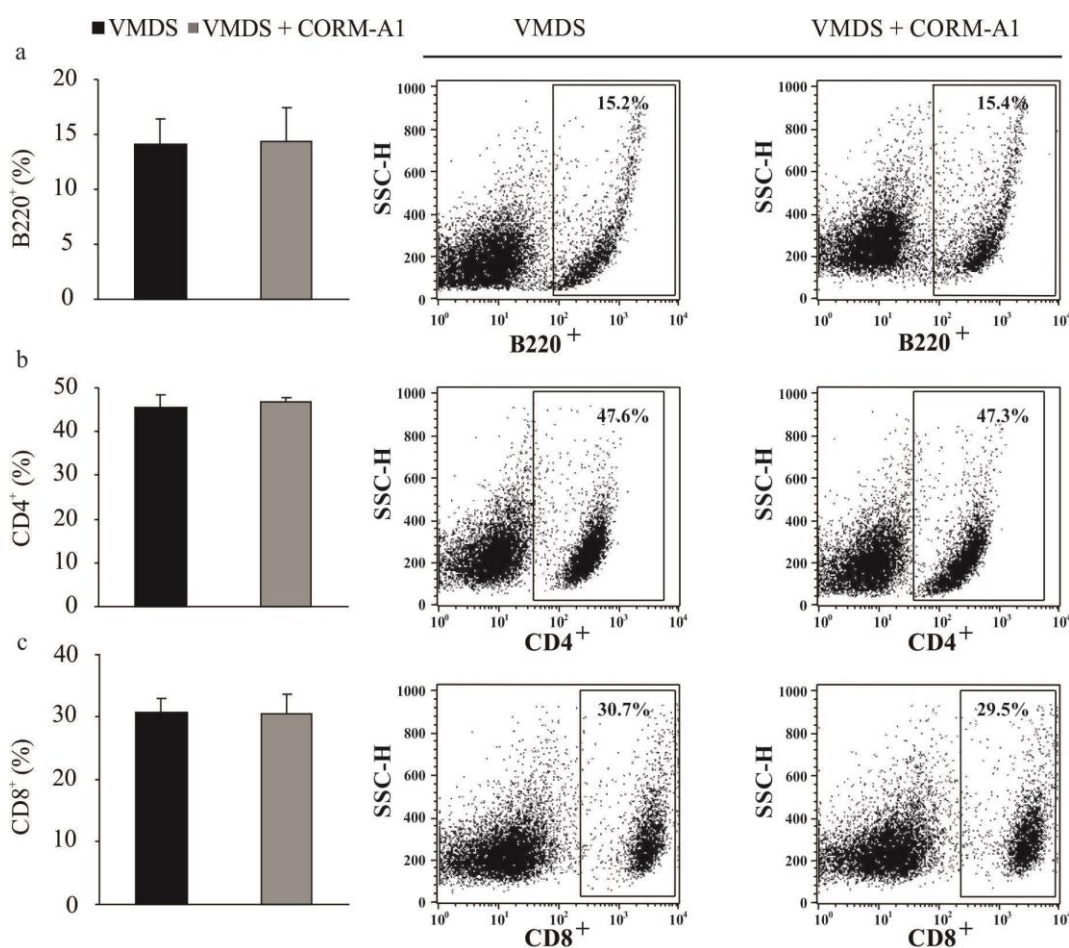
Kako je prethodno pokazano da primena CORM-A1 utiče na diferencijaciju Th ćelija u *in vitro* uslovima, utvrđivano je da li CORM-A1 utiče na diferencijaciju pomoćničkih T limfocita u slezini miševa kojima je DT1 izazvan davanjem VMDS. Davanje VMDS + CORM-A1 dovelo je do statistički značajnog smanjenja procenta CD4⁺IFN- γ ⁺ ćelija, koje predstavljaju Th1 ćelije, u odnosu na SMC⁺ izolovane iz miševa koji su primali samo VMDS, dok procenat Th17 (CD4⁺IL-17⁺), Th2 (CD4⁺IL-4⁺) i ćelija koje proizvode IL-10 nije bio promenjen nakon tretmana VMDS + CORM-A1 (slika 13a). Dalje, merena je i ekspresija gena za reprezentativne citokine Th1, Th17 i Th2 ćelijskih subpopulacija metodom RT-PCR u realnom vremenu. Nivo iRNK za IFN- γ bio je statistički značajno smanjen kod SMC⁺ izolovanih iz VMDS + CORM-A1 tretiranih miševa u odnosu na VMDS grupu (slika 13b). Nivo iRNK za citokine IL-17, IL-4 i IL-10 nije se razlikovao između grupa. Merena je i sekrecija ovih citokina ELISA metodom. Produkcija citokina IFN- γ i IL-17 bila je statistički značajno manja kod SMC⁺ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS + CORM-A1 u odnosu na sekreciju ovih citokina kod miševa tretiranih VMDS (slika 13c). Nasuprot tome, produkcija citokina Th2 ćelija, IL-4, bila je statistički značajno veća, dok se sekrecija citokina IL-10 nije razlikovala između grupa. Ovi rezultati ukazuju da primena donora CO smanjuje Th1 odgovor, kako na nivou unutarćelijske ekspresije citokina IFN γ , tako i na genskom i proteinskom nivou ovog citokina, u slezini miševa u ispitivanom modelu bolesti. Takođe, primena CORM-A1 modulirala je sekreciju citokina IL-4 i IL-17.



Slika 13. Efekat CORM-A1 na diferencijaciju Th ćelija slezine. *Ex vivo* analiza SMĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. a) Procenat CD4⁺IFN-γ⁺, CD4⁺IL-17⁺, CD4⁺IL-4⁺ i IL-10⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom. Reprezentativni dot plotovi prikazani su ispod grafika. b) Nivo iRNK za IFN-γ, IL-17, IL-4 i IL-10 određen je RT-PCR metodom u realnom vremenu i normalizovan u odnosu na β-aktin. c) Sekrecija citokina IFN-γ, IL-17, IL-4 i IL-10 merena je ELISA metodom iz supernatanata ćelija dobijenih nakon 48h inkubacije SMĆ. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.3.4. Uticaj CORM-A1 na ćelijski fenotip, ekspresiju i sekreciju citokina u pankreasnom drenirajućem limfnom čvoru

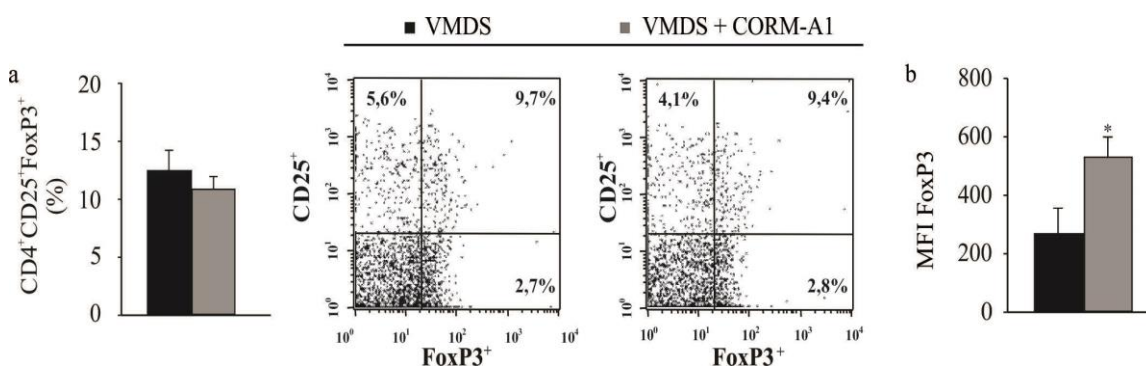
Pošto su drenirajući limfni čvorovi osnovni organi u kojima dolazi do prezentacije autoantigena, dalje je ispitivana zastupljenost pomoćničkih i citotoksičnih T i B limfocita u pankreasnim drenirajućim limfnim čvorovima (PDLČ) nakon tretmana VMDS + CORM-A1. Rezultati protočne citofluorimetrije pokazali su da aplikacija VMDS + CORM-A1 nije ispoljila efekat na distribuciju B ($B220^+$) (slika 14a), pomoćničkih $CD4^+$ (slika 14b) i citotoksičnih $CD8^+$ (slika 14c) limfocita u PDLČ.



Slika 14. Uticaj CORM-A1 tretmana na fenotip ćelija pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova.

Procenat a) $B220^+$ b) $CD4^+$ i c) $CD8^+$ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom ćelija PDLČ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ± CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. Desni panel predstavlja reprezentativne dot plotove. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

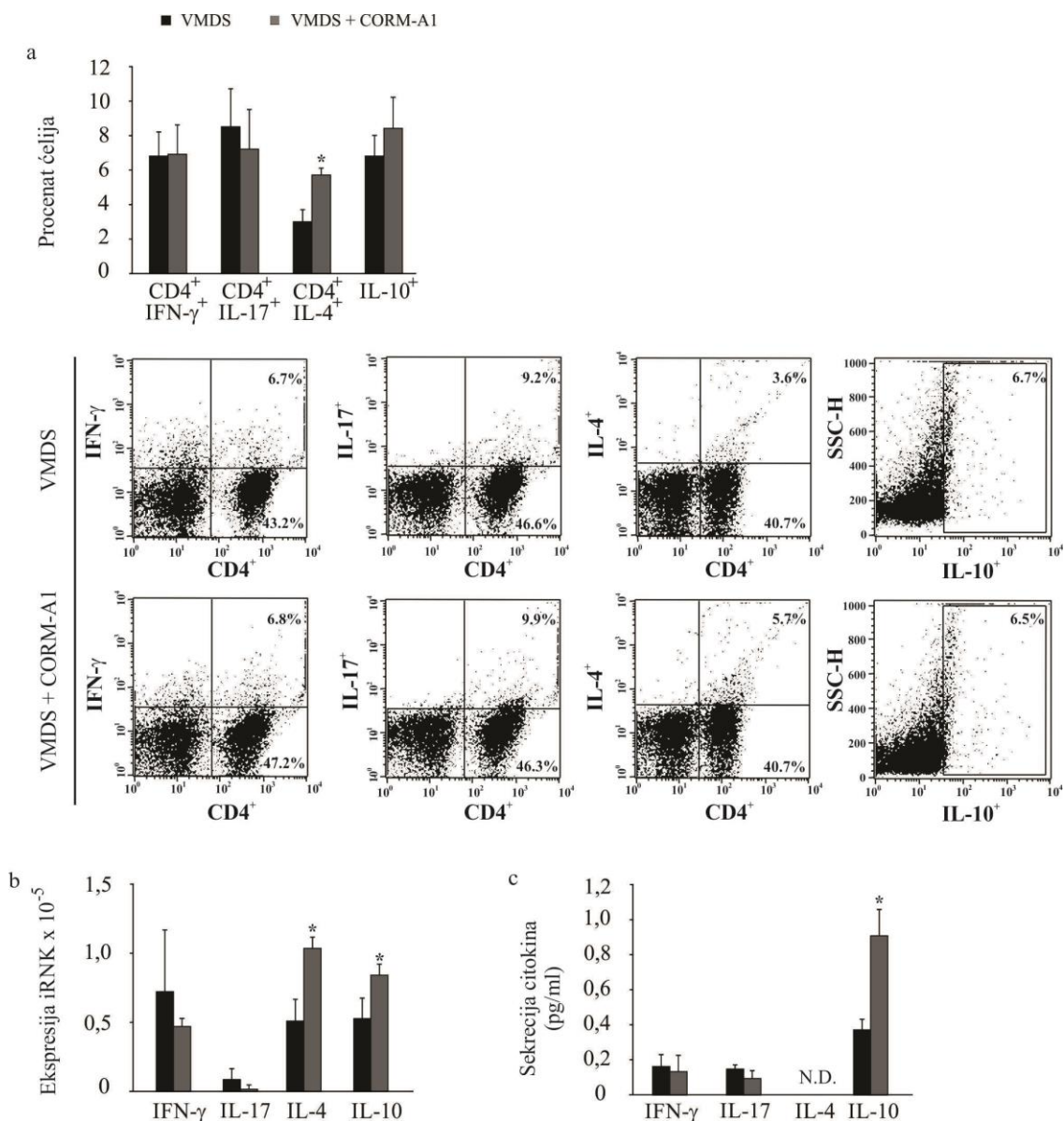
Takođe, CORM-A1 tretman nije uticao ni na zastupljenost Treg ćelija u PDLČ (slika 15a). Međutim, rezultati protočne citofluorimetrije pokazali su da su Treg ćelije miševa koji su primali VMDS + CORM-A1 imale statistički značajno veći broj molekula FoxP3 po ćeliji u odnosu na broj molekula ovog transkripcionog faktora unutar ćelija životinja tretiranih VMDS (slika 15b) sudeći po izmerenom srednjem intenzitetu fluorescencije (MFI, engl. *Mean Fluorescence Intensity*).



Slika 15. Uticaj CORM-A1 na Treg ćelije pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova. a) Procenat CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom PDLČ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. Reprezentativni dot plotovi predstavljani su desno. b) Srednji intenzitet fluorescencije (MFI engl *Mean Fluorescence Intensity*) za transkripcioni faktor FoxP3. Rezultati su predstavljani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisna izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

Nakon analize ćelijskog fenotipa, ispitivan je i efekat CORM-A1 na diferencijaciju Th1, Th17 i Th2 ćelija u PDLČ. Primena VMDS + CORM-A1 dovela je do statistički značajnog povećanja procenta Th2 (CD4⁺IL-4⁺) ćelija u odnosu na davanje samo VMDS. Međutim, procenat Th1 (CD4⁺IFN-γ⁺) i Th17 (CD4⁺IL-17⁺) ćelija kao i ćelija koje sekretuju anti-inflamatorni citokin IL-10 (IL-10⁺ ćelije) nije razlikovao između eksperimentalnih grupa (slika 16a). Dalje je ispitivana ekspresija gena za citokine karakteristične za Th1, Th17 i Th2 ćelije. Nivo iRNK za protektivne citokine IL-4 i IL-10 bio je statistički značajno veći kod VMDS + CORM-A1 tretiranih miševa u odnosu na VMDS grupu (slika 16b), dok se nivo iRNK za IFN-γ i IL-17 nije razlikovao

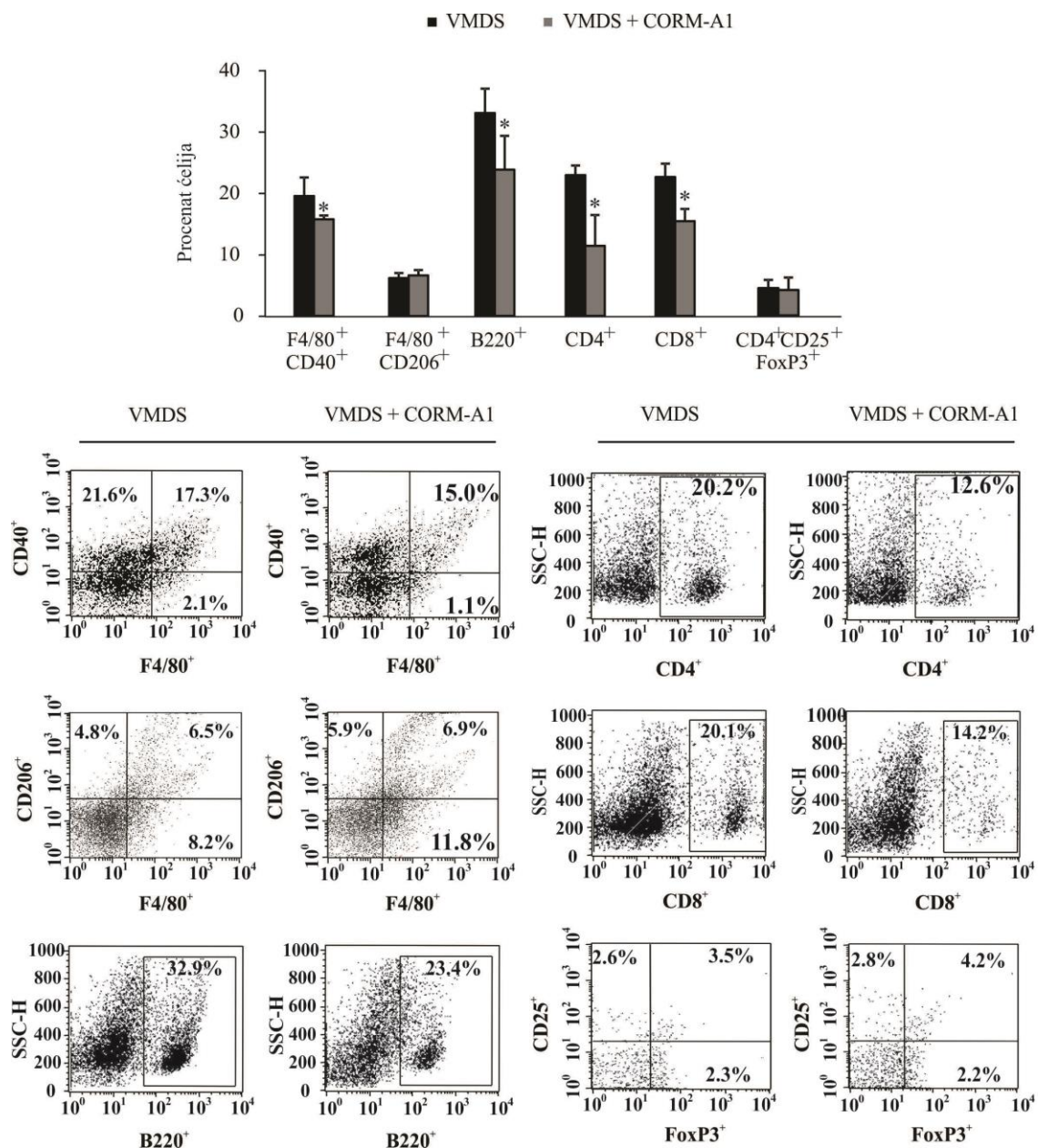
između eksperimentalnih grupa. Uticaj CORM-A1 na sekreciju pomenutih citokina ispitivan je ELISA testom. U skladu sa prethodnim rezultatima, VMDS + CORM-A1 tretman nije uticao na lučenje pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17 (slika 16c). Sekrecija anti-inflamatornog citokina IL-10 bila je značajno povećana nakon primene VMDS + CORM-A1 u poređenju sa tretmanom životinja samo VMDS, dok je koncentracija citokina IL-4 bila nedetektabilna u supernatantima ćelija izolovanih iz obe grupe miševa. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da CORM-A1 tretman usmerava zastupljenost ćelija PDLČ u pravcu protektivnih Th2 ćelija, i na unutarćelijskom i genskom nivou, a nema uticaja na Th1 i Th17 odgovor u ovom limfnom organu.



Slika 16. Uticaj CORM-A1 na diferencijaciju Th ćelija pankreasnih drenirajućih limfnih čvorova. *Ex vivo* analiza ćelija PDLČ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. a) Procentat CD4⁺IFN-γ⁺, CD4⁺IL-17⁺, CD4⁺IL-4⁺ i IL-10⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom. Reprezentativni dot plotovi prikazani su ispod grafika. b) Nivo iRNK za IFN-γ, IL-17, IL-4 i IL-10 određen je RT-PCR metodom u realnom vremenu i normalizovan u odnosu na β-aktin. c) Koncentracija citokina IFN-γ, IL-17, IL-4 i IL-10 u izolovanim supernatantima merena je ELISA metodom iz supernatantata ćelija dobijenih nakon 48h inkubacije ćelija PDLČ. N.D. nije detektabilno. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.3.5. Efekat CORM-A1 na infiltraciju imunskih ćelija u pankreas

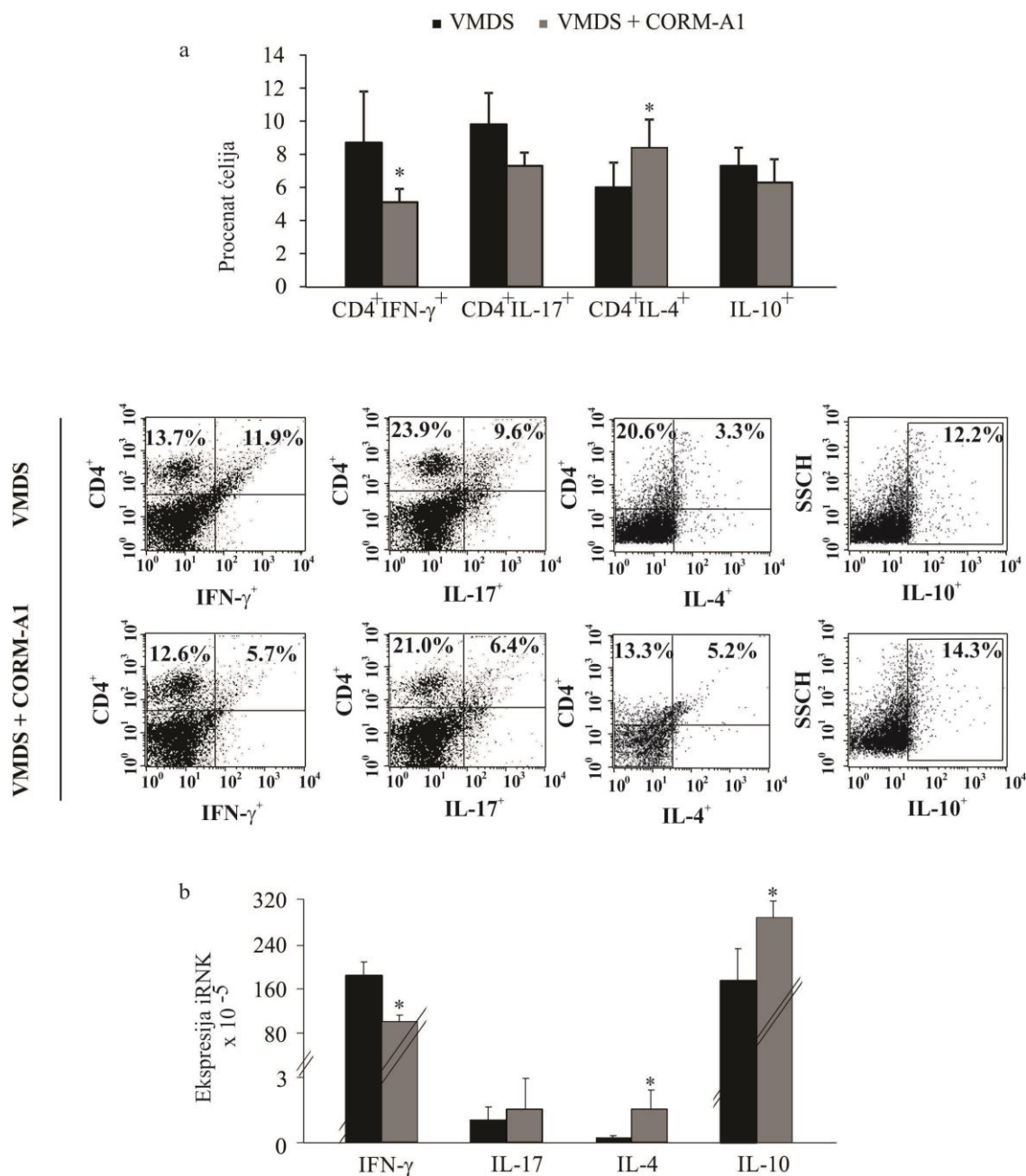
Kako je na histološkim presecima pankreasa pokazano da CORM-A1 ublažava ili potpuno sprečava infiltraciju imunskih ćelija u pankreas tokom DT1, metodom protočne citofluorimetrije kvantifikovan je insulitis i analiziran fenotip i zastupljenost različitih imunskih ćelija u pankreasu. Izolovane su mononukleusne ćelije koje infiltriraju pankreas (PMĆ) i utvrđivana je ekspresija površinskih markera različitih imunskih ćelija. U pankreasu miševa koji su primali VMDS + CORM-A1 zastupljen je statistički značajno manji procenat M1 makrofaga ($F4/80^+CD40^+$), B limfocita ($B220^+$) i $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita u poređenju infiltratima pankreasa miševa tretiranih samo VMDS (slika 17). Zastupljenost M2 makrofaga ($F4/80^+CD206^+$) kao i Treg ćelija ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) nije se razlikovala između eksperimentalnih grupa. Ovi rezultati ukazuju da primena agensa koji oslobađa CO smanjuje ulazak autoagresivnih imunskih ćelija u pankreas u ovom modelu DT1.



Slika 17. Efekat CORM-A1 na zastupljenost M1, M2 makrofaga, B, CD4⁺, CD8⁺ i Treg limfocita u pankreasnim infiltratima. Procenat F4/80⁺CD40⁺, F4/80⁺CD206⁺, B220⁺, CD4⁺, CD8⁺ i CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom PMĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. Donji panel predstavlja reprezentativne dot plotove. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.3.9. Analiza prisustva subpopulacija Th ćelija u pankreasnim infiltratima

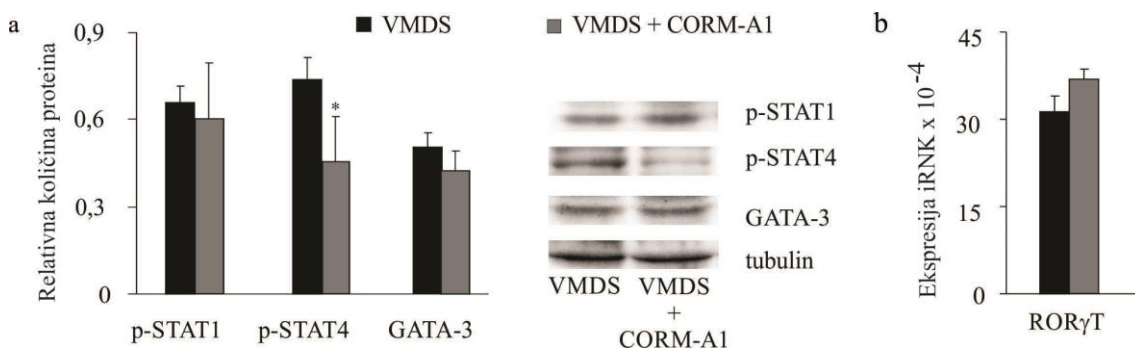
Dalje, utvrđivan je uticaj CORM-A1 na fenotip diferenciranih Th ćelija koje infiltriraju pankreas. U poređenju sa životinjama tretiranih samo VMDS, primena VMDS + CORM-A1 dovela je do statistički značajnog smanjenja procenta Th1 ($CD4^+IFN-\gamma^+$) ćelija, uz istovremeno povećanje procenta Th2 ($CD4^+IL-4^+$) ćelija (slika 18a). Procentat Th17 ($CD4^+IL-17^+$) i ćelija koje proizvode IL-10⁺ nije se razlikovao između eksperimentalnih grupa. U skladu sa ovim rezultatima bila je i ekspresija gena za pomenute citokine. Nivo iRNK za pro-inflamatorni citokin IFN- γ bila je značajno niža kod PMĆ miševa tretiranih VMDS + CORM-A1, dok je ekspresija iRNK za Th2 reprezentativne citokine IL-4 i IL-10 bila značajno povećana u poređenju sa pankreasnim infiltratima životinja koje su primale samo VMDS (slika 18b). Tretman VMDS + CORM-A1 nije ispoljio efekat na nivo iRNK za citokin IL-17. Ovi rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu CORM-A1 sprečavanjem infiltracije Th1 ćelija u pankreas i ispoljavanjem imunomodulatornog dejstva.



Slika 18. Uticaj CORM-A1 na prisustvo subpopulacija Th ćelija u pankreasnim infiltratima. *Ex vivo* analiza PMĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. a) Procenat CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-17⁺, CD4⁺IL-4⁺ i IL-10⁺ ćelija određen je protočnom citofluorimetrijom. Reprezentativni dot plotovi prikazani su ispod grafika. b) Relativna ekspresija gena za citokine IFN- γ , IL-17, IL-4 i IL-10 određena je RT-PCR metodom u realnom vremenu i normalizovana u odnosu na β -aktin. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. *p<0,05 se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.3.10. Molekulski mehanizmi regulacije diferencijacije Th ćelija pankreasnih infiltrata

Pošto je pokazano da primena CORM-A1 moduliše diferencijaciju Th ćelija, dalje su ispitivani molekularni mehanizmi kojima bi se mogli objasniti zapaženi efekti primenjenog agensa. U tom smislu utvrđivana je ekspresija transkripcionih faktora STAT1 i STAT4, GATA-3 i ROR γ T uključenih u regulaciju diferencijacije Th1, Th2 i Th17 ćelija, respektivno. Imunoblot analiza pokazala je da je aplikacija VMDS + CORM-A1 statistički značajno smanjila količinu p-STAT4, ali nije menjala količinu STAT1 transkripcionog faktora koji učestvuju u razvoju Th1 ćelija, u poređenju sa pankreasnim infiltratima miševa tretiranih VMDS (slika 19a). Količina GATA-3, faktora od koga zavisi razvoj Th2 ćelija, nije se razlikovala između grupa. Nivo iRNK za ROR γ T, transkripcioni faktor važan za diferenciranje Th17 ćelija, nije se razlikovala između eksperimentalnih grupa (slika 19b). Ovi rezultati ukazuju da CORM-A1 u *in vivo* uslovima suprimira razvoj Th1 ćelija posredstvom transkripcionog faktora STAT4, dok diferenciranje Th2 ćelija verovatno ne zavisi od uticaja CORM-A1 na GATA-3 transkripcioni faktor, već neke druge signalne puteve.



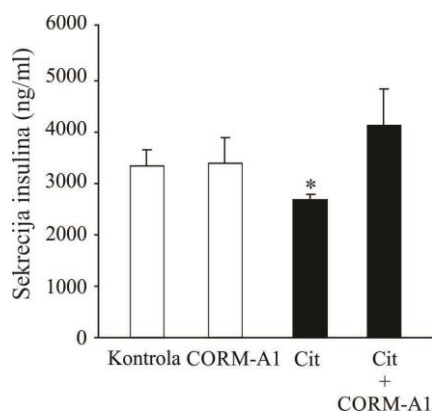
Slika 19. Efekat CORM-A1 na molekularne mehanizme regulacije diferencijacije Th ćelija pankreasnih infiltrata. *Ex vivo* analiza PMĆ izolovanih iz miševa koji su primali VMDS ili VMDS + CORM-A1 10-og dana od indukcije bolesti. a) Količina proteina p-STAT1, p-STAT4 i GATA3 merena je imunoblot metodom u lizatima PMĆ i normalizovana u odnosu na količinu tubulina. Reprezentativne trake imunoblota prikazane su desno od grafika. b) Relativna ekspresija iRNK za ROR γ T određena je RT-PCR metodom u realnom vremenu i normalizovana u odnosu na β -aktin. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

4.4. Uticaj CORM-A1 na β ćelije pankreasa

Kako je u prethodnim eksperimentima pokazano da primena CORM-A1 sprečava razvoj DT1 indukovano davanjem VMDS, sledeći eksperimenti imali su za cilj da utvrde efekat CORM-A1 na β ćelije pankreasnih ostrvaca, ciljne ćelije u DT1. Sprovedena su *in vitro* istraživanja na modelu β ćelija pankreasa, ćelijama insulinoma poreklom iz pacova (RINm5F) i miša (MIN6), kao i na primarnim pankreasnim ostrvcima izolovanim iz C57BL/6 miševa. Inflamatorno stanje, u kome se nalaze β ćelije tokom DT1, simulirano izlaganjem ćelija dejstvu pro-inflamatornih citokina (IFN- γ + TNF + IL-1 β).

4.4.1. Uticaj CORM-A1 na funkciju pankreasnih ostrvaca u *in vitro* uslovima

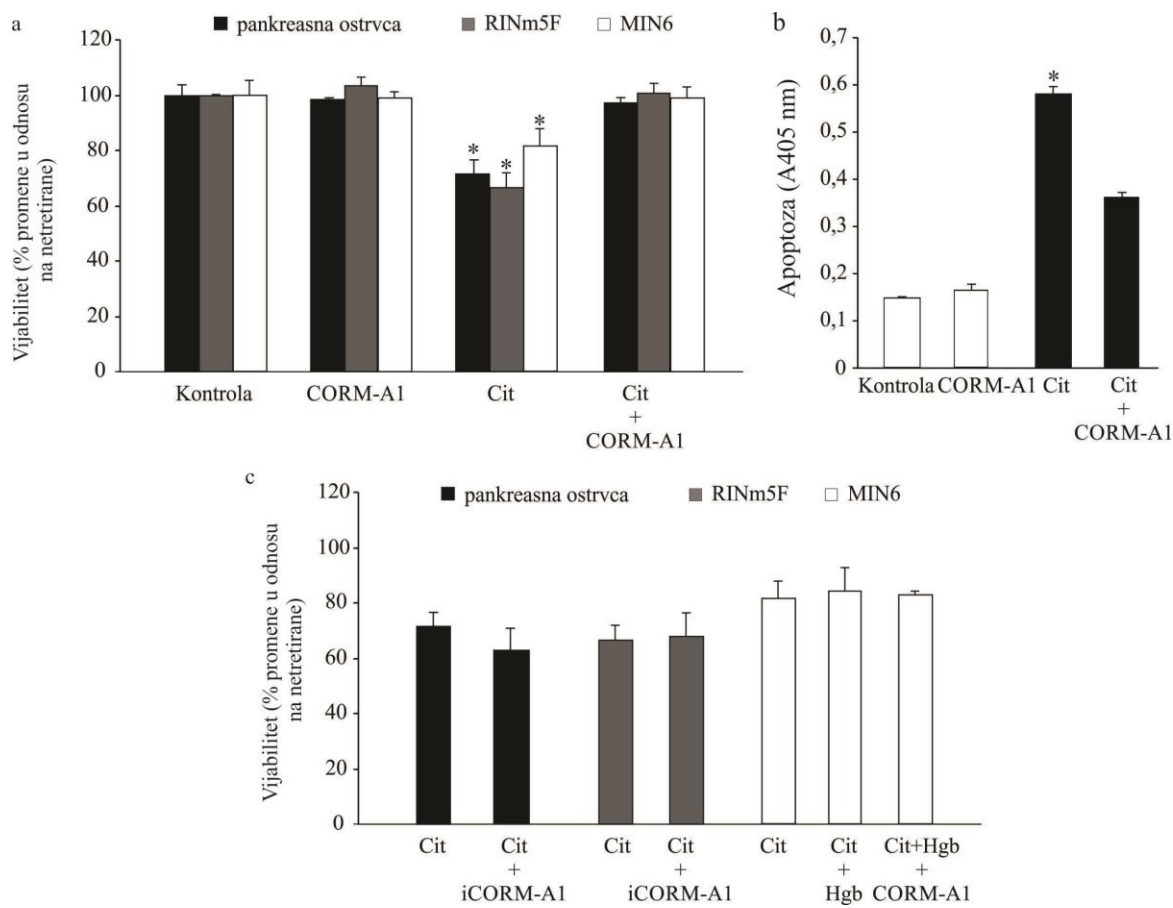
Najpre je ispitivan uticaj CORM-A1 tretmana na funkciju pankreasnih ostrvaca u *in vitro* pro-inflamatornim uslovima merenjem sekrecija insulina ELISA metodom. U poređenju sa kontrolnom kulturom, primena CORM-A1 nije uticala na sekreciju insulina pankreasnih ostrvaca, dok je citotoksični tretman citokinima doveo do statistički značajnog smanjenja sekrecije (slika 20). Nasuprot tome, istovremeni tretman CORM-A1 i pro-inflamatornih citokina očuvao je sekreciju insulina, što ukazuje da donor CO štiti pankreasna ostrvca od inhibitornog delovanja pro-inflamatornih citokina.



Slika 20. Uticaj CORM-A1 na funkcionalnost pankreasnih ostrvaca. Sekretija insulina određena je ELISA metodom nakon 48h inkubacije pankreasnih ostrvaca u odsustvu (kontrola) ili prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu CORM-A1 (25 μ M). Prikazane su SV \pm SD iz četiri nezavisna eksperimenata. *p<0,05 u odnosu na kontrolu.

4.4.2. Uticaj CORM-A1 na preživljavanje i apoptozu β ćelija pankreasa

Dalje je ispitivan efekat CORM-A1 na preživljavanje β ćelija nakon tretmana pro-inflamatornim citokinima u *in vitro* uslovima. Rezultati MTT testa pokazali su da sam CORM-A1 ne ispoljava toksičnost na pankreasna ostrvca, RINm5F i MIN6 ćelije (slika 21a), dok je koktel pro-inflamatornih citokina doveo do statistički značajnog smanjenja preživljavanja. Međutim, istovremeni tretman CORM-A1 i citokina doveo je do povećanja vijabiliteta izolovanih pankreasnih ostrvaca, RINm5F i MIN6 ćelija do nivoa kontrolnih kultura. Pošto se MTT test zasniva na merenju aktivnosti mitohondrija ćelija i na taj način posredno pokazuje preživljavanje ćelija (Berridge i Tan, 1993), ispitivan je i uticaj CORM-A1 na apoptozu pankreasnih ostrvaca izazvanu koktelom TNF+IL-1 β +IFN- γ . Primenjeni citokini indukovali su apoptozu pankreasnih ostrvaca merenu preko oslobađanja kompleksa histon-DNK. Nasuprot tome, CORM-A1 primenjen sam nije indukovao apoptozu pankreasnih ostrvaca, a zajedno sa citokinima značajno ju je smanjio (slika 21b). Da bi se utvrdilo da li je za primećene citoprotektivne efekte odgovoran CO, pankreasna ostrvca, RINm5F i MIN6 ćelije bili su izloženi delovanju kombinacije pro-inflamatornih citokina u prisustvu ili odsustvu inaktivne forme CORM-A1 (iCORM-A1), koja nema sposobnost otpuštanja CO (Sandouka i sar, 2006), ili u prisustvu, odnosno odsustvu hemoglobina (Hgb), koji vezuje CO i sprečava njegovo delovanje (Liu i sar, 2002). Nakon istovremenog tretmana iCORM-A1 i citokinskog koktela nije bilo razlike u preživljavanju pankreasnih ostrvaca i RINm5F ćelija u odnosu na ostrvca i ćelije tretirane samo citokinima (slika 21c). U skladu sa ovim rezultatom bilo je i preživljavanje MIN6 insulinoma ćelija koje su bile tretirane CORM-A1 u prisustvu Hgb i citokina. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da CORM-A1 ispoljava citoprotektivni efekat na β ćelije pankreasa i da je za ovaj efekat ključni molekul CO.

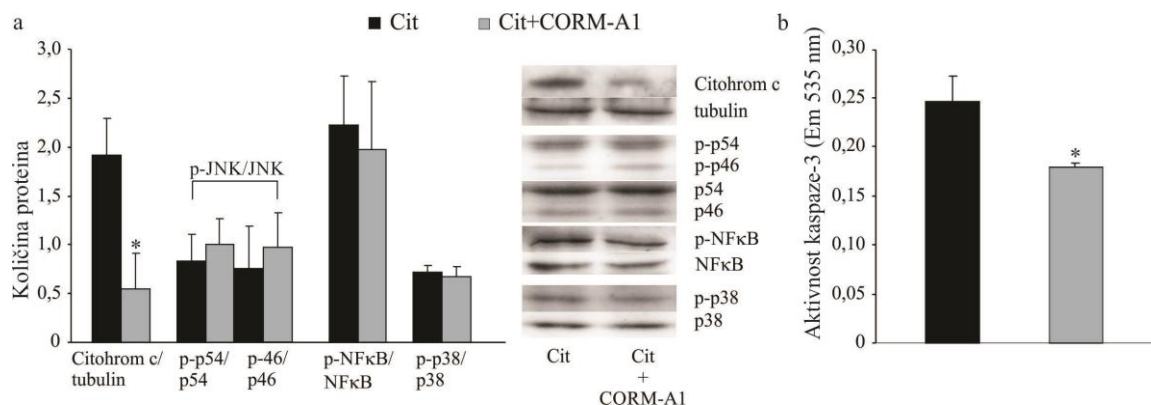


Slika 21. Uticaj CORM-A1 na preživljavanje i apoptozu pankreasnih ostrvaca, RINm5F i MIN6 ćelija nakon tretmana pro-inflamatornim citokinima. Izolovana pankreasna ostrvca (n=30), RINm5F (1x10⁴/bunarić) i MIN6 (1x10⁴/bunarić) inkubirane su 48h u odsustvu (kontrola) ili prisustvu TNF+IL-1β+IFN-γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu CORM-A1 (25μM) ili iCORM-A1 (25μM) ili Hgb (50 μM). a) Vijabilitet određen MTT testom. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na vrednost apsorbancije kontrole. b) Apoptoza pankreasnih ostrvaca određena je korišćenjem eseja za utvrđivanje apoptoze. c) Vijabilitet određen MTT testom. Prikazane su SV ± SD iz četiri nezavisna eksperimenata. *p<0,05 u odnosu na kontrolu.

4.4.3. Molekulski mehanizmi kojima CORM-A1 štiti pankreasna ostrvaca od apoptoze indukovane pro-inflamatornim citokinima

Dalja istraživanja išla su u pravcu otkrivanja mehanizama odgovornih za zaštitu pankreasnih ostrvaca od apoptoze indukovane pro-inflamatornim citokinima. Poznato je da je p38 MAP kinaza uključena u proces apoptoze β ćelija pankreasa indukovane citokinima, kao što je IL-1 β (Saldeen i sar, 2001). Osim p38 signalnog puta, u procesu apoptoze učestvuje i JNK kinaza koja aktivira NF κ B (Liu i Lin, 2005). Da bi se ispitalo da li CORM-A1 ispoljava svoju anti-apoptotsku ulogu modulisanjem aktivnosti ovih signalnih molekula, merena je njihova ekspresija imunoblot metodom. U cilju isključivanja mogućnosti da je uočeno zaštitno dejstvo CORM-A1 posledica maligne transformacije insulinoma ćelija, ispitivanje unutarćelijskih mehanizama uključenih u citoprotekciju rađeno je na primarnim pankreasnim ostrvcima. Tretman CORM-A1 nije promenio odnos p-JNK/JNK, p-p38/p38 i p-NF κ B/NF κ B molekula u pankreasnim ostrvcima u poređenju sa ostrvcima gajenim u prisustvu samo citokina (slika 22a). Ovi rezultati ukazuju da CORM-A1 ne ispoljava anti-apoptotski efekat posredstvom MAP kinazog signalnog puta.

Pro-inflamatorni citokini u β ćelijama mogu da aktiviraju mitohondrijski put apoptoze, kada dolazi do oslobađanja pro-apoptotskog molekula citohroma c (Galluzzi i sar, 2012). Zbog toga, ispitivan je uticaj CORM-A1 tretmana na količinu citohroma c u izolovanim pankreasnim ostrvcima nakon citotoksičnog stimulusa. Rezultati imunoblot metode pokazali su da je tretman CORM-A1 u prisustvu pro-inflamatornih citokina TNF+IL-1 β +IFN- γ doveo do statistički značajnog smanjenja količine citohroma c u pankreasnim ostrvcima u odnosu na ostrvca tretirana samo citokinima (slika 22a). Posledica oslobađanja citohroma c je aktivacija kaspaze-3 (Riedl i Shi, 2004), te je aktivnost ove kaspaze merena fluorometrijski. Tretman CORM-A1 zajedno sa citokinima doveo je do statistički značajnog smanjenja aktivacije kaspaze-3 u pankreasnim ostrvcima u odnosu na tretman pro-inflamatornim citokinima (slika 22b). Ovi rezultati ukazuju da CORM-A1 sprečava apoptozu pankreasnih ostrvaca indukovanu citokinima TNF+IL-1 β +IFN- γ tako što smanjuje količinu citohroma c i aktivaciju kaspaze-3.



Slika 22. Molekulski mehanizmi citoprotekcije CORM-A1. Pankreasna ostrvca izolovana iz C57BL/6 miševa inkubirana su 24h u prisustvu TNF+IL-1 β +IFN- γ (10 ng/ml svaki, Cit) i prisustvu ili odsustvu CORM-A1 (25 μ M). a) Količina proteina izolovanih iz ćelijskog lizata pankreasnih ostrvaca nakon tretmana određena je imunoblot metodom i normalizovana u odnosu na tubulin. Reprezentativne trake imunoblota prikazane su desno od grafika. b) Aktivnost kaspaze-3 pankreasnih ostrvaca nakon tretmana određena je fluorimetrijski na emisionoj talasnoj dužini (Em) od 535 nm. Prikazane su SV \pm SD iz četiri nezavisna eksperimenata. *p<0,05 u odnosu na citokinima tretirana pankreasna ostrvca.

5. Diskusija

Dijabetes tipa 1 (DT1) je oboljenje prouzrokovano autoimunskim zapaljenskim procesom usmerenim prema Langerhansovim ostrvcima pankreasa, što ima za posledicu apoptozu β ćelija. U modelu autoimunskog dijabetesa indukovanog davanjem VMDS nakon početnog oštećenja β ćelija, ćelije imunskog sistema infiltriraju ostrvca proizvodeći brojne citotoksične medijatore koji uništavaju β ćelije. Smatra se da su inflamatorne promene koje se razvijaju u ostrvcima pankreasa posledica direktnog dejstva streptozotocina, s jedne strane, i razvoja autoimunskog procesa, s druge strane. U sprečavanju autoimunskog procesa balans patogenih M1/Th1/Th17 ćelija i protektivnih M2/Th2/Treg ćelija ima važnu ulogu. Glavni cilj za prevenciju i/ili preokret bolesti u zdravo stanje je pronalaženje načina za očuvanje ili povećanje broja i funkcije β ćelija ili produžavanje života preostalih β ćelija. Jedan od potencijalnih terapijskih pristupa bi mogla biti indukcija anti-inflamatornog odgovora Th2 ćelija (Müller i sar, 2002) koje bi suprimirale aktivisanje imunskog sistema i tako zaštitile β ćelije od intenzivne inflamacije i/ili autoimunosti (Zhang i sar, 2012). Upravo zbog svojih anti-apoptotskih, anti-inflamatornih, anti-oksidativnih, anti-proliferativnih i vazodilatatornih efekata, CO bi mogao biti jedan od mogućih molekula za lečenje DT1.

U ovoj studiji po prvi put je ispitivan terapijsko dejstvo CORM-A1 u eksperimentalnom modelu DT1 indukovanom davanjem VMDS. Ispitivan je imunomodulatorni efekat CORM-A1 na različite imunske ćelije, kao i direktan uticaj CORM-A1 na nivou β ćelija pankreasnih ostrvaca, ciljnih ćelija u autoimunskom DT1.

Početni nalazi ove studije pokazali su da primena CORM-A1 nije toksična za ČLČ u *in vitro* uslovima, i da utiče na diferencijaciju ovih ćelija tako što smanjuje razvoj Th1 i Th17 ćelija, a povećava diferencijaciju Th2 limfocita. *In vivo* primena CO putem donora CORM-A1, suprimira razvoj bolesti u ispitivanom eksperimentalnom modelu DT1. Dalja istraživanja usmerena na ispitivanje mehanizama dejstva CORM-A1 primenjenog u ranom profilaktičkom tretmanu u modelu DT1 pokazala su da su protektivni efekti ovog agensa posredovani pomeranjem balansa predominantno patogenih M1 makrofaga/Th1 ćelija u smeru Th2 tipa imunosti. Pored imunomodulatornog dejstva, davanje CORM-A1 ispoljilo je i direktno citoprotektivno dejstvo na nivou β ćelija pankreasa, u *in vitro* uslovima u kojima je simulirano inflamatorno stanje karakteristično za nastanak DT1.

Imajući u vidu prethodne nalaze koji ukazuju da pacovi oboleli od DT1 imaju smanjenu ekspresiju i aktivnost HO-1 u poređenju sa zdravim životinjama (Rodella i sar, 2006), pretpostavka da povećanje količine CO u organizmu može imati povoljan efekat pokazala se tačnom jer je CORM-A1 putem oslobađanja CO sprečio razvoj hiperglikemije u eksperimentalnom modelu DT1 indukovanom davanjem VMDS. Takođe, povećanje sistemske ekspresije HO-1 (ubrizgavanjem virusnog vektora kao nosača za gen *HO-1* kod predijabetičnih NOD miševa) ili izlaganje NOD miševa gasovitom CO, usporilo je progresiju bolesti i prelazak predijabetičnog stanja u dijabetes (Hu i sar, 2007). S druge strane, primena CO (indukcijom HO-1 ili putem donora CORM) pokazala se efikasnom u tretmanu i drugih autoimunskih i patoloških stanja, kao što su inflamacija, sepsa, oštećenje pluća, kardiovaskularne bolesti, transplantacija, kancer, EAE (Gullotta i sar, 2012). Efikasnost CORM-A1 zaista potiče od oslobađanja CO što je pokazano na modelu EAE (Fagone i sar, 2011). Važno je naglasiti da je zaštitni efekat CORM-A1 u modelu dijabetesa bio dugotrajan, čak i u slučaju kratkotrajnog tretmana životinja (rani profilaktički tretman). Da efekti donora CO u ispitivanom modelu bolesti nisu nastali kao rezultat interakcije CORM-A1 sa streptozotocinom, kojom bi donor eventualno blokirao dejstvo streptozotocina i indukciju DT1, pokazuje rezultat da je CORM-A1 sprečio razvoj bolesti i kada je primenjen nakon prestanka davanja VMDS (kasni profilaktički tretman). Takođe, CORM-A1 sprečava razvoj hiperglikemije i kada je primenjen u terapijskom režimu, odnosno kada je bolest već pokrenuta što je važan terapijski aspekt ovog jedinjenja u potencijalnoj primeni na ljudima.

CORM-A1 u modelu dijabetesa indukovnog VMDS prvenstveno ispoljava sistemski imunomodulatorni efekat. To je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da CO u različitim modelima imunoinflamatornih bolesti deluje na imunski odgovor na sistemskom nivou upravo regulacijom nivoa produkcije pro- i anti-inflamatornih citokina. Tako, u modelu sepse indukovane davanjem LPS, miševi koji su bili izloženi gasovitom CO bolje su preživljavali što je bilo povezano sa nižim nivoom pro-inflamatornih citokina IL-6 i IL-1 β u serumu (Morse i sar, 2003). Takođe, primena donora CORM-2 redukovala je nivo citokina TNF i IL-1 β i povećala nivo anti-inflamatornog citokina IL-10 u serumu miševa koji su imali akutni pankreatitis (Chen i sar, 2010). U ovoj studiji pokazano je da u modelu DT1 indukovanom davanjem VMDS

primena CORM-A1 pored citokina IL-6, smanjuje količinu i pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17, uz istovremeno povećanje produkcije anti-inflamatornog citokina IL-4. Kako su IFN- γ , IL-17 i IL-4 citokini karakteristični za Th1, Th17 i Th2 ćelije, respektivno, može se zaključiti da u modelu DT1 indukovanom davanjem VMDS CORM-A1 ispoljava svoje dejstvo modulacijom pomoćničkih T ćelija.

S obzirom na to da je potvrđeno imunomodulatorno dejstvo CORM-A1 u patogenezi dijabetesa, zanimljiv je podatak da ovaj agens nije uticao na procenat M1, M2 makrofaga, pomoćničkih i citotoksičnih T limfocita, kao ni Treg ćelija u slezini, dok je procenat B ćelija bio smanjen. Takođe, nije bilo efekata ni na procenat T i B limfocita u PDLČ nakon davanja CORM-A1. Ovi rezultati su u skladu sa studijom u kojoj su ispitivali razlike u imunskom fenotipu miševa kojima je genetičkim manipulacija isključen gen za HO-1 (HO-1^{-/-}) u poređenju sa njihovim prirodnim parnjacima (Kapturczak i sar, 2004). U toj studiji je pokazano da isključivanje gena za HO-1 nije uticalo na proporciju T i B limfocita, kao ni monocita/makrofaga u slezini miševa u poređenju sa prirodnim parnjacima, dok je u odsustvu ekspresije HO-1 bio favorizovan pro-inflamatorni Th1 odgovor nakon stimulacije mitogenom. Uzevši u obzir ove rezultate može se zaključiti da je HO/CO sistem važan u nishodnim fazama imunskog odgovora, kao što je aktivacija limfocita i diferencijacija Th ćelija. Kako CORM-A1 nije menjao broj ispitivanih imunskih ćelija, može se reći da primena ovog donora ne dovodi do generalizovane imunske supresije, već utiče na finu modulaciju imunskog odgovora.

Iako se distribucija imunskih ćelija u perifernim limfnim tkivima nije bitno promenila nakon tretmana sa CORM-A1, infiltriranje imunskih ćelija u pankreas bilo je značajno manje u odnosu na obolele životinje. Upravo ta infiltracija patogenih ćelija i stvaranje pro-inflamatornog stanja u pankreasu predstavlja jedan od prvih koraka koji prethode smrti β ćelija, pojavi hiperglikemije i kliničkih manifestacija DT1 (Eizirik i sar, 2009). Važno je napomenuti da primena CORM-A1 sprečava ulazak T limfocita i makrofaga u pankreas. Histološka analiza pankreasa pokazala je smanjenu infiltraciju imunskih ćelija kako tokom indukcije bolesti (rani profilaktički tretman), tako i kada se ovaj agens primenjuje pošto je autoimunski odgovor usmeren protiv β ćelija već pokrenut (terapijski tretman), što je u skladu sa literaturnim podacima. Naime, u radu

Fagone i saradnika (Fagone i sar, 2011) primena CORM-A1 u EAE, animalnom modelu multiple skleroze, smanjila je kliničke i histološke znake bolesti, što se ogledalo kao smanjeno infiltriranje polimorfonukleusnih ćelija u kičmenu moždinu. Takođe, indukcija ekspresije HO-1 enzima redukovala je formiranje inflamatornih žarišta u centralnom nervnom sistemu (CNS), suprimirala je proliferaciju Th ćelija unutar CNS, redukovala je procenat CD4⁺ ćelija koje su ekspimirale IFN- γ , ali frekvencija Th ćelija koje su ekspimirale IL-10 nije bila promenjena (Chora i sar, 2007). Pored toga, primena gasovitog CO smanjila je oštećenje tkiva uzrokovano ishemijom/reperfuzijom u modelu transplantacije bubrega, a protektivni efekti CO uključivali su smanjeno infiltriranje makrofaga (Nakao i sar, 2005). Poznato je da infiltriranje imunskih ćelija u pankreas vodi stvaranju ROS, RNS i pro-inflamatornih citokina od strane imunskih ćelija, ali i samih β ćelija. Oslobođeni pro-inflamatorni medijatori doprinose oštećenju β ćelija u DT1 (Lightfoot i sar, 2012). U modelu eksperimentalnog nekrotizujućeg enterokolitisa primena CO smanjila je aktivaciju iNOS i produkciju NO u enterocitima, zatim inflamaciju u intestinumu i nivo nitrita u serumu (Zuckerbraun i sar, 2005). Imunohistohemijske analize pankreasa pokazale su da je protektivno dejstvo CORM-A1 u našem modelu, pored smanjene infiltracije ćelija, praćeno i smanjenim oštećenjem pankreasnih ostrvaca izazvanim produkcijom ROS i RNS, pa se može zaključiti da CORM-A1 ispoljava svoje dejstvo kako na β ćelije, tako i na imunske ćelije koje infiltriraju pankreas.

Makrofagi su prve ćelije koje ulaze u pankreas tokom inicijacije dijabetesa indukovano VMDS. Ove ćelije mogu imati dvojaku ulogu u patogenezi DT1. Smatra se da M1 makrofagi predstavljaju jedne od prvih ćelija koje pokreću insulitis i smrt β ćelija pankreasa produkcijom pro-inflamatornih citokina, ROS i RNS, dok se alternativno aktivisani makrofagi (M2) dovode u vezu sa smanjenjem hiperglikemije, insulitisa i inflamacije u pankreasu, pa se smatra da imaju zaštitnu ulogu u autoimunskom DT1 (Espinoza-Jiménez i sar, 2012). Visok procenat naivnih makrofaga nalazi se u peritoneumskoj šupljini (Zhang i sar, 2008). Kako je u našoj studiji CORM-A1 davan intraperitoneumski, a imajući u vidu vreme poluživota donora CO u fiziološkim uslovima (Motterlini i sar, 2005), makrofagi predstavljaju jedne od prvih imunskih ćelija na koje CORM-A1 može ispoljiti svoje dejstvo. Donor CO smanjio je procenat M1 makrofaga, ali nije uticao na procenat M2 makrofaga. Moglo bi se

zaključiti da je primarni efekat CORM-A1 u pravcu supresije citocidne mašinerije makrofaga, jer je primena donora CO smanjila produkciju pro-inflamatornih medijatora kao što su ROS, RNS i citokini TNF, IL-1 β i IL-6. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije koja je pokazala da primena gasovitog CO inhibira produkciju pro-inflamatornih citokina (Otterbein i sar, 2000) dok je primena donora CORM-2 smanjila produkciju ROS, indukciju iNOS i produkciju NO u stimulisanim makrofagima (Srisook i sar, 2006). Imajući u vidu rezultate ove disertacije, može se pretpostaviti da je smanjeno prisustvo M1 makrofaga u pankreasu posledica ili direktnog uticaja CO na diferencijaciju makrofaga na periferiji ili sprečavanja ulaska ovih makrofaga u ciljno tkivo. Modulacija pro-inflamatornog odgovora posredovanog M1 makrofagima, koji su takođe i APĆ, može se odraziti na oblikovanje adaptivnog imunskog odgovora vođenog pomoćničkim T ćelijama.

Pored makrofaga, T limfociti su drugi tip ćelija veoma važnih za održavanje autoimunskog odgovora usmerenog ka β ćelijama. Pokazano je da povećana količina CO kod NOD miševa smanjuje produkciju IFN- γ (citokina Th1 ćelija) u slezini miševa, ali da ne utiče na sekreciju citokina karakterističnih za Th2 ćelije, IL-4 i IL-10 (Hu i sar, 2007). Takođe, u istoj studiji pokazano je da je prekomerna ekspresija HO-1 suprimirala funkcionalno sazrevanje DĆ, usled čega je bila smanjena indukcija Th1 ćelija i progresija bolesti. U skladu sa ovim rezultatom, davanje CORM-A1 u modelu DT1 izazvanom VMDS moduliralo je Th1 odgovor u slezini, što se ogledalo kao smanjeni procenat Th1 ćelija, praćen smanjenjem ekspresije gena za citokin ove subpopulacije T limfocita, IFN- γ , kao i njegove sekrecije. Donor CO doveo je do smanjenja sekrecije IL-17 i povećanja sekrecije anti-inflamatornog citokina IL-4, međutim, nije ispoljio efekat na procenat Th17 i Th2 ćelija u slezini eksperimentalnih miševa. Osim Th17 ćelija, poznato je da $\gamma\delta$ T ćelije, NKT ćelije (engl. *Natural Killer T*), kao i nedavno otkrivene urođene limfoidne ćelije (ILC engl. *Innate Lymphoid Cells*) predstavljaju važne ćelije urođene imunosti koje sekretuju IL-17 u odgovoru na različite stimulse (Gladiator i LeibundGut-Landmann, 2013). Takođe, pored Th2 ćelija, IL-4 takođe sekretuju i NKT (Au-Yeung i Fowell, 2007), $\gamma\delta$ T ćelije (Gerber i sar, 1999), kao i eozinofili (Piehler i sar, 2011), bazofili (Khodoun i sar, 2004) i mast ćelije (Gessner i sar, 2005). Na osnovu svega navedenog, može se objasniti nalaz da je CORM-A1 uticao na sekreciju citokina

IL-4 i IL-17, ali ne i na procenat Th2 i Th17 ćelija, te se može zaključiti da imunomodulatorno dejstvo CORM-A1 u našem modelu DT1 nije ograničeno samo na pomoćničke T limfocite, već i druge imunske ćelije koje su izvor citokina IL-17 i IL-4.

Pored efekta na imunske ćelije u slezini, CORM-A1 je modulirao i imunski odgovor u PDLČ. Ispitivanje inflamatornog statusa PDLČ je veoma važno s obzirom na to da nakon inicijalne destrukcije β ćelija pankreasa, APC prisutne u pankreasu preuzimaju autoantigene β ćelija i migriraju u PDLČ gde ih prikazuju autoreaktivnim T i B limfocitima (Calderon i Unanue, 2012; Höglund i sar, 1999). U zavisnosti od okruženja u kome se naivne Th ćelije nalaze, one mogu da se diferenciraju u protektivne Th2 ćelije ili agresivne Th1 i Th17 ćelije koje učestvuju u progresiji bolesti. Primena agensa koji oslobađa CO u ispitivanom modelu DT1 dovela je do povećanog procenta Th2 ćelija u PDLČ, kao i povećane ekspresije gena za anti-dijabetogene citokine IL-4 i IL-10, odnosno povećane sekrecije IL-10, dok sekrecija citokina IL-4 nije bila detektibilna. Davanje CORM-A1 nije uticalo na Th1 odgovor u PDLČ, za razliku od odgovora ovih ćelija u slezini, što sugeriše da su efekti ovog agensa tkivno specifični i zavise od lokalnog okruženja u kome se Th ćelije nalaze. Takođe, jedan od razloga za različitu distribuciju Th ćelija u limfnim organima je moguće dejstvo CORM-A1 na migratorne sposobnosti limfocita, odnosno na ekspresiju adhezivnih molekula ili hemokina koji usmeravaju specifično kretanje ćelije.

Pokazani efekti CORM-A1 na Th diferencijaciju mogu biti direktni ili indirektni. Direktni efekti CORM-A1 ogledaju se u redukovanju procenta Th1 i Th17 ćelija i sekrecije reprezentativnih citokina, a u smeru povećanja procenta Th2 ćelija, što je pokazano u *in vitro* sistemu. Molekulski mehanizmi kojim HO-1/CO sistem utiče na diferencijaciju T ćelija nisu u potpunosti razjašnjeni. U studiji u kojoj je enzim HO-1 indukovano davanjem hemina, organskog jedinjenja koje sadrži protoporfirinski prsten sa gvožđem za koje je vezan hlor, bila je smanjena ekspresija ROR γ T i aktivacija STAT3, transkripcionih faktora koji učestvuju u razvoju Th17 ćelija, pa je sledstveno bila inhibirana diferencijacija Th17 ćelija, ali nije bilo efekata na Th1 i Th2 ćelijski odgovor (Zhang i sar, 2013). U našem radu primena CORM-A1 redukovala je Th17 diferencijaciju posredstvom smanjenja ekspresije ROR γ T transkripcionog faktora u ČLČ u *in vitro* uslovima. Iako je CORM-A1 tretman modulirao sekreciju IFN- γ

citokina, nije uticao na ekspresiju transkripcionog faktora T-bet, ključnog za ekspresiju ovog citokina. Međutim, *in vivo* primena CORM-A1 značajno je smanjila ekspresiju STAT4, molekula koji je uključen u signalni put odgovoran za transkripciju gena za IFN- γ . Iako se populacija Th2 ćelija povećava nakon tretmana CORM-A1 nije bilo uticaja na ekspresiju transkripcionog faktora GATA-3, te se može pretpostaviti da CORM-A1 moduliše druge molekule uključene u prenos signal koji vode ekspresiji IL-4, kao što je STAT6 (Rautajoki i sar, 2008). S obzirom na to da se efekti CORM-A1 na Th diferencijaciju unekoliko razlikuju između *in vitro* i *in vivo* sistema, jedno od mogućih objašnjenja nalazi se u činjenici da *in vitro* istraživanja predstavljaju pojednostavljen sistem koji se ispituje u kontrolisanim, izolovanim uslovima, za razliku od živog sistema koga odlikuje izuzetna složenost, te je nekad teško da se ekstrapoliraju rezultati *in vitro* istraživanja na živi sistem. Pored direktnog efekta CORM-A1 na razvoj T limfocita modulacijom njihovih signalnih molekula, uticaj donora CO na Th diferencijaciju može biti i posledica dejstva CO na APC. Pokazano je da izlaganje DC gasovitom CO (Simon i sar, 2013) ili donoru, CORM-2 (Rémy i sar, 2009) smanjuje imunogene osobine ovih ćelija i usmerava ka tolerogenom fenotipu za koji se smatra da usporava ili čak sprečava razvoj DT1. Primena CORM-A1 u našem modelu smanjila je pro-inflamatorni odgovor M1 makrofaga, pa je samim tim moguće pretpostaviti da je smanjen procenat Th1 i Th17 ćelija upravo rezultat smanjene prezentacije autoantigena β ćelija.

Veoma bitan deo populacije pomoćničkih T limfocita predstavljaju i Treg ćelije (Sakaguchi S i sar, 2009). Funkcija ovih ćelija je da regulišu imunski odgovor suprimiranjem aktivnosti patogenih imunskih ćelija. U našem modelu broj ovih ćelija nije se menjao nakon CORM-A1 tretmana u odnosu na obolele životinje, što se može objasniti odsustvom efekta donora CO na naivne CD4⁺ prekursorske ćelije. Naime, u zavisnosti od citokinskog miljea u kome se nalazi, prekursorska CD4⁺ ćelija može da se diferencira kako u Th17 tako i u Treg (Eisenstein i Williams, 2009). S obzirom na to da ni broj Th17 ćelija nije bio promenjen pod dejstvom CORM-A1, može se zaključiti da CO zaista ne utiče na naivne ćelije, prekursore Th17/Treg ćelija.

Pored Treg ćelija, imunski odgovor mogu da suprimiraju i različiti citokini, kao što je i IL-10. IL-10 inhibira pro-inflamatorni odgovor urođenog i adaptivnog imuniteta,

učestvuje u rezoluciji inflamacije i sprečava lezije tkiva izazvane preteranim imunskim odgovorom, te se smatra protektivnim molekulom u različitim autoimunskim bolestima kao što je inflamatorna bolest creva (Braat i sar, 2003), reumatoidni artritis (Alanärä i sar, 2010), EAE (Bettelli i sar, 1998), kao i DT1 (Singh i sar, 2011). Ovaj citokin produkuje prvenstveno aktivisane Th2 ćelije (Ng i sar, 2013), ali se danas zna da je IL-10 ključni citokin za supresivne sposobnosti B regulatornih ćelija (Breg) (Mauri C i Blair PA, 2010). Iako je u našem modelu populacija B limfocita smanjena nakon tretmana CORM-A1, kako na periferiji tako i u ciljnom tkivu, ne može se isključiti pretpostavka da povišenoj produkciji IL-10 pored Th2 doprinose i Breg ćelije. Takođe, u literaturi je pokazano da uključivanje HO-1/CO sistema povećava sekreciju anti-inflamatornog citokina IL-10 (Otterbein i sar, 2000).

Pored modulacije imunskog sistema, anti-dijabetogeno dejstvo CORM-A1 može uključivati i direktne protektivne efekte donora CO na β ćelije pankreasa. Jedan od ranih pokazatelja poremećaja funkcije β ćelija uključuje odloženi i sporiji odgovor na glukozu i oscilacije u sekreciji insulina (Bell i Polonsky, 2001). Hiperglikemija i klinička manifestacija DT1 javljaju se kada disfunkcija ili gubitak β ćelija padne ispod kritičnog praga, usled čega nema dovoljne sekrecije insulina kojom bi se regulisao metabolizam glukoze. Kod životinja koje su primale CORM-A1 bila je povećana sekrecija insulina, čime se može objasniti odsustvo razvoja hiperglikemije. Naši rezultati bili su u skladu sa rezultatima studije u kojoj je davanje hemina kod pacova kojima je DT1 indukovano davanjem pojedinačne doze streptozotocina redukovalo hiperglikemiju i poboljšalo metabolizam glukoze, dok je primena inhibitora HO-1 poništila anti-dijabetogene efekte ovog enzima (Ndisang i Jadhav, 2009). Primena hemina povećala je nivo insulina u plazmi i potencirala molekule uključene u osetljivost na insulina i u signalni put pokrenut insulinom, kao što su adiponektin, adenzin-monofosfat protein kinaza, ciklični adenzin-monofosfat, ciklični guanozin-monofosfat i GLUT4. Poremećaji u funkcionisanju β ćelija mogu nastati zbog infiltrisanja imunskih ćelija u pankreasna ostrvca i lokalnog oslobađanja citokina. Pokazano je da *in vitro* izlaganje β ćelija pankreasa citokinima IL-1 β ili IL-1 β zajedno sa IFN- γ dovodi do funkcionalnih promena β ćelija koje su slične promenama primećenim kod predijabetičnih osoba (Hostens i sar, 1999) i do gubitka sekrecije insulina u odgovoru na

glukozu. Naime, IL-1 β dovodi do smanjenja usidranja i fuzije insulinskih granula sa ćelijskom membranom β ćelija, usled čega je smanjena egzocitoza granula (Ohara-Imaizumi i sar, 2004). Tretman pankreasnih ostrvaca izolovanih iz C57BL/6 miševa kombinacijom citokina IL-1 β +IFN- γ +TNF smanjio je sekreciju insulina, dok je istovremena primena donora koji oslobađa CO sa citotoksičnim koktelom citokina povećala sekreciju insulina. Ovi rezultati se podudaraju sa rezultatima studije u kojoj je oslobađanje insulina bilo stimulirano izlaganjem izolovanih pankreasnih ostrvaca egzogenom CO ili heminu, koji indukcijom enzima HO-1 dovodi do oslobađanja CO (Henningsson i sar, 1999).

Osim funkcionalnih promena, tokom DT1 dolazi i do smrti β ćelija izloženim produženom delovanju citokina IL-1 β , IFN- γ i TNF (Eizirik i Mandrup-Poulsen, 2001). Direktni efekti CORM-A1 na β ćelije u uslovima koji postoje tokom patogeneze bolesti ispitani su *in vitro* simulacijom u prisustvu pro-inflamatornih citokina. Tretman CORM-A1 očuvao je vijabilitet i spasio β ćelije od apoptoze indukovane pro-inflamatornim citokinima, što je bilo u skladu sa literaturnim podacima. Naime, prekomerna ekspresija enzima HO-1 u ćelijama insulinoma β TC3 zaštitila je ćelije od apoptoze indukovane citokinom TNF (Pileggi i sar, 2001). Međutim, anti-apoptotski efekti HO-1 bili su suprimirani kada je aktivnost HO-1 blokirana primenom kalaj protoporfirina IX (SnPPIX), dok je istovremena primena SnPPIX i izlaganje ćelija insulinoma ili pankreasnih ostrvaca gasovitom CO, sprečila apoptozu izazvanu primenom TNF (Günther i sar, 2002). Primena inaktivne forme jedinjenja iCORM-A1, koja nema mogućnost oslobađanja CO, ili Hgb, koji funkcioniše kao hvatač CO i na taj način neutrališe njegovo dejstvo, u našem sistemu nije zaštitila ostrvca i ćelije insulinoma od citotoksičnog dejstva pro-inflamatornih citokina, što ukazuje da anti-apoptotski efekti CORM-A1 zavise od CO.

Anti-apoptotski efekti HO-1/CO sistema pokazani su i u studiji u kojoj su endotelne ćelije prekomerno ekspimirale HO-1 ili su bile izložene gasovitom CO, a apoptoza indukovana citokinom TNF (Brouard i sar, 2000). Mehanizmi zaštite HO-1/CO u ovom model sistemu uključivali su povećanu aktivaciju p38 MAPK i NF κ B (Brouard i sar, 2002). Međutim, u našoj studiji tretman CORM-A1 u *in vitro* modelu nije stimulisao aktivaciju p38 i JNK MAPK signalnog puta, kao ni i NF κ B, niti je

potencirao aktivaciju ovih molekula posredovanu pro-inflamatornim citokinima u pankreasnim ostrvcima. Pokazano je da su mehanizmi anti-apoptotskog dejstva CO sistema tkivno specifični. Naime, u monocitima (Otterbein i sar, 2000) i endotelnim ćelijama (Brouard i sar, 2000) efekti CO uključuju signalni put p38 MAPK sistema, dok u fibroblastima (Petrache i sar, 2000), β ćelijama pankreasa (Günther i sar, 2002) i glatkim mišićnim ćelijama (Liu i sar, 2002) anti-apoptotski efekti CO nezavisni su od puta p38 kinaze i zavise od solubilne guanil ciklaze i nivoa cikličnog guanozin-monofosfata.

Kako oslobađanje citohroma c iz mitohondrija ima centralnu ulogu u unutrašnjem putu apoptoze (Hüttemann i sar, 2011), ispitivano je da li CORM-A1 regulacijom količine ovog molekula ostvaruje uočene zaštitne efekte na nivou izolovanih pankreasnih ostrvaca. U našem sistemu primena donora CO sprečila je povećanje količine citohroma c izazvano citokinima. Citosolna funkcija citohroma c je da pomoću proteina APAF aktivira kaspazu-9, koja dalje aktivira nizvodne kaspaze-3, -6 i -7. Kao posledica kaskadne aktivacije kaspaza dolazi do morfoloških i biohemijskih promena i apoptoze ćelija (Kang i sar, 2009). Smanjeno oslobađanje citohroma c i aktivacija kaspaze-3 pokazani su u radu Zhao i saradnika (Zhao i sar, 2014) gde je primena donora CORM-2 smanjila apoptozu mišićnih ćelija srca indukovanu ishemijskom/reperfuzijom. U skladu sa literaturnim podacima, smanjena količina citohroma c u pankreasnim ostrvcima nakon tretmana CORM-A1 rezultovala je smanjenom aktivnošću kaspaze-3. Na osnovu ovih rezultati može se zaključiti da anti-apoptotski efekat CO u pankreasnim ostrvcima uključuje smanjenu aktivaciju mitohondrijskog puta apoptoze.

Osobe kojima je dijagnostikovana DT1 zahtevaju doživotnu terapiju egzogenim insulinom i imaju rizik od brojnih komplikacija koje uključuju srčane bolesti, otkazivanje bubrega i slepilo. Iako se tehnike transplantacije pankreasnih ostrvaca stalno usavršavaju, ovaj način lečenja bolesti i dalje je komplikovan jer zahteva dugotrajnu imunosupresiju i ne dovodi do eliminacije bolesti. I pored napora da se trenutnim terapijama poboljša kontrola nivoa glukoze u krvi i smanji rizik od mogućih komplikacija koje ova bolest sa sobom nosi, i dalje je neophodno razviti strategiju u

lečenju koja bi ograničila ili zaustavila proces bolesti. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da bi kontrolisano oslobađanje CO od strane CORM-A1 moglo predstavljati koristan terapijski pristup za tretman DT1, jer svojim imunomodulatornim karakteristikama štiti od razvoja inflamacije, a citoprotektivne osobine CO sprečavaju oštećenje β ćelija pankreasa. Imajući u vidu složenu etiologiju bolesti i nedostatke rane dijagnostike DT1, jer se klinički simptomi bolesti kod ljudi javljaju kada je 80-90% β ćelija ubijeno, terapijska primena CORM-A1 u kasnijim fazama bolesti protektivno deluje na razvoj DT1.

6. Zaključci

Kontrolisanim otpuštanjem ugljen-monoksida, čiji je terapijski efekat pokazan u pojedinim eksperimentalnim autoimunskim i inflamatornim bolestima, CORM-A1 može modifikovati i razvoj inflamacije pankreasnih ostrvaca posredovanog T limfocitima i sledstveni razvoj autoimuskog dijabetesa. Direktnim delovanjem na β ćelije pankreasa CORM-A1 štiti ove ćelije od apoptoze, dok dejstvom na ćelije imunskog sistema kontroliše predijabetični M1/Th1/Th17 imunski odgovor pomerajući ga u smeru zaštitnog M2/Th2/Treg tipa i sprečavajući invaziju patogenih imunskih ćelija u ciljno tkivo.

Zaključak je izveden na osnovu sledećih rezultata:

- CORM-A1 u *in vitro* uslovima favorizuje diferencijaciju Th2 ćelija ćelija limfnog čvora miševa C57BL/6 soja, a smanjuje diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija, dok ne utiče na preživljavanje, aktivaciju i proliferaciju T limfocita. Svoje dejstvo na razvoj Th17 ćelija ostvaruje smanjenjem ekspresije transkripcionog faktora ROR γ T, dok ne menja ekspresiju faktora od kojih zavisi diferencijacija Th1 i Th2 ćelija.
- Primena CORM-A1 u ranom ili kasnom profilaktičkom, kao i terapijskom režimu u modelu DT1 izazvanom davanjem VMDS održava normalnu sekreciju insulina i sprečava pojavu kliničkih i histoloških manifestacija bolesti.
- Rani profilaktički režim CORM-A1 inhibira pro-inflamatorni odgovor posredovan M1 makrofagima i Th1 ćelijama i favorizuje anti-inflamatorni Th2 odgovor. Pored smanjene sekrecije pro-inflamatornih citokina na sistemskom nivou, davanje CORM-A1 smanjuje procenat M1 makrofaga i produkciju pro-inflamatornih medijatora u peritoneumu i Th1/Th17 odgovor u slezini. Istovremeno, tretman donorem CO povećava Th2 odgovor u pankreasnim drenirajućim limfnim čvorovima. Na nivou ciljnog tkiva, pankreasa, davanje CORM-A1 pomera balans Th1/Th2 ćelija ka anti-dijabetogenom Th2 odgovoru.
- Preživljavanje pankreasnih ostrvaca i β ćelija *in vitro* tretiranih citokinima TNF+IL-1 β +IFN- γ povećano je u prisustvu donora CO, koji svoje dejstvo

ispoljava smanjenjem količine pro-apoptotskog citohroma c i aktivacije kaspaze-3. Zaštitini efekti praćeni su očuvanjem sekrecije insulina.

Iz svega izloženog može se zaključiti da CORM-A1, sintetsko jedinjenje koje oslobađa CO na kontrolisani način, predstavlja obećavajućeg kandidata za farmakološku modulaciju autoimunskih oboljenja, kao što je dijabetes tipa 1.

7. Literatura

1. Akira S, Misawa T, Satoh T, Saitoh T. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 10–18.
2. Alanärä T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomäki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scand J Rheumatol* 2010; 39: 118–126.
3. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 220–228.
4. Arnush M, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB, Corbett JA. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1998; 160: 2684–2691.
5. Au-Yeung BB, Fowell DJ. A key role for Itk in both IFN γ and IL-4 production by NKT cells. *J Immunol* 2007; 179: 111–119.
6. Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002; 2: 381–392.
7. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 2001; 414: 788–791.
8. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 474–482.
9. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 3299–3306.
10. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; 464: 1293–1300.

11. Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, Shugar D, Snyder SH. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 2003; 40: 129–137.
12. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2: 1279–1283.
13. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 725–731.
14. Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NFκB to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-α-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 17950–17961.
15. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015–1026.
16. Calderon B, Carrero JA, Unanue ER. The central role of antigen presentation in islets of Langerhans in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* 2014; 26: 32–40.
17. Calderon B, Unanue ER. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 119–128.
18. Chen P, Sun B, Chen H, Wang G, Pan S, Kong R, Bai X, Wang S. Effects of carbon monoxide releasing molecule-liberated CO on severe acute pancreatitis in rats. *Cytokine* 2010; 49: 15–23.
19. Chen Z, Herman AE, Matos M, Mathis D, Benoist C. Where CD4⁺CD25⁺ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2005; 202: 1387–1397.
20. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007; 19: 400–408.

21. Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, Lee LY, Sobel RA, Steinman L, Soares MP. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest* 2007; 117: 438–447.
22. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; 54: 97–107.
23. Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol* 2004; 20: 316–321.
24. Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatr Diabetes* 2013; 14: 149–158.
25. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 2011; 45: 131–140.
26. Degli Esposti M, Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 455–461.
27. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 672–686.
28. Eisenstein EM, Williams CB. The T_{reg} /Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res* 2009; 65: 26R–31R.
29. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 219–226.
30. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated β -cell apoptosis. *Diabetologia* 2001; 44: 2115–2133.

31. Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapoport M, Lohse AW, Cohen IR. Autoimmune diabetes induced by the β -cell toxin STZ. Immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin. *Diabetes* 1994; 43: 992–928.
32. Elliott JI, Dewchand H, Altmann DM. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking $\alpha\beta$ T cells. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 116–120.
33. Espinoza-Jiménez A, Peón AN, Terrazas LI. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 815953.
34. Espinoza-Jiménez A, Rivera-Montoya I, Cárdenas-Arreola R, Morán L, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 850541.
35. Fagone P, Mangano K, Coco M, Perciavale V, Garotta G, Romao CC, Nicoletti F. Therapeutic potential of carbon monoxide in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 179–187.
36. Fagone P, Mangano K, Quattrocchi C, Motterlini R, Di Marco R, Magro G, Penacho N, Romao CC, Nicoletti F. Prevention of clinical and histological signs of proteolipid protein (PLP)-induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice by the water-soluble carbon monoxide-releasing molecule (CORM)-A1. *Clin Exp Immunol* 2011; 163: 368–374.
37. Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intens Care Med* 2008; 34: 649–658.
38. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 2012; 111: 1198–1207.
39. Gerber DJ, Azuara V, Levraud JP, Huang SY, Lembezat MP, Pereira P. IL-4-producing $\gamma\delta$ T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J Immunol* 1999; 163: 3076–3082.
40. Gessner A, Mohrs K, Mohrs M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* 2005; 174: 1063–1072.

41. Gladiator A, LeibundGut-Landmann S. Innate lymphoid cells: new players in IL-17-mediated antifungal immunity. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003763.
42. Gullotta F, di Masi A, Ascenzi P. Carbon monoxide: an unusual drug. *IUBMB Life* 2012; 64: 378–386.
43. Günther L, Berberat PO, Haga M, Brouard S, Smith RN, Soares MP, Bach FH, Tobiasch E. Carbon monoxide protects pancreatic β -cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation. *Diabetes* 2002; 51: 994–999.
44. Haskins K, Cooke A. CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 739–745.
45. Hedrich CM, Bream JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol Res* 2010; 47: 185–206.
46. Henningsson R, Alm P, Ekström P, Lundquist I. Heme oxygenase and carbon monoxide: regulatory roles in islet hormone release: a biochemical, immunohistochemical, and confocal microscopic study. *Diabetes* 1999; 48: 66–76.
47. Herold KC, Vignali DA, Cooke A, Bluestone JA. Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 243–256.
48. Hoetzel A, Schmidt R, Vallbracht S, Goebel U, Dolinay T, Kim HP, Ifedigbo E, Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide prevents ventilator-induced lung injury *via* caveolin-1. *Crit Care Med* 2009; 37: 1708–1715.
49. Höglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med* 1999; 189: 331–339.
50. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T, Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 2010; 185: 1959–1967.

51. Hostens K, Pavlovic D, Zambre Y, Ling Z, Van Schravendijk C, Eizirik DL, Pipeleers DG. Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *J Clin Invest* 1999; 104: 67–72.
52. Hu CM, Lin HH, Chiang MT, Chang PF, Chau LY. Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2007; 56: 1240–1247.
53. Huang SH, Chu CH, Yu JC, Chuang WC, Lin GJ, Chen PL, Chou FC, Chau LY, Sytwu HK. Transgenic expression of haem oxygenase-1 in pancreatic β cells protects non-obese mice used as a model of diabetes from autoimmune destruction and prolongs graft survival following islet transplantation. *Diabetologia* 2010; 53: 2389–2400.
54. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 2011; 11: 369–381.
55. Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002; 34: 138–147.
56. Jaïdane H, Hober D. Role of coxsackie virus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2008; 34: 537–548.
57. Jiang S, Dong C. A complex issue on CD4⁺ T-cell subsets. *Immunol Rev* 2013; 252: 5–11.
58. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1126–1132.
59. Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol* 2004; 165: 1045–1053.

60. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185–1188.
61. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol* 2003; 56: 1–10.
62. Khodoun MV, Orekhova T, Potter C, Morris S, Finkelman FD. Basophils initiate IL-4 production during a memory T-dependent response. *J Exp Med* 2004; 200: 857–870.
63. Kim HS, Lee MS. Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes. *Curr Mol Med* 2009; 9: 30–44.
64. Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res* 2005; 64: 180–188.
65. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: 125–136.
66. Kolb-Bachofen V, Epstein S, Kiesel U, Kolb H. Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 1988; 37: 21–27.
67. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. *Nature* 2007; 448: 484–487.
68. Kornete M, Mason ES, Piccirillo CA. Immune Regulation in T1D and T2D: Prospective Role of FoxP3⁺ Treg Cells in Disease Pathogenesis and Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 76.
69. Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, Purcell AW, Brooks AG, Gellert S, Colman PG, Harrison LC, Lew AM, Thomas HE, Kay TW. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest* 2006; 116: 3258–3265.

70. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99–163.
71. Lee SJ, Ryter SW, Xu JF, Nakahira K, Kim HP, Choi AM, Kim YS. Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 867–873.
72. Lehuen A, Julien Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 501–513.
73. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable β -cell. *Biochem Soc Trans* 2008a; 36: 343–347.
74. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008b; 51: 216–226.
75. Li M, Song LJ, Qin XY. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J Cell Mol Med* 2014; 18: 749–758.
76. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; 38: 13–25.
77. Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Oxidative stress and β cell dysfunction. *Methods Mol Biol* 2012; 900: 347–362.
78. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193: 415–417.
79. Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15: 36–42.
80. Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 396–405.
81. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.

82. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol* 1998; 6: 119–128.
83. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 481–497.
84. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 71–105.
85. Mathis D, Vence L, Benoist C. β -Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414: 792–798.
86. Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 636–643.
87. Mellanby RJ, Thomas D, Phillips JM, Cooke A. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatory T cells. *Immunology* 2007; 121: 15–28.
88. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamisi M, Wei X, Lukic ML. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. *Eur J Immunol* 2006; 36: 216–223.
89. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1978; 1: 57–60.
90. Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, Otterbein SL, Otterbein LE, Choi AM. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 2003; 278: 36993–36998.
91. Motterlini R, Foresti R. Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 1810–1826.
92. Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, Clark JE, Foresti R, Green CJ Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2525–2539.

93. Motterlini R, Sawle P, Hammad J, Bains S, Alberto R, Foresti R, Green CJ. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB J* 2005; 19: 284–286.
94. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 2002; 205: 35–50.
95. Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F, Bach FH, Billiar TR, Choi AM, Otterbein LE, Murase N. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005; 5: 282–291.
96. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005; 435: 220–223.
97. Ndisang JF, Jadhav A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E829–841.
98. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013; 4:1–13.
99. Ohara-Imaizumi M, Cardozo AK, Kikuta T, Eizirik DL, Nagamatsu S. The cytokine interleukin-1 β reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 41271–41274.
100. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422–428.

101. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1281: 16–35.
102. Parsa R, Andresen P, Gillett A, Mia S, Zhang XM, Mayans S, Holmberg D, Harris RA. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2012; 61: 2881–2892.
103. Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L312–319.
104. Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, De La Peña H, Cooke A. Type 1 diabetes development requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *Rev Diabet Stud* 2009; 6: 97–103.
105. Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, Richter L, Köhler G, Richter T, Eschke M, Alber G, Müller U. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *Am J Pathol* 2011;179: 733–744.
106. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 52–61.
107. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved *in vivo* function after transplantation. *Diabetes* 2001; 50: 1983–1991.
108. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52: 156–165.
109. Qin W, Zhang J, Lv W, Wang X, Sun B. Effect of carbon monoxide-releasing molecules II-liberated CO on suppressing inflammatory response in sepsis by interfering with nuclear factor κ B activation. *PLoS One* 2013; 8: e75840.

110. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1139–1149.
111. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4: 291–299.
112. Rautajoki KJ, Kylaniemi MK, Raghav SK, Rao K, Lahesmaa R. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med* 2008; 40: 322–335.
113. Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S, Gregoire M, Bach JM, Anegon I, Chauveau C. Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol* 2009; 182: 1877–1884.
114. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 897–907.
115. Rodella L, Lamon BD, Rezzani R, Sangras B, Goodman AI, Falck JR, Abraham NG. Carbon monoxide and biliverdin prevent endothelial cell sloughing in rats with type I diabetes. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 2198–2205.
116. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86: 583–650.
117. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune response? *Int Immunol* 2009; 21: 1105–1111.
118. Saldeen J, Lee JC, Welsh N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1561–1569.
119. Sandouka A, Fuller BJ, Mann BE, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Treatment with CO-RMs during cold storage improves renal function at reperfusion. *Kidney Int* 2006; 69: 239–247.

120. Sheikh SZ, Hegazi RA, Kobayashi T, Onyiah JC, Russo SM, Matsuoka K, Sepulveda AR, Li F, Otterbein LE, Plevy SE. An anti-inflammatory role for carbon monoxide and heme oxygenase-1 in chronic Th2-mediated murine colitis. *J Immunol* 2011; 186: 5506–5513.
121. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1338–1349.
122. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 308–317.
123. Simon T, Pogu S, Tardif V, Rigaud K, Rémy S, Piaggio E, Bach JM, Anegon I, Blancou P. Carbon monoxide-treated dendritic cells decrease β 1-integrin induction on CD8+ T cells and protect from type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 2013; 43: 209–218.
124. Singh B, Nikoopour E, Huszarik K, Elliott JF, Jevnikar AM. Immunomodulation and regeneration of islet β cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31: 711–719.
125. Song R, Mahidhara RS, Liu F, Ning W, Otterbein LE, Choi AM. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 603–610.
126. Song WJ, Shah R, Hussain MA. The use of animal models to study stem cell therapies for diabetes mellitus. *ILAR J* 2009; 51: 74–81.
127. Srisook K, Han SS, Choi HS, Li MH, Ueda H, Kim C, Cha YN. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O^{2-} and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 307–318.
128. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 189–200.

129. Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *Int J Exp Diabetes Res* 2001; 2: 3–17.
130. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 537–546.
131. Takagi T, Naito Y, Inoue M, Akagiri S, Mizushima K, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Inhalation of carbon monoxide ameliorates collagen-induced arthritis in mice and regulates the articular expression of IL-1 β and MCP-1. *Inflammation* 2009; 32: 83–88.
132. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 447: 661–678.
133. Vahedi G, C Poholek A, Hand TW, Laurence A, Kanno Y, O'Shea JJ, Hirahara K. Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunol Rev* 2013; 252: 24–40.
134. Von Burg R. Carbon monoxide. *J Appl Toxicol* 1999; 19: 379–386.
135. Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD. Dynamic interaction between T cell-mediated β -cell damage and β -cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Genomics* 2005; 21: 201–211.
136. Wang B, André I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D. Interferon- γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13844–13849.

137. Wang Q, Zhang H, Zhao B, Fei H. IL-1 β caused pancreatic β -cells apoptosis is mediated in part by endoplasmic reticulum stress via the induction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biochem* 2009; 324: 183–190.
138. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; 47: 50–56.
139. Wang Z, Xiao L, Shi BY, Qian YY, Bai HW, Chang JY, Cai M. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody treatment and neogenetic CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2008; 19: 69–73.
140. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17040–17045.
141. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 585–630.
142. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 2012; 318: 1213–1220.
143. Yang Y, Santamaria P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 627–639.
144. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; 300: 1173–1179.
145. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic β cells. *Am J Ther* 2005; 12: 580–591.
146. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 2013; 21: 501–515.

147. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
148. Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012; 19: 271–278.
149. Zhang Y, Zhang L, Wu J, Di C, Xia Z. Heme oxygenase-1 exerts a protective role in ovalbumin-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 cell-mediated immune response. *J Biol Chem* 2013; 288: 34612–34626.
150. Zhao S, Lin Q, Li H, He Y, Fang X, Chen F, Chen C, Huang Z. Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuated ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiomyocytes via a mitochondrial pathway. *Mol Med Rep* 2014; 9: 754–762.
151. Zheng D, Wang Y, Cao Q, Lee VW, Zheng G, Sun Y, Tan TK, Wang Y, Alexander SI, Harris DC. Transfused macrophages ameliorate pancreatic and renal injury in murine diabetes mellitus. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 118: e87–99.
152. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587–596.
153. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 2009; 30: 646–655.
154. Zhu J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 2010; 88: 244–249.
155. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R, Ford HR. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G607–613.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Nikolić rođena je 23. decembra 1986. godine u Zrenjaninu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija. Redovne studije završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,48. Diplomski rad pod naslovom: „Razlika u osetljivosti pankreasnih ostrvaca na tretman citokinima IL-1 β +TNF- α +IFN- γ u *in vitro* uslovima između Gal-3 KO i C57BL/6 soja miševa“ uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, pod neposrednim rukovodstvom dr Tamare Saksida i odbranila ga 1. oktobra 2010. godine sa ocenom 10. Iste godine započela je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Imunobiologija. Od 1. januara 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za imunologiju, a januara 2012. godine stiče zvanje istraživača saradnika. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Tamare Saksida, a u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno radikalnu fiziologiju, Evropske asocijacije za proučavanje dijabetesa (European Association for the Study of Diabetes, EASD), a putem ovih i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Internacionalne unije imunoloških društava (International Union of Immunological Societies, IUIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Ivana Nikolić je tri meseca 2013. godine bila na studijskom usavršavanju na Univerzitetu u Upsali, Upsala, Švedska, kao dobitnica stipendije „Albert Renold Fellowship“ Evropske asocijacije za istraživanje dijabetesa.

Dobitnica je nagrade za najbolju poster prezentaciju na drugom Kongresu „Život sa slobodnim radikalima“ Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno radikalsku fiziologiju održanim u Nišu, 28. septembra 2013. godine.

Ivana Nikolić je do danas učestvovala kao autor/koautor na 11 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, ima 14 saopštenja na međunarodnim i 9 na domaćim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Ивана Николић

број уписа Б3022/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога донора угљен-моноксида CORM-A1 у модулацији експериментално индукованог дијабетеса типа 1 код C57BL/6 мишева

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.06.2014.

Ивана Николић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Ивана Николић _____

Број уписа _____ Б3022/2010 _____

Студијски програм _____ Имунобиологија _____

Наслов рада _____ Улога донора угљен-моноксида CORM-A1 у модулацији
експериментално индукованог дијабетеса типа 1 код C57BL/6 мишева _____

Ментор _____ др Тамара Саксида и др Милена Катарановски _____

Потписана _____ Ивана Николић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.06.2014.

Ивана Николић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Улога донора угљен-моноксида CORM-A1 у модулацији експериментално индукованог дијабетеса типа 1 код C57BL/6 мишева“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.06.2014.

Ђана Николић

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