

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Mr Marjan S. Popović

**ISPITIVANJE TERAPIJSKOG DEJSTVA
ARILPIPERAZINSKIH
DOPAMINERGIČKIH LIGANADA U
MODELU MULTIPLE SKLEROZE KOD
PACOVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

M.Sci Marjan S. Popović

**INVESTIGATION OF THERAPEUTIC
EFFECT OF ARYLPIPERAZINE
DOPAMINERGIC LIGANDS IN THE
MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS IN
RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

Prof.dr Vladimir Trajković

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Prof.dr Aleksandra Isaković

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof.dr Vera Pravica

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof.dr Dušan Popadić

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof.dr Silvana Andrić

redovni profesor, PMF Univerziteta u Novom Sadu

Dr.sci. Miljana Momčilović

viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr.sci. Verica Paunović

naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska teza je urađena u laboratoriji Instituta za Medicinsku i Kliničku biohemiju i laboratoriji Instituta za Mikrobiologiju i Imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof.dr Vladimira Trajkovića. Disertacija je izrađena u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 41025, čiji je rukovodilac prof.dr Vladimir Trajković.

Svom mentoru, prof. dr Vladimiru Trajkoviću, zahvaljujem se na razumevanju i podršci tokom nastanka ove doktorske teze, kao i svih rezultata na kojima se ona zasniva. Njegovi korisni saveti i originalna posvećenost nauci bili su velika inspiracija timskom radu koji je doveo do uspešnog završetka ove teze.

Zahvaljujem se komentoru, prof dr Aleksandri Isaković, koja me je uvela u svet rada sa ćelijama u kulturi, kao i na profesionalnoj i ličnoj podršci tokom svih faza izrade i uobličavanja ove teze, bez koje ona ne bi imala sadašnji kvalitet.

Prof.dr Veri Pravici, prof.dr Dušanu Popadiću, prof. dr Silvani Andrić, dr.sci. Miljani Momčilović, i dr.sci. Verici Paunović na kritičkom čitanju ove teze i svim korisnim savetima zahvaljujući kojim je ona dobila svoj konačan oblik.

Koleginici, dr Željki Stanojević, sa kojom je nastao najveći deo rezultata iz ove doktorske teze, kao i koleginici Jeleni Tošić, zahvaljujem se na saradnji i prijateljskoj podršci koja je rad na ovoj tezi učinila lakšim.

Zahvaljujem se doc. dr Saši Petričeviću na velikoj pomoći tokom eksperimentalnog rada na modelu MS-a predstavljenom u ovoj tezi, kao i tehničarki Branki Veselinović, koja je sa toliko pažnje brinula o našim eksperimentalnim životinjama.

Kolegama asist. dr Tamari Martinović, asist. dr Darku Ćiriću, doc. dr Tamari Kravić-Stevović, dr.sci. Kristini Janjetović, dr.sci. Ljubici Vučićević, dr.sci. Maji Misirkić i asist. dr Emini Savić na pomoći i podršci u radu vezanom za ovaj doktorat, kao i na veseloj atmosferi koja je ovaj rad zaista učinila lepšim.

Koleginici, dr.sci Gordani Tovilović, čiji prethodni rad je bio polazna osnova za ovu tezu, zahvaljujem se na korisnim savetima i diskusijama koje su ovaj rad učinile boljim.

Zahvaljujem se tehničarima Sanji Čabarkapi i Nadi Bojović koje su u velikoj meri olakšale laboratorijski rad.

Prof. dr Ivanki Marković, upravniku našeg instituta, zahvaljujem se na pozitivnom duhu i velikoj posvećenosti da mi, doktoranti, dobijemo najbolje uslove za rad.

Veliku zahvalnost dugujem kolegamicama dr Anđelki Isaković, Msci Maji Jovanović, i dr Mariji Dulović, sa kojima sam delio neposredan prostor za rad svih ovih godina, na svojoj podršci, pomoći i pozitivnoj atmosferi koja je bila podstrek da se prebrode svi profesionalni i privatni izazovi na putu ka ostvarenju ove teze.

Želim da se zahvalim svim kolegama, i prijateljima, koji nisu poimence spomenuti, a koji su na bilo koji način doprineli nastanku ove teza.

Celokupnom kolektivu Instituta za Kliničku i Medicinsku Biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu zahvaljujem se na podršci i podsticajnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se i svim kolegama Odeljenja za Humanu Genetiku i Prenatalnu Dijagnostiku, KBC Zvezdara, a posebno kolegi Msci Žarku Morači, kao i načelnici spec. dr Nataši Miljković na velikoj podršci prilikom izrade ove doktorske teze.

Svojim roditeljima i sestri veliko hvala na bezuslovnom razumevanju i podstreku tokom izrade ove doktorske teze.

Na kraju, svojoj supruzi Jasmini na razumevanju, i podršci da se ova teza dovede do kraja, reći ću samo jedno umesto hiljadu hvala.

Stefanu i Nemanji

Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova

Sažetak

U ovom radu je ispitivano dejstvo dva novosintetisana arilpiperazinska D₂/5-HT_{1A} dopaminergička/serotoninerička liganda, koji ispoljavaju neuroprotektivna svojstva *in vitro*, u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE) kao modelu multiple skleroze kod pacova. Oba jedinjenja, N-{4-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (**6a**) i N-{3-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (**6b**), su u dozi od 10 mg/kg i.p. ispoljila pozitivan efekat na klinički tok EAE-a kod *Dark Agouti* pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine (KM), pri čemu je derivat **6b** ispoljavao nešto izraženiji efekat u odlaganju početka bolesti i snižavanju maksimalne kliničke težine, što je u skladu sa njegovim višim afinitetom za D₂ i 5-HT_{1A} receptore. Povoljan efekat na klinički tok EAE-a se zadržavao ukoliko je tretman vršen tokom efektorske faze bolesti (od 8. dana pa na dalje), ali ne i tokom induktivne faze (od 0. do 7. dana) EAE-a. Arilpiperazini su smanjivali infiltraciju CNS-a inflamatornim ćelijama, kao i ekspresiju iRNK za proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1, i GM-CSF, T_H1 citokin IFN- γ , T_H17 citokin IL-17, kao i za glavne transkripcione faktore T_H1 (T-bet) i T_H17 (ROR γ t) ćelija u tkivu CNS-a ali nisu uticali na ekspresiju proinflamatornih medijatora u infiltratu mononuklearnih ćelija, niti su menjali njegov ćelijski sastav. Tretman arilpiperazinima je smanjio apoptotsku ćelijsku smrt i povećao aktivnost kinaze Akt (engl. *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*), važne u preživljavanju ćelija, i supstrata glavnog inhibitora autofagije mTOR-a (engl. *mammalian target of rapamycin*), p70S6K kinaze (engl. *ribosomal protein S6 kinase*) u CNS-u životinja obolelih od EAE-a. Konačno, u *in vitro* kokultivaciji oligodendrocita i neurona sa stimulisanim T limfocitima, arilpiperazini su ispoljili neuroprotektivan efekat prema oligodendrocitnoj (OLN-93) i neuronskoj (PC12) ćelijskoj liniji, spasavajući ih od normalnih T ćelija aktiviranih mitogenom i encefalitogenih T ćelija stimulisanih mijelin-baznim proteinom, ali nisu uticali na imunomodulatornu aktivnost T limfocita. U zaključku, rezultati ove teze ukazuju na to da arilpiperazinski dopaminergički/serotoninerički ligandi suprimiraju EAE putem direktne

neuroprotekcije i smanjivanjem inflamacije CNS-a, pre nego putem očigledne imunomodulacije, što predstavlja obećavajuću polaznu osnovu za njihova buduća ispitivanja u terapiji neuroinflamacije.

Ključne reči: arilpiperazini, EAE, inflamacija, infiltracija, apoptoza, neuroprotekcija

Naučna oblast: molekularna medicina

Uža naučna oblast: neuroinflamacija

UDK broj:

Investigation of therapeutic effect of arylpiperazine dopaminergic ligands in the model of multiple sclerosis in rats

Abstract

In the present study we investigated the effect of the two newly synthesized arylpiperazine $D_2/5\text{-HT}_{1A}$ dopaminergic/serotonergic ligands, which display neuroprotective properties *in vitro*, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), as an animal model of multiple sclerosis. Both compounds, N-{4-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (**6a**) and N-{3-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (**6b**), at 10 mg/kg i.p, reduced clinical signs of EAE in the spinal cord homogenate-immunized Dark Agouti rats. Compound **6b** had somewhat pronounced effect in delaying the disease onset and reducing the maximal clinical score, which correlated with its higher affinity for D_2 and 5-HT_{1A} receptors. The protection was retained if the treatment was limited to the effector (from day 8 onwards), but not the inductive (day 0-7) phase of EAE. Arylpiperazines reduced CNS immune cell infiltration and expression of mRNA encoding proinflammatory cytokines TNF, IL-6, IL-1, and GM-CSF, T_H1 cytokine IFN- γ , T_H17 cytokine IL-17, as well as the signature transcription factors of T_H1 (T-bet) and T_H17 (ROR γ t) cells in the CNS tissue, arylpiperazines did not affect the expression of mRNA for proinflammatory mediators in mononuclear cell infiltrate, neither they changed its cellular composition. Arylpiperazine treatment reduced apoptotic cell death and increased activation of the prosurvival kinase Akt (v -Akt Murine Thymoma Viral Oncogene) and p70S6K kinase (ribosomal protein S6 kinase), the substrate of the major autophagy inhibitor mTOR (mammalian target of rapamycin), in the CNS of EAE animals. Finally, the *in vitro* treatment with arylpiperazines protected oligodendrocyte cell line OLN-93 and neuronal cell line PC12 from mitogen-activated normal T cells or myelin basic protein-activated encephalitogenic T cells, without exerting immunomodulatory activity. In conclusion, results of this thesis indicate that arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress EAE through a direct neuroprotective action and decrease in CNS

inflammation, rather than through an overt immunomodulation, which is a promising starting point for their future exploration in the therapy of neuroinflammation.

Key words: arylpiperazines, EAE, inflammation, infiltration, apoptosis, neuroprotection

Research area: Molecular medicine

Research field: Neuroinflammation

UDC number:

SADRŽAJ:

1. U V O D.....	1
1.1. MULTIPLA SKLEROZA	1
1.1.1. Etiologija MS-a.....	2
1.1.2. Epidemiologija.....	3
1.1.3. Sredinski faktori.....	3
1.1.4. Genetika.....	3
1.1.5. Kliničke forme MS-a	4
1.1.6. Patohistološke odlike MS-a	5
1.1.7. Imunopatogeneza MS-a	5
1.1.8. Lečenje MS-a.....	8
1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS (EAE)	9
1.2.1. Animalni modeli	9
1.2.2. Indukcija i odlike EAE modela.....	10
1.2.3. Imunopatogeneza EAE-a.....	12
1.2.4. Primenljivost EAE modela	15
1.3. ARILPIPERAZINSKI DOPAMINERGIČKI LIGANDI	17
2. C I L J E V I.....	21
3. M A T E R I J A L I M E T O D E.....	22
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	22
3.2. INDUKCIJA I KLINIČKA PROCENA EAE-a.....	22
3.2.1. Imunizacija životinja	22
3.2.2. Praćenje kliničke slike	23
3.3. TRETMAN ARILPIPERAZINSKIM LIGANDIMA	23
3.4. PRIPREMA ĆELIJSKIH SUSPENZIJA I KULTIVISANJE ĆELIJA	24
3.4.1. Medijumi za pripremu i kultivisanje ćelija.....	24
3.4.2. Izolovanje i određivanje broja ćelija limfnog čvora	24
3.4.3. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine	25

3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE I PROTOČNA CITOFLUORIMETRIJA	25
3.5.1. Detekcija površinskih markera	25
3.5.2. Detekcija unutarćelijskih citokina	27
3.6. ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE GENA	28
3.6.1. Izolovanje RNK	28
3.6.2. Reverzna transkripcija	29
3.6.3. Prajmeri i probe	30
3.6.4. Kvantitativni PCR.....	30
3.7. IMUNOBLOT ANALIZA	31
3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	31
3.7.2. Kvantifikacija ekspresije i fosforilacije proteina.....	32
3.8. HISTOLOŠKA ANALIZA	34
3.9. DETEKCIJA APOPTOZE IN SITU	35
3.10. EKSPERIMENTI KOKULTIVACIJE	35
3.10.1. Kokultivacija ćelijskih linija OLN93 i PC12 sa limfocitima	35
3.10.2. Određivanje ćelijskog vijabiliteta	36
3.11. STATISTIČKE ANALIZE	37
4. R E Z U L T A T I	38
4.1. ISPITIVANJE UTICAJA KONTINUIRANOG TRETMANA ARILPIPERAZINIMA NA KLINIČKE ZNAKE EAE-a.....	38
4.1.1. Ispitivanje znaka akutne toksičnosti i moguće interferencije sa kliničkim znacima EAE-a u tretmanu arilpiperazinima 6a i 6b	38
4.1.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na klinički tok EAE-a u kontinuiranom tretmanu	40
4.1.3. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na promenu telesne mase životinja u EAE-u u kontinuiranom tretmanu.....	42
4.2. UTICAJA TRETMANA ARILPIPERAZINIMA TOKOM INDUKTIVNE I EFEKTORSKE FAZE BOLESTI NA KLINIČKE ZNAKE EAE-a	43
4.2.1. Uticaj arilpiperazina 6b na kliničke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana u induktivnoj fazi bolesti	43

4.2.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na kliničke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana u efektorskoj fazi bolesti.....	44
4.3. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA INFILTRACIJU IMUNSKIH ĆELIJA U CNS U EAE-u.....	45
4.3.1. Uticaj arilpiperazina 6b na infiltraciju imunskih ćelija u CNS u piku EAE-a.....	45
4.3.2. Uticaj arilpiperazina na brojnost mononuklearnih ćelija u CNS-u i drenirajućim limfnim čvorovima u EAE-u.....	47
4.4. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA EKSPRESIJU INFLAMATORNIH MEDIJATORA U CNS-u I INFILTRATU MONONUKLEARNIH ĆELIJA U EAE-u	49
4.4.1. Uticaj arilpiperazina 6b na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u tkivu CNS-a u piku EAE-a.....	49
4.4.2. Uticaj arilpiperazina 6b na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u mononuklearnim ćelijama infiltriranim u CNS u EAE-u	51
4.5. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA ZASTUPLJENOST ĆELIJSKIH POPULACIJA I NJHOVU PROIZVODNJU CITOKINA U INFILTRATU MONONUKLEARNIH ĆELIJA U EAE-u	52
4.5.1. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ i CD11b/c ⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija u piku EAE-a.....	52
4.5.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD4 ⁺ IFN γ ⁺ , CD4 ⁺ IL10 ⁺ i CD4 ⁺ IL17 ⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija u piku EAE-a	54
4.5.3. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD8 ⁺ IFN γ ⁺ i CD8 ⁺ IL10 ⁺ ćelija u okviru infiltrata mononuklearnih ćelija u piku EAE-a	55
4.6. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA APOPTOZU I AKTIVNOST Akt/mTOR SIGNALNOG PUTA U CNS-u U PIKU EAE-a	56
4.6.1. Uticaj arilpiperazina 6b na apoptozu u kičmenoj moždini pacova sa EAE-om	56
4.6.2. Uticaj arilpiperazina 6b na aktivnost Akt/AMPK/mTOR signalnih puteva i PARP u kičmenoj moždini pacova sa EAE-om	58
4.7. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA OŠTEĆENJE NEURONA I OLIGODENDROCITA IZAZVANO T ĆELIJAMA <i>IN VITRO</i> ..	59

4.7.1. Uticaj arilpiperazina 6b na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija kokultivisanih mitogenom-aktiviranim T limfocitima	59
4.7.2. Uticaj arilpiperazina 6b na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija kokultivisanih sa MBP-stimulisanim mononuklearnim ćelijama pacova sa EAE-om	60
4.7.3. Uticaj arilpiperazina 6b na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u mononuklearnim ćelijama stimulisanim mitogenom ili antigenom	62
5. DISKUSIJA	64
6. ZAKLJUČCI	74
7. LITERATURA	75

1. U V O D

1.1. MULTIPLA SKLEROZA

Imunski sistem je odbrambeni sistem koji se tokom evolucije razvio da bi zaštitio organizam od ogromnog broja patogenih vrsta, kao i od različitih patoloških promena koje se dešavaju u ćelijama i telesnim strukturama. U normalnom stanju, naš imunski sistem se nalazi u stanju tolerancije sopstvenog, u kome ne napada normalne strukture svog tela. Ipak, nedostaci ili poremećaji mehanizama koji održavaju toleranciju na sopstveno vode autoimunosti, koja se odlikuje preteranim imunskim odgovorom i nekontrolisanom inflamacijom (Gonsette, 2012).

Najčešće autoimunske bolesti kao što su reumatoidni artritis, multipla skleroza, dijabetes melitus tipa I, sistemski lupus eritematosus, Grejvsova bolest, i druge pogađaju približno 5% ljudske populacije i uglavnom nemaju poznatu etiologiju i zadovoljavajuću terapiju (Marrack i sar., 2001). Za razliku od monogenetskih bolesti koje pokazuju klasično Mendelovo nasleđivanje, gde je uzročnik jedan gen sa velikim fenotipskim efektom, ove bolesti su rezultat složene interakcije između brojnih genskih, sredinskih i stohastičkih faktora (Valdar i sar., 2006).

Multipla skleroza (MS) je hronično, inflamatorno oboljenje centralnog nervnog sistema (CNS) sa verovatnom autoimunskom etiologijom, koje se odlikuje lokalizovanim oblastima inflamacije, demijelinizacije, gubitka aksona i glioze – plakovima, u mozgu i kičmenoj moždini, što dovodi do poremećaja u sprovođenju nervnih impulsa i posledično do ispoljavanja različitih neuroloških deficita. Uprkos intenzivnim proučavanjima uzroci i patogeneza MS-a još uvek su u velikoj meri nepoznati, a dosadašnja istraživanja ukazuju na veliki značaj genetskog nasleđa, epigenetike i sredinskih faktora. Pored više odobrenih lekova koji dovode do

poboljšanja stanja pacijenata, za sada još uvek ne postoji terapija koja bi u potpunosti dovela do izlječenja.

1.1.1. Etiologija MS-a

Na osnovu epidemioloških i genetičkih studija, kao i studija imunopatogeneze MS-a, postavljeno je više teorija kojima se objašnjava nastanak ove bolesti kao što su: 1) autoimunska, 2) infektivna (virusna), i 3) neurodegenerativna (Milo i Kahana, 2010).

1) U prilog teoriji da je MS autoimunska bolest navodi se: prisustvo autoantitela i autoreaktivnih T limfocita u demijelinizacionim žarištima CNS-a (McFarland i Martin, 2007), velika sličnost sa animalnim modelom eksperimentalnim autoimunskim encefalomijelitisom (EAE) koji se indukuje aktivno-imunizacijom mijelinskim antigenima (Ag), ili pasivno-prenošenjem mijelin-autoreaktivnih T limfocita (Constantinescu i sar., 2011), zatim poboljšanje kliničke slike tokom trudnoće- stanja koje se inače odlikuje izvesnom imunosuprimiranošću (Korn-Lubetzki i sar., 1984), kao i povećana učestalost autoimunskih bolesti kod rođaka obolelih od MS-a, što ukazuje na zajedničke bar pojedine genske faktore koji doprinose podložnosti MS-u (Barcellos i sar., 2006).

2) Teoriju da je MS infektivna (virusna) bolest, koju izaziva stalna ili latentna virusna infekcija podržava više autora sledećim argumentima: modelom encefalomijelitisa izazvanim Tajlerovim virusom (Johnson i sar., 2014), i visokom koncentracijom IgG u cerebrospinalnoj tečnosti, koji mogu biti usmereni protiv virusnih antigena (Gilden, 2005).

3) Teorija o MS-u kao neurodegenerativnoj bolesti je zasnovana na propadanju i gubitku aksona i neurodegeneraciji što vodi ka nepovratno smanjenoj pokretljivosti obolelih od MS-a (Vartanian, 2008).

1.1.2. Epidemiologija

Procenjuje se da je ukupan broj ljudi obolelih od MS-a širom sveta oko 2,5 miliona, sa neujednačenom geografskom rasprostranjenošću, od vrlo retke u tropskim krajevima i Aziji, do mnogo veće učestalosti u „zapadnom svetu“- Severne Evrope, Severne Amerike i delova Australije (Melcon i sar., 2014). MS pogađa uglavnom mlađe ljude, sa pojavom prvih znaka bolesti obično između 20. i 50. godine starosti, iako se bolest može razviti kako u detinjstvu tako i posle 60. godine. U pogledu polne distribucije, bolest se oko tri puta češće javlja kod žena nego kod muškaraca (Milo i Kahana, 2010).

1.1.3. Sredinski faktori

Od sredinskih faktora uključenih u etiologiju MS-a ističu se infektivni agensi, posebno tokom ranog detinjstva i najveći poznati faktor rizika za MS je infekcija Epštajn-Bar virusom (EBV), mada se kao značajni pominju i herpes-simpleks virus (HSV) i retrovirusi (Ascherio, 2013; Kakalacheva i Lünemann, 2011) . Iako je veliki broj studija pokušavao da na nedvosmislen način dovede u vezu različite infektivne agense (viruse, bakterije, helminte) sa razvićem MS-a, za sada, za mnoge od njih nema ubedljivih dokaza koji bi bili konzistentni u različitim populacijama (Kakalacheva i Lünemann, 2011). Pored različitih infekcija kao faktora spoljašnje sredine u pretpostavljenoj etiologiji MS-a kao značajni ističu se smanjena izloženost sunčevoj svetlosti i ultraljubičastom zračenju, nedostatak vitamina D, pušenje i gojaznost (Ascherio i Munger, 2007; Hedström i sar., 2012).

1.1.4. Genetika

Brojne genetičke studije su pokazale veću učestalost MS u pojedinim porodicama, kao i povećan rizik od obolevanja među rođacima obolelih (Ebers i sar., 1995). Monozigotni blizanci pokazuju 25-30% verovatnoće da oboje obole od MS-a, dok je kod dizigotnih blizanaca taj rizik daleko manji- 2-5% (Sadovnick i sar., 1993).

Smatra se da se u genetskoj osnovi kompleksnih bolesti, kakva je i MS, nalazi veliki broj gena sa malim do umerenim efektom, pa tek kada nastane određena kombinacija takvih gena, uz pogodne sredinske i stohastičke faktore, kao i epistatičke interakcije gena, dostiže se i prevazilazi kritični prag osetljivosti i dolazi do razvića bolesti (Haegert, 2003). Glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex*, MHC) je bio prvi otkriveni lokus koji doprinosi povećanom riziku od razvića MS-a, pri čemu HLA-DRB1*1501 alel u okviru haplotipa doprinosi trostrukom povećanju rizika, pa se i danas region glavnog kompleksa histokompatibilnosti smatra najvažnijim pojedinačnim lokusom rizika za MS (Sawcer i sar., 2011). Od tada je otkriven veći broj gena koji doprinose osetljivosti na nastanak MS-a, kao što su: IL-7R, IL-2RA, CD58, RPL5, CLEC16A, KIF21B, TMEM39A, kao i veći broj gena kandidata čija potvrda se tek očekuje (TNFRSF1A, IRF8, CD6, TYK2, CD226, CYB27B1, PRKCA, KIF1B)(Weber i sar., 2008; Rubio i sar., 2007; Hoppenbrouwers i sar., 2009; IMMSGC 2010; Ban i sar., 2009; De Jager i sar., 2009; Barton i sar., 2004; Aulchenko i sar., 2008; Hafler i sar., 2009). Do sada otkriveni lokusi koji doprinose riziku od nastanka MS-a objašnjavaju samo četvrtinu (~27%) ukupne naslednosti ove bolesti, od koje se većina pripisuje MHC lokusu, što je dovelo do nastanka termina označenog kao „naslednost koja nedostaje“ (engl. *missing heritability*) (Manolio i sar., 2009).

1.1.5. Kliničke forme MS-a

MS je heterogena bolest kako u pogledu histopatoloških karakteristika tako i u odnosu na kliničke manifestacije bolesti (Lassmann i sar., 2001). Ključna odlika ove bolesti jeste rasprostiranje lezija u CNS-u sa njenim napredovanjem. Iako je klinički tok bolesti veoma varijabilan, mogu se razlikovati četiri tipa bolesti (Milo i Miller, 2014):

- 1) Relapsno-remitentna MS (RRMS) koja se odlikuje jasnim napadima novih ili postojećih neuroloških simptoma, sa delimičnim ili potpunim oporavkom između relapsa. Oko 80-85% MS pacijenata pripada ovoj grupi.
- 2) Primarno-progresivna MS (PPMS). Ovaj oblik bolesti napreduje od početka pojave prvih kliničkih znakova sa privremenim manjim poboljšanjima. Oko 10-15% MS pacijenata pripada ovoj grupi.

- 3) Sekundarno-progresivna MS (SPMS). U ovom obliku bolesti početno relapsno-remitentna bolest prelazi u napredujuću sa ili bez manjih poboljšanja. Oko 50% RRMS pacijenata pređe u SPMS tip MS-a posle 10 godina.
- 4) Progresivno-relapsna MS (PRMS) predstavlja progresivnu bolest od početka, sa jasnim akutnim relapsima, pri čemu se periodi između relapsa odlikuju stalnim napretkom bolesti. Ovaj tip MS-a može predstavljati podtip PPMS-a.

1.1.6. Patohistološke odlike MS-a

Osnovna odlika MS-a su demijelinizaciona žarišta- plakovi, koji se mogu nalaziti bilo gde u CNS-u, ali se ipak češće javljaju u pojedinim regionima, kao što su: optički nervi, periventrikularna bela masa, kičmena moždina i moždano stablo (Frohman i sar., 2006). Plakovi se odlikuju perivaskularnim infiltratima mononuklearnih inflamatornih ćelija (T limfociti, monociti/makrofagi, neutrofilni, B ćelije, plazmociti), demijelinizovanim i/ili prekinutim aksonima, smanjenim brojem oligodendrocita, astrocitima koji proliferišu i posledičnom gliozom. Demijelinizacija aksona remeti provođenje akcionog potencijala, dovodeći do redistribucije Na⁺ kanala iz Ranvijerovih suženja, da bi se delimična kondukcija ipak održala, što povećava potrebe za energijom (ATP) i opterećuje mitohondrijalnu mašineriju (Waxman, 2006; Dutta i sar, 2006). Plakovi se postepeno uvećavaju i šire, a prisutan je i intersticijalni edem, što ukazuje na narušavanje krvno-moždane barijere (KMB) (Minagar i Alexander, 2003). Oligodendrociti su očuvani na ivicama plaka, ili se čak nalaze u povećanom broju što ukazuje na proces remijelinizacije (Frohman i sar., 2006). Imunoglobulini vezani za mijelin igraju važnu ulogu u demijelinizaciji olakšavajući fagocitozu mijelina od strane makrofaga i lizu posredovanu sistemom komplementa.

1.1.7. Imunopatogeneza MS-a

Jaka povezanost između podložnosti MS-u i HLA-II regiona, koja je pokazana još sedamdesetih godina 20. veka, ukazala je na primarnu ulogu CD4⁺ T ćelija u patogenezi MS-a (Jersild i sar., 1972). Iako CD4⁺ T ćelije imaju veći patogeni potencijal

od CD8⁺ T ćelija (Anderson i sar., 2012), CD8⁺ T ćelije su brojnije u moždanim lezijama obolelih od MS-a (Babbe i sar., 2000). CD8⁺ T ćelije specifične za mijelin bazni protein (MBP) su izolovane iz obolelih od MS-a i pokazano je da sekretuju proinflamatorne citokine IFN- γ i TNF- α , kao i da ubijaju sveže izolovane humane oligodendrocite (Jurewicz i sar., 1998). Sa ciljem da se utvrdi relativni doprinos T-ćelijske reaktivnosti prema različitim mijelinskim antigenima u studiji koja je analizirala proliferativni odgovor T ćelija obolelih od MS-a prema visoko prečišćenom nativnom MBP-u, proteolipidnom proteinu (PLP), mijelin vezanom glikoproteinu (MAG) i mijelin oligodendrocitnom glikoproteinu (MOG), rezultati su pokazali predominantnu reaktivnost T ćelija prema MOG-u (Kerlero de Rosbo i sar., 1993).

Otkriće IL-17 kao jednog od ključnih citokina u nastanku MS-a ukazalo je na nove mehanizame nastanka inflamacije CNS-a (Gold i Lühder, 2008). Pored brojnih CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija koje proizvode IL-17 u aktivnim lezijama MS-a, a što ukazuje na njihovu ulogu u stvaranju lezija, ekspresija iRNK za IL-17 je otkrivena i kod astrocita i oligodendrocita u aktivnim lezijama obolelih od MS-a (Tzartos i sar., 2008).

Smatra se da je inflamacija CNS-a u MS-u primarno indukovana aktiviranim T ćelijama specifičnim za mijelin, što je bilo osnova za razvoj različitih lekova, ali je njihova primena ograničena relativno velikim brojem pacijenata koji na njih ne reaguju. To je ukazivalo na dodatne mehanizme koji doprinose nastanku bolesti, kao što su na primer prisustvo B ćelija, kao i plazma ćelija i antitela u lezijama CNS-a i cerebrospinalnoj tečnosti (CST) obolelih od MS-a (Prineas i Wright, 1978). Oligoklonalne IgG trake antitela koja se mogu detektovati u CST se smatraju važnim obeležjem MS-a koje se koristilo u dijagnozi MS-a (Link i Laurenzi, 1979). Više studija je pokazalo prisustvo autoantitela specifičnih za mijelinske proteine kao što su MOG, MBP, PLP, MAG u serumu obolelih od MS-a (Berger i sar., 2003; Cross i sar., 2001). Značaj B ćelija u patogenezi MS-a dodatno je istaknut istraživanjima koja su pokazala da uklanjanje B ćelija kod relapsno-remitentnih MS pacijenata upotrebom anti-CD-20 antitela smanjuje broj relapsa i lezija (Hauser i sar., 2008). Iako su mijelinski antigeni primarne mete humoralnog autoimunskog odgovora u MS-u, brojne studije pokazuju da su autoantitela usmerena ka antigenima gotovo svih ćelija CNS-a, uključujući neurone,

oligodendrocite, astrocite pa čak i infiltrirane imunske ćelije (Fraussen i sar., 2014). Na značaj autoantitela u nastanku plakova je ukazano njihovim uklanjanjem terapijskom zamenom plazme što je pokazalo povoljan efekat na klinički tok bolesti u podgrupi pacijenata (Keegan i sar., 2005). Progresivna priroda bolesti odlikuje se nagomilavanjem plakova, tj. regiona u kojima nestaje mijelinski omotač, i/ili dolazi do gubitka aksonskih završetaka, poremećajima vida i koordinacije, kretanja, usled čega se javlja potpuna nepokretnost i vezanost za invalidska kolica, odsustvo kontrole defekacije i pražnjenja mokraćne bešike, kao i poremećaji u kognitivnim i memorijskim sposobnostima obolelih od MS-a (Milo i Miller, 2014).

MS verovatno započinje aktivacijom autoreaktivnih CD4⁺ pomoćničkih Th limfocita, specifičnih za sopstvene antigene CNS-a na periferiji (Ellwardt i Zipp, 2014). Ove T ćelije se mogu diferencirati u Th1 (proizvode interferon-gama - IFN- γ), Th17 ćelije (IL-17, IL-21, IL-22), ili ćelije koje proizvode obe grupe citokina (McFarland i Martin, 2007). Aktivirani limfociti povećavaju ekspresiju površinskih adhezivnih molekula, integrina, kao što je VLA-4 i citokinskih receptora, sekretuju proinflamatorne citokine kao što su IFN- γ , faktor nekroze tumora (TNF- α), IL-17 i druge, kao i hemokine i matriksne metaloproteinaze (MMP), što uzrokuje promene i na ćelijama endotela, omogućavajući adherenciju aktiviranih ćelija za endotel i njihovu ekstravazaciju kroz krvno-moždanu-barijeru. Po ulasku u CNS, autoreaktivne T ćelije se reaktiviraju od strane već prisutnih antigen prezentujućih ćelija (APĆ), kao što su perivaskularni makrofagi, dendritske ćelije ili mikroglia, koji prezentuju lokalne antigene (Høglund i Maghazachi, 2014; D'Agostino i sar., 2012). Ova reaktivacija dovodi do aktivacije dodatnih ćelija u oblasti inflamacije, npr. B ćelija, monocita/makrofaga, NK ćelija, neutrofila i drugih, sekrecije brojnih citokina, hemokina, MMP-a, reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta i drugih solubilnih medijatora, kao i aktivacije mikroglije i astrocita. Veliki broj CD8⁺ citotoksičnih limfocita dovodi do oštećenja mijelina, oligodendrocita i aksona (Ellwardt i Zipp, 2014). B ćelije, iako malobrojne u infiltratu, veoma su značajne jer doprinose oštećenju mijelina komplementom, ili citotoksičnosti posredovanoj antitelima, služeći i kao APĆ i sekretujući citokine. Nedostaci u regulaciji imunskog odgovora, posredovani

disfunkcionalnim regulatornim T ćelijama doprinose napredovanju destruktivne inflamacije (Milo i Miller, 2014).

1.1.8. Lečenje MS-a

Iako se u lečenju MS-a koristi ograničen dijapazon lekova, ohrabruje podatak da je u protekloj deceniji razvijen veći broj novih lekova koji modulišu tok bolesti (Wingerchuk i Carter, 2014). Prva linija lekova podrazumeva primenu rekombinantnog interferona-beta (IFN- β) i glatiramer acetata (GA), čiji tačan mehanizam dejstva nije potpuno razjašnjen. IFN- β direktno utiče na porast ekspresije antiinflamatornih citokina, dok uporedo smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina, smanjuje prelazak inflamatornih ćelija kroz krvno-moždanu barijeru, povećeva stvaranje nervnog faktora rasta, što vodi porastu preživljavanja neurona i njihovoj regeneraciji a takođe utiče i na porast broja NK ćelija periferne krvi, koje su efikasni proizvođači antiinflamatornih medijatora (Kieseier, 2011). Na ovaj način IFN- β utiče na smanjenje broja relapsa, aktivnih lezija i dalju progresiju bolesti, dok GA (kopakson) verovatno stimuliše regulatorne T ćelije (Bermel i Rudick, 2007; Dhib-Jalbut, 2002). Mitoksantron se pokazao kao snažan imunosupresiv najpre u EAE-u, a potom je ušao i u terapiju MS-a, sa mehanizmom koji se verovatno oslanja na citotoksičnost po limfocite i indukciju apoptoze APC ćelija, kao što su monociti i dendritične ćelije (Vollmer i sar., 2010). U sledeću generaciju terapeutika spadaju Natalizumab i Fingolimod. Natalizumab je humanizovano monoklonsko antitelo koje prepoznaje VLA-4, površinski marker limfocita i monocita, i sprečava imunske ćelije da prođu kroz KMB i uđu u CNS (Ransohoff, 2007). Fingolimod se vezuje za receptor sfingozin-1-fosfata, i sprečava limfocite da izađu iz limfnih čvorova (Cohen i Chun, 2011). Iako postoji više terapeutika koji su trenutno u različitim kliničkim fazama ispitivanja, još uvek nema lekova koji mogu da zaustave progresivne forme bolesti, regenerišu neurone, oligodendrocite i gliju i dovedu do potpunog izlečenja (Wingerchuk i Carter, 2014). Smatra se da, uz razvoj novih lekova, kombinovanje terapeutika i individualan pristup svakom pacijentu predstavljaju budućnost u lečenju obolelih od MS-a.

1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS (EAE)

1.2.1. Animalni modeli

Najveći i najvažniji deo saznanja koja danas posedujemo o MS-u potiču iz animalnih modela ove bolesti, koji predstavljaju pristupačan i prihvatljiv način za proučavanje bolesti kod ljudi. Animalni modeli, a posebno EAE, omogućavaju otkrivanje patogeneze MS-a i drugih demijelinizacionih bolesti CNS-a kao što je akutni diseminovani encefalomijelitis (ADEM) (Javed i Khan, 2014). Ipak, nijedan pojedinačni animalni model ne može u potpunosti da objasni ceo spektar heterogenih kliničkih i patoloških manifestacija MS-a, već samo da ukaže na određene aspekte koji su uključeni u imunopatogenezu ove bolesti (Ben-Nun i sar., 2014). Dok su hronične i relapsno-remitentne forme EAE-a možda primerenije u proćavanju MS-a (Robinson i sar., 2014), smatra se da je akutni monofazni EAE mnogo sličniji ADEM-u nego MS-u (Sriram i Steiner, 2005). Postoji veliki broj prednosti koje čine animalne modele vrlo korisnim u proučavanju MS-a:

- 1) Genetička heterogenost se može značajno smanjiti upotrebom genetički visoko srodnih sojeva životinja, uglavnom miševa i pacova, što u mnogome pojednostavljuje situaciju u odnosu na veliku heterogenost ljudske populacije.
- 2) Uticaj različitih sredinskih faktora može se u značajnoj meri kontrolisati. Na primer uzgajanje eksperimentalnih životinja u sterilnoj sredini.
- 3) Dostupnost velikih grupa uzoraka, kao i dostupnost tkiva i ćelija za proučavanje.
- 4) Obzirom da se rani događaji u patogenezi MS-a ne mogu proučavati kod ljudi jer mehanizmi koji dovode do razvoja bolesti deluju mnogo pre pojave prvih kliničkih znaka i postavljanja dijagnoze, animalni modeli omogućavaju proučavanja i tih ranih procesa u bolesti, odnosno u modelu bolesti koji je izazvan veštačkim putem.

5) Zahvaljujući animalnim modelima i pretpostavci o konzerviranosti mehanizama koji dovode do neuroinflamacije među vrstama, otkriveni su brojni genomske regioni, haplotipovi i genski polimorfizmi koji doprinose povećanom riziku od nastanka MS-a kod ljudi.

6) Genom eksperimentalnih životinja može biti modifikovan na način koji omogućava proučavanje funkcija specifičnih genskih varijanti (npr. tehnike *knock-in*, *knock-out*), što je nezamislivo kod ljudi.

1.2.2. Indukcija i odlike EAE modela

EAE je kao model uspostavljen na majmunima još davne 1935. godine kada je pokazano da ponovljena vakcinacija ekstraktom zečjeg mozga kod majmuna izaziva inflamaciju i oštećenje mijelina (Rivers i Schwentker, 1935). EAE se može indukovati aktivno- imunizacijom mijelinskim antigenima u adjuvansu koji podstiče imunski odgovor na emulgovane antigene, ili pasivno-transferom mijelin-specifičnih T-ćelijskih linija kod različitih životinjskih vrsta, kao što su miševi, pacovi, zamorci, zečevi i majmuni (Wekerle i sar., 1994). Najčešće se za indukciju EAE-a koristi homogenat kičmene moždine (KM), prečišćeni mijelin ili proteini MBP, PLP, MOG odnosno odgovarajući peptidi ovih proteina. EAE se odlikuje jasnim kliničkim znacima koji se obično manifestuju početnom atonijom repa, ascedentnom parezom ili paralizom, što u najtežim slučajevima može dovesti do potpune nepokretnosti i smrti eksperimentalne životinje. U modelu indukovanom pasivnim transferom anti-mijelinske encefalitogene ćelije prenose bolest u naivne primaoce-recipiente (Ben-Nun i sar., 1981). Ova istraživanja su pokazala da CD4⁺ T ćelije koje su reaktivne na antigene CNS-a, kada se aktiviraju mogu same da izazovu nastanak bolesti slične MS-u u laboratorijskim životinjama.

Prvi model MS-a, EAE indukovano MBP-om, je nastao slučajno kao sporedni efekat vakcinacije protiv besnila, gde je vakcina kontaminirana komponentama kičmene moždine, primarno sa MBP-om (Laatsch i sar., 1962). EAE se može

indukovati MBP-om u različitim životinjskim vrstama sa različitim kliničkim tokom, od akutne monofazne do hronične relapsno-remitentne bolesti (Wekerle i sar., 1994). Rezultati dobijeni iz EAE-a indukovano MBP-om u Lewis pacovima doveli su do hipoteze koja ukazuje na to da su autoimunske bolesti posredovane T ćelijama koje ekspimiraju određeni TCRV β lanac (Heber-Katz i Acha-Orbea, 1989), mada je potom pokazana povezanost sa poliklonalnim T ćelijama koje poseduju mnogo veću heterogenost TCR-a, čak i kada je EAE indukovano određenim imunodominantnim peptidom (Ben-Nun i sar., 2006). Takođe je bilo značajno otkriće da potencijalno patogene T-ćelijske linije specifične za MBP mogu da se izoluju iz naivnih *Lewis* pacova i da po aktivaciji ove ćelije mogu da indukuju EAE u naivnim singenim primaocima (Schluesener i Wekerle, 1985). Ovo je pokazalo da potencijalno patogeni autoimunski T-ćelijski klonovi postoje i u normalnom imunskom sistemu i da usled poremećene aktivacije one postaju autoreaktivne i učestvuju u indukciji autoimunskih bolesti. Pored MBP-a, encefalitogenost je pokazao i PLP sa svojim imunodominantnim epitopom, za koji je takođe pokazano da iako nema homologije u sekvenci sa MBP-om može da indukuje EAE, bilo aktivno imunizacijom imunodominantnim epitopom, bilo pasivno transferom CD4⁺ PLP-specifične T-ćelijske linje (Tuohy i sar., 1988; Whitham i sar., 1991).

Iako je pokazano da različite mijelinske i nervne komponente imaju encefalitogeni potencijal, samo MOG, mijelin vezani oligodendrocitni bazni protein (MOBP), oligodendrocit-specifični protein (OSP)/kludin-11, pored MBP-a i PLP-a, imaju potencijal da indukuju EAE u laboratorijskim životinjama (Kaye i sar., 2000; Mendel i sar., 1995; Stevens i sar., 1999). Osim toga, ovi proteini su identifikovani kao ciljni antigeni autoimunskih T ćelija kod pacijenata obolelih od MS-a, i mogu se smatrati primarnim antigenima u MS-u (Kaye i sar., 2000; Kerlero de Rosbo i sar., 1993, Vu i sar., 2001).

Takođe, brojne studije su pokazale da se EAE sa tipičnim kliničkim znacima može indukovati kod eksperimentalnih životinja, kao što su miševi, upotrebom MOG-a ili njegovih peptida (Mendel i sar., 1995). Regioni MOG-a koji sadrže T-ćelijske epitope su definisani, i jedan od njih, MOG35-55, je ustanovljen kao encefalitogeni

epitop koji dovodi do razvića hroničnog relapsno-remitentnog EAE-a sa dosta većom sličnošću MS-u nego modeli indukovani MBP-om ili PLP-om (Kerlero de Rosbo i sar., 1995). Ovo i mnoga druga slična istraživanja učinila su da EAE model indukovan MOG-om postane jedan od najdominantnijih modela MS-a.

1.2.3. Imunopatogeneza EAE-a

Iako u EAE-u antitela B limfocita, specifična za antigene CNS-a, daju značajan doprinos u kliničkim manifestacijama bolesti (Lyons i sar., 2002), smatra se da ključnu ulogu u imunopatogenezi EAE-a imaju encefalitogeni T limfociti, i to pomoćničke Th1 polarizovane $\alpha\beta$ CD4⁺ T ćelije, koje nakon stimulacije eksprimiraju proinflamatorne citokine IFN- γ i TNF- α (Adelmann i sar., 1995). Značaj ovih ćelija je pokazan u eksperimentima sa pasivnim transferom klonova CD4⁺ T ćelija specifičnim za antigene mijelina, koje su u naivnim singenim primaocima indukovale EAE (Zamvil i sar., 1985). Među perifernim T limfocitima različite antigenske specifičnosti postoje i potencijalno autoreaktivni T-ćelijski klonovi specifični za sopstvene antigene CNS-a, koje mehanizmi periferne tolerancije održavaju u neaktivnom stanju (Mueller, 2010). Međutim, u procesu imunizacije antigenom CNS-a u prisustvu adjuvansa (Libbey i Fujinami, 2011), u perifernim limfoidnim organima genetski podložnih jedinki, započinje autoimunski proces kada naivne CD4⁺ T ćelije prepoznaju mijelinske antigene u sklopu MHCII molekula prezentovane pomoću APĆ, uglavnom dendritičnih ćelija (Weir i sar., 2002). U ovom procesu se prezentacijom antigena obezbeđuje prvi signal neophodan u aktivaciji naivnih T ćelija, dok adjuvans obezbeđuje drugi signal odnosno ispoljavanje kostimulatornih i adhezivnih molekula na površini aktiviranih profesionalnih APĆ koje stvaranjem citokina dovode do diferencijacije naivnih T ćelija u efektorske. Aktivirane T ćelije povećavaju ekspresiju brojnih integrina, adhezivnih molekula i hemokinskih receptora na svojoj površini koji im omogućavaju zadržavanje i čvrstu adheziju za endotelne ćelije KMB i posledični ulazak u CNS (Wilson i sar., 2010). Potom, efektorske T ćelije bivaju reaktivirane u CNS-u od strane lokalnih APĆ kao što su perivaskularni makrofagi i rezidentna mikroglia (Shemer i Jung, 2015; Kawakami i sar., 2004), stvaraju brojne citokine i druge proinflamatorne medijatore koji

privlače mononuklearne ćelije u CNS (Murphy i sar., 2010) i pokretanjem različitih efektorskih mehanizama dovode do propadanja mijelinskog omotača, aksonskih završetaka i neurona (Yamasaki i sar., 2014). Pokazano je da je za diferencijaciju Th1 ćelija neophodno prisustvo citokina IFN- γ i IL-12 (Amsen i sar., 2009), i u osnovi je regulisano transkripcionim faktorima T-bet, STAT1 i STAT4 (Szabo i sar., 2000). Mnoge studije su pokazale da IFN- γ efektorskih Th1 ćelija ima proinflamatornu ulogu zahvaljujući sposobnosti da snažno aktivira makrofage (Adams i Hamilton, 1987), stimuliše produkciju proinflamatornih medijatora kao što su TNF- α , inducibilna sintaza azot monoksida (iNOS), IL-12 (Vila-del Sol i sar., 2008, 2007; Ma i sar., 1996), povećava ekspresiju molekula neophodnih za adheziju na ćelijama endotela i stimuliše ekstravazaciju leukocita kroz endotel (May i Ager, 1992). IL-12 pored uloge u diferencijaciji Th1 ćelija, stimuliše infiltraciju CNS-a bogatu makrofagima i povećava ekspresiju hemokina CXCL9, 10 i 11 koji privlače monocite (Kroenke i sar., 2008), dok je IL-23, koji sadrži istu subjedinicu kao IL-12 (p40), važan u proliferaciji i održavanju Th17 ćelija (McGeachy i sar., 2009). Takođe, IL-23 stimuliše infiltraciju neutrofila povećanjem ekspresije hemokina CXCL1 i 2 koji ih privlače a takođe povećava ekspresiju faktora stimulacije kolonija (engl. *colony-stimulating factor*, CSF) (Cua i sar., 2003; Kroenke i sar., 2008). Produkcija TNF- α od strane infiltriranih makrofaga i rezidentne mikroglije pogoršava bolest narušavanjem integriteta KMB i održavanjem inflamacije u CNS-u (Valentin-Torres i sar., 2016, Renno i sar., 1995). Inhibicija IL-1 β koga sekretuju infiltrišuće mononuklearne ćelije u CNS-u i koji stimuliše inflamaciju i pogoršava bolest, smanjivala je inflamaciju u EAE-u (Mandolesi i sar., 2015; Jacobs i sar., 1991). Ravnoteža između IL-1 β i antagoniste receptora IL-1 (IL-1Ra), koji je prirodni inhibitor proinflamatornog efekta IL-1 β , igra važnu ulogu u osetljivosti na autoimunske bolesti (Arend, 2002). Pored Th1 ćelija značajan doprinos imunopatogenezi EAE-a daju CD4⁺ Th17 efektorske ćelije (Hofstetter i sar., 2007). ROR γ t je otkriven kao glavni transkripcioni faktor koji je uključen u diferencijaciju proinflamatornih Th17⁺ ćelija u EAE-u (Ivanov i sar., 2006), ali u ovom procesu značajnu ulogu ima i transkripcioni faktor ROR α t, koga indukuju TGF β i IL-6 na STAT3-zavisani način (Yang i sar., 2008). Pokazano je da jedan od citokina koje sekretuju Th17 efektorske ćelije, IL-17A privlači i aktivira neutrofile i učestvuje u narušavanju KMB modulacijom čvrstih spojeva u endotelu, što se smatra jednim od

važnih koraka u nastanku EAE-a (Huppert i sar., 2010). Pored IL-17, ove efektorske ćelije sintetišu i IL-21 i IL-22 značajne u odbrani od ekstracelularnih bakterija i nekih gljivica (Weaver i sar., 2006), kao i IL-6, TNF α , IL-1 i faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF) (Furuzawa-Carballeda i sar., 2007). Mehanizmom pozitivne povratne sprege GM-CSF iz TH17 ćelija stimuliše APC da produkuju IL-23 koji je neophodan za encefalitogenost Th17 ćelija (El-Behi i sar., 2011). Međutim, Th1 ćelije takođe produkuju GM-CSF (Grifka-Walk i sar., 2015), koji je veoma značajan u aktivaciji mikroglialnih ćelija u EAE-u (Ponomarev i sar., 2007).

Potencijalno patogenu ulogu CD8⁺ T ćelija u MS-u podržava istraživanje na miševima koje pokazuje da mijelin reaktivne CD8⁺ T ćelije mogu da izazovu bolest u singenim miševima (Sun i sar., 2001). Ipak, uloga efektorskih ćelija i efektorskih citokina nije jednoznačna, jer su studije EAE-a pokazale da CD8⁺ T ćelije mogu imati i protektivne uloge (Koh i sar., 1992, Najafian i sar., 2003). Naime, pokazano je da različite podgrupe imunoregulatornih CD8⁺ T ćelija mogu da proizvodnjom TGF- β i IFN- γ suprimiraju tok bolesti (Chen i sar., 2009), kao i da proizvodnjom IL-10, imunoregulatornog citokina koji ima ulogu u završetku imunskog odgovora, skraćuju trajanje EAE-a (Lee i sar., 2008; Rifa'i i sar., 2008). Studije na miševima koji nemaju B limfocite ili imaju B limfocite koji ne funkcionišu normalno su pokazale da su miševi bez B limfocita bili otporni na indukciju EAE-a MOG peptidom, i celim MOG proteinom (Lyons i sar., 1999). B ćelije mogu da doprinose patogenezi bolesti ili direktno prezentovanjem antigena i obezbeđivanjem kostimulatornih signala T ćelijama, ili indirektno preko svojih produkata. Imunizacija miševa koji su deficijentni za MHC II na B ćelijama nije indukovala kliničke znake EAE-a, što se može pripisati neefikasnoj aktivaciji CD4⁺ T ćelija i posledičnom smanjenju odgovora Th1 i Th17 ćelija (Molnarfi i sar., 2013). Ova studija ukazuje na značaj B ćelija u patogenezi autoimunosti u CNS-u, nezavisno od njihove humoralne uloge u ovom procesu. B ćelije su takođe i značajan izvor solubilnih medijatora kao što su citokini i hemokini. IL-6 koga proizvode B ćelije je značajan u proinflamatornoj Th17-ćelijskoj polarizaciji, pa su tako miševi sa B ćelijama koje ne mogu da sintetišu IL-6 razvijali mnogo slabiji EAE u poređenju sa kontrolnom eksperimentalnom grupom životinja (Molnarfi i sar., 2013). Pored proizvodnje TGF β -1, regulatorni B limfociti (Breg) proizvode IL-10 koji inhibira

napredovanje i ubrzava oporavak od EAE-a (Fillatreau i sar., 2002). Osim toga, B ćelije proizvode i druge citokine, kao što su IL-2, IL-4, TNF α , IFN γ , i IL-12 (Lund, 2008). U razumevanju patogeneze MS-a značajno su doprineli TCR transgeni modeli EAE-a, uglavnom zasnovani na CD4⁺ T ćelijama koje prepoznaju peptide različitih mijelinskih proteina. Važan doprinos razumevanju uloge različitih ćelija u autoimunosti predstavlja i studija u kojoj je stvoren TCR transgeni miš koji spontano stvara CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije koje prepoznaju MOG, kao i B ćelije iste specifičnosti (Anderson i sar., 2012). Slično, značajna je i studija u kojoj je pokazano da T i B ćelije dvostruko transgenih životinja (TCR specifičan za MOG i B ćelije specifične za MOG) zajednički deluju da bi spontano nastao težak oblik EAE-a koji predstavlja veran model humane bolesti Neuromijelitis optike (Bettelli i sar., 2006).

Iako mehanizmi okončanja inflamatornog procesa u EAE-u nisu potpuno razjašnjeni, smatra se da ulogu u ovom procesu imaju antiniflamatorni citokini IL-10, IL-4 i TGF- β (Klose i sar., 2013; Khoury i sar., 1992), kao i apoptoza autoreaktivnih T limfocita infiltriranih u CNS (Pender i sar., 1992). Takođe, jednu od najznačajnijih uloga u okončanju autoimunske inflamacije imaju regulatorne T ćelije (Treg) (Zhang i sar., 2004), kao što su CD25⁺CD4⁺ Treg za čiju diferencijaciju i funkciju presudnu ulogu ima Foxp3 transkripcioni factor (Rudra i sar., 2012). Produkcija neuroprotektivnog moždanog neurotrofičkog faktora (engl. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) i neurotrofina 3 (NT-3), od strane infiltriranih T ćelija, značajno pospešuje regeneraciju tkiva CNS-a (Hammarberg i sar., 2000) a da bi bio uspešan taj proces takođe zahteva usklađeno učešće efektorskih i regulatornih T ćelija (Raposo i sar., 2014).

1.2.4. Primenljivost EAE modela

Iako je EAE umnogome sličan MS-u i kao model od neprocenjivog značaja u razjašnjavanju patogeneze MS-a, ovaj model kao i svi animalni modeli humanih bolesti ima i izvesna ograničenja. Jedna od glavnih razlika MS-a i EAE-a jeste da EAE zahteva spoljašnju imunizaciju da bi došlo do indukcije bolesti, dok se kod ljudi osetljivost prema auto-antigenima razvija endogeno. Ono što se često ističe kao važan nedostatak jeste kratko vreme trajanja kliničke slike EAE-a, koji traje od nekoliko nedelja u akutnoj

fazi, do nekoliko meseci u „hroničnoj” fazi, za razliku od višegodišnjeg hroničnog toka MS-a (Steinman L. i Zamvil, 2005). U tom smislu EAE ima ograničenu mogućnost da ukaže na probleme koji često nastaju kao neželjena dejstava posle više meseci ili godina primene određene terapije. Autoreaktivnost prema antigenima mijelina u EAE-u se povećava upotrebom adjuvansa, koji obično sadrže bakterijske komponente koje su vrlo potentne u aktivaciji urođenog imunskog odgovora preko receptora koji prepoznaju strukture patogenog mikroorganizma (Libbey i Fujinami, 2011). U EAE-u antigen koji indukuje bolest je poznat, dok u MS-u nije otkriven jedinstveni antigen. Pojava intra- i intermolekulskog širenja epitopa (*epitope spreading*) tokom bolesti, koje se dešava i kod T i kod B ćelija, može biti dodatni razlog koji otežava identifikaciju antigena (Cornaby i sar., 2014). EAE model pokazuje veliku heterogenost u smislu eksperimentalnih uslova (što podrazumeva vrstu životinja, soj, pol, starost jedinki), načina indukcije bolesti (vrste antigena, adjuvansa, aktivne/pasivne imunizacije), kao i kliničkih i patoloških manifestacija i osetljivosti na tretmane (Gold i sar., 2006). Stoga značaj od ovog modela u prvom redu zavisi od upotrebe odgovarajućeg modela da bi se dobio odgovor na specifično naučno ili kliničko pitanje. Većina EAE eksperimenata se izvodi u genetički identičnim jedinkama glodara, što elimiše značajan izvor varijabilnosti i olakšava istraživanja, ali sa druge strane ne odražava verno humanu populaciju koja je genetički vrlo heterogena. Takođe, visokosrodni sojevi eksperimentalnih životinja se odgajaju u sredinama koje su mikrobiološki čiste i bez mikroorganizama koji inače utiču na formiranje ljudskog imunskog sistema (Adams i sar., 2003). Postoji više primera terapijskih pristupa koji su bili uspešni u EAE-u, a koji nisu mogli da se uspešno primene u MS-u. I pored dokaza o značajnoj ulozi IL-1 u EAE-u, antagonist IL-1 receptora (anakinra) nije pokazao očekivani pozitivan terapijski efekat u MS-u (Martin i Near, 1995; Constantinescu i sar. 2011). Druga vrsta pristupa bila je upotreba anti-inflamatornih citokina. Iako TGF- β suprimira EAE (Santambrogio i sar., 1993; Rott i sar., 1994), tretman MS pacijenata sa TGF- β pokazao se neuspešan zbog sporednih efekata (Calabresi i sar., 1998). Ustekinumab, anti-p40 monoklonsko antitelo, koje blokadom zajedničke subjedinice p40 IL12/23 suprimira štetan Th1 i Th17 odgovor, je sprečavao EAE u prekliničkim studijama (Brok i sar., 2002). Međutim, njegova primena u kliničkim studijama je bila neočekivano neefikasna (Segal i sar., 2008), što ukazuje na to da iako je Th1/Th17 put vazan u patogenezi MS-a, možda nije

presudan u nastanku bolesti a takodje preispituje validnost EAE-a kao modela za MS. Iako se u početku mislilo da IFN- γ u patogenezi MS-a i EAE ispoljava isključivo štetan efekat, studije su pokazale mnogo kompleksniju ulogu ovog citokina. Naime, primena IFN- γ je povoljno delovala na kliničku sliku EAE-a, dok je njegova inhibicija primenom monoklonskih antitela pojačavala bolest (Sanvito i sar, 2010). Suprotno je pokazano za MS, gde je intravenski tretman sa IFN- γ indukovao pogoršanje u značajnom broju pacijenata (Panitch i sar., 1987), dok je tretman anti-IFN- γ antitelima suprimirao MS (Skurkovich i sar., 2001). Možda najveće iznenađenje predstavljala je terapijska primena anti-TNF- α antitela, gde kod pasivno ali ne i aktivno indukovanog EAE dolazi do suprimiranja bolesti, dok je kod MS pacijenata došlo do neočekivanog pogoršanja (Lim i Constantinescu, 2010).

1.3. ARILPIPERAZINSKI DOPAMINERGIČKI LIGANDI

Upotreba farmakoloških liganada za dopaminske receptore se pokazala kao vrlo efikasan pristup u lečenju različitih funkcionalnih nedostataka u više patoloških stanja, kao što su Parkinsonova bolest, šizofrenija, bipolarni poremećaj, depresija, erektilna disfunkcija i druga (Beaulieu i Gainetdinov, 2011). Kod ovih bolesti terapijska upotreba agonista ili antagonista dopaminskih receptora dovodi do značajnog poboljšanja stanja pacijenata. U Parkinsonovoj bolesti usled propadanja neurona koji sekretuju dopamin u substanciji nigri srednjeg mozga dolazi do nedostatka dopamina, pa je osnovni pristup u lečenju motornih simptoma nadoknađivanje samog dopamina u vidu njegovog prekursora, L-DOPA-e, kao i upotreba agonista dopaminskih receptora koji imitiraju endogeni neurotransmitter dopamin (Connolly i Lang, 2014). Agonisti dopaminskih receptora se koriste kao primarni terapijski pristup kod mladih pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti ne bi li se odložio početak lečenja L-DOPA-om koja posle dužeg perioda primene izaziva pojavu različitih neželjenih efekata, a njen metabolizam dovodi do stvaranja toksičnih slobodnih radikala kao što je vodonik peroksid (H₂O₂) (Radad i sar., 2005). Nasuprot tome, dopaminska hipoteza, koja kao uzrok nastanka šizofrenije

pretpostavlja preteranu aktivaciju dopaminskih D2 receptora, bila je osnov za razvoj 65 preparata koji se danas koriste u lečenju pacijenata sa psihozama (Bruijnzeel i sar., 2014).

Neke studije pokazuju da ligandi dopaminskih receptora mogu imati i neuroprotektivno dejstvo (Salles i sar., 2013). Pokazano je da dopaminski ligandi preko svojih receptora mogu da aktiviraju puteve signalne transdukcije koji dovode do neuroprotekcije ali još uvek nije u potpunosti definisan mehanizam odgovoran za ove efekte (Nair i sar., 2003). Takođe se smatra da ligandi dopaminskih receptora mogu svoje neuroprotektivno dejstvo da ostvare i mehanizmima koji nisu direktno posredovani njihovim vezivanjem za receptor, na primer direktnim uklanjanjem slobodnih radikala kao što je NO (azot monoksid) (Nishibayashi i sar., 1996). Dopaminergički ligandi ispoljavaju svoje neuroprotektivno dejstvo i povećanjem ekspresije i aktivnosti antioksidantnih enzima (Bai i sar., 2002), stabilizacijom funkcije mitohondrija (Cassarino i sar., 1998), sprečavanjem fragmentacije DNK-a, kao i sprečavanjem porasta proapoptotskih proteina i posledične apoptoze (Qing i sar., 2003; Wei i sar., 2003).

Biološki aktivna jedinjenja koja sadrže N-arilpiperazinsku grupu, zahvaljujući sposobnosti da se vežu za dopaminske i serotoninske receptore, deluju kao antipsihotici, antidepressivi i anksiolitici (López-Rodríguez i sar., 1996; Taverne i sar., 1998; González-Gómez i sar., 2003; Zajdel i sar., 2014). Pored toga, arilpiperazinski derivati nalaze primenu i kao antihipertenzivi (Klioze i sar., 1980), blokatori Ca^{2+} kanala (Lee i sar., 2010) i acetilholinesterazni inhibitori (Cappelli i sar., 2005). Jedan od najpoznatijih arilpiperazina je aripiprazol, koji se visokim afinitetom vezuje za više receptora povezanih sa G-proteinima, uključujući dopaminske D2 receptore, pri čemu njegov efekat kao parcijalnog agoniste odnosno antagonist D2 receptora može zavisiti od fiziološkog konteksta- količine sintetisanog dopamina, tipa ispitivanih ćelija, gustine receptora i njihove lokalizacije, kao i okolne sredine koja varira u različitim regionima mozga (Ma i sar., 2014; Brust i sar., 2015). Danas se ovaj atipični antipsihotik uspešno koristi u lečenju pacijenata obolelih od šizofrenije, kliničke depresije, bipolarnog poromećaja, akutne manije, i delirijuma (Ishigooka i sar., 2015; Malempati, 2015;

Rezayat i sar., 2014; Kirino, 2014). Osim povoljnog dejstva koje aripiprazol ostvaruje vezivanjem za odgovarajuće dopaminske i serotoninске receptore u različitim oblicima psihoza, ovaj atipični antipsihotik ispoljava i izvesna neuroprotektivna dejstva i štiti neurone od štetnih uticaja *in vitro* i *in vivo* (Cosi i sar., 2005; Eren i sar. 2007; Matsuo i sar. 2010; Koprivica i sar., 2011) tako što povećava nivo BDNF u hipokampusu pacova koji ima ulogu u preživljavanju, rastu i diferencijaciji neurona (Nowakowska i sar., 2014), povećava proliferaciju ćelija hipokampusa (Abrial i sar., 2014), indukuje rasta neurita kod PC12 ćelija (Ishima i sar., 2012), stimuliše proliferaciju i preživljavanja izvornih (progenitorskih) nervnih ćelija (Yoneyama i sar., 2014), smanjuje oštećenja oligodendrocita od strane mikroglije stimulisane IFN- γ (Seki i sar., 2013) i utiče na oksidativni stres snižavanjem lipidne peroksidacije i povećanjem nivoa superoksid dismutaze (SOD) (Chen i sar., 2013). Pored toga, pokazano je da antipsihotici koji se koriste u lečenju šizofrenije, utiču na unutarćelijski signalni put Ca^{2+} u mikroglijalnim ćelijama, koji je vrlo važan u brojnim funkcijama mikroglije kao što su oslobađanje proinflamatornih citokina, NO, neurotrofnih faktora i migracija (Mizoguchi i sar., 2014).

Nedavno je objavljena studija o 19 novosintetisanih arilpiperazinskih dopaminergičkih/serotoninerđičkih liganada (Sukalovic i sar., 2013), među kojima su najveći neuroprotektivni potencijal pokazala dva derivata N-{4-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid (označen kao arilpiperazin **6a**), i N-{3-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid, (označen kao arilpiperazin **6b**). Naime, ova dva arilpiperazinska derivata su *in vitro* ispoljila najizraženije neuroprotektivno dejstvo u uslovima toksičnog delovanja slobodnog radikala azot monoksida (NO) i neurotoksina 6-hidroksidopamina (6-OHDA) (Tovilovic i sar., 2012; 2013). Osim toga, serija različitih derivata arilpiperazina je pokazala antiinflamatorna svojstva smanjujući inflamaciju u modelu edema (Dündar i sar., 2007) i inhibirajući produkciju proinflamatornih citokina TNF i IL-1 β od strane humanih leukocita stimulisanih bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) (Gouault i sar., 2004). Iako je u prethodnim *in vitro* studijama pokazano da arilpiperazinski dopaminergički ligandi ostvaruju neuroprotektivno dejstvo u kulturi SH-SY5Y ćelija sličnih neuronima (Tovilovic i sar., 2012), do sada nije ispitivan efekat ovih liganada *in vivo* u modelu autoimunske bolesti, kakav je EAE. Stoga je, na osnovu prethodno izloženih podataka, opravdano

pretpostaviti da bi kombinacija antiinflamatornog i neuroprotektivnog dejstva arilpiperazinskih derivata mogla biti korisna u terapiji inflamatornih/autoimunskih oštećenja CNS-a.

2. CILJEVI

Polazeći od toga da je u prethodnim *in vitro* studijama pokazano da među novosintetisanim arilpiperazinskim dopaminergičkim ligandima koji štite SH-SY5Y ćelije slične neuronima od oksidativnog stresa, najjače neuroprotektivno dejstvo ispoljavaju arilpiperazinski ligandi označeni kao **6a** i **6b**, kao i da do sada nije ispitivan njihov neuroprotektivan potencijal *in vivo*, postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitati efekte arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada na klinički tok bolesti i inflamaciju CNS-a u modelu EAE-a.
- Ispitati celularne i molekularne mehanizme anti-inflamatornog dejstva arilpiperazina u EAE-u.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U ovom istraživanju su korišćene ženke pacova genetski visokosrodnog soja Dark Agouti (DA), starosti od 8 do 10 nedelja. Životinje su dobijene iz uzgajališta Galenika AD i gajene pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Zdravstveno stanje životinja je praćeno redovno, a pojava infekcija kontrolisana u skladu sa smernicama Udruženja Laboratorija Evropske Unije za Nauku na Životinjama (FELASA) (Nicklas i sar., 2002). Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, broj 5592/2 od 10.03.2015. godine i učinjeni su svi naponi da se što je moguće više smanji patnja životinja, broj upotrebljenih jedinki, i da se primene drugi pristupi osim *in vivo* tehnika gde god je to bilo moguće. Takođe, svi eksperimenti na životinjama su odobreni od strane Etičkog Saveta Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije - Uprava za Veterinu, broj rešenja 323-07-02608/2015-05/8. Ova studija je izvedena u skladu sa direktivama Evropskog Saveta od 24. novembra 1986. (86/609/EEC).

3.2. INDUKCIJA I KLINIČKA PROCENA EAE-a

3.2.1. Imunizacija životinja

Za aktivnu indukciju EAE-a je korišćen homogenat KM pacova pripremljen homogenizovanjem tkiva kičmene moždine DA pacova uz dodavanje fiziološkog rastvora sa fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffer Saline, PBS*, Sigma) u odnosu 1g

tkiva prema 1ml PBS. Kao adjuvans je korišćen Kompletni Frojndov adjuvans (KFA, Difco Laboratories, USA) koji sadrži 1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*. Encefalitogena emulzija je pravljena mešanjem istih zapremina suspenzije homogenata KM i KFA. EAE je indukovano intradermalnim injektovanjem 100 µl encefalitogene emulzije u zadnju šapu pacova.

3.2.2. Praćenje kliničke slike

Životinje su posmatrane svakodnevno od dana imunizacije radi uočavanja pojave kliničkih znaka bolesti. Dan kada su primećeni prvi znaci bolesti, najčešće u vidu atonije repa, označavan je kao početak bolesti. Stepen težine bolesti izražavan je kroz kliničku ocenu prema skali od 0 do 4 na sledeći način: 0 - odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 1 - atonija repa; 2 - pareza zadnjih ekstremiteta; 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta i 4 – stanje umiranja životinje ili njena smrt. Stepeni 2 i 3 su često praćeni inkontinencijom urina i fecesa. U slučajevima kada su klinički znaci izraženi slabije od tipičnih za određeni stepen bolesti, korišćene su intermedijerne vrednosti (npr. 0.5 za blago izraženu atoniju repa). Sledeći klinički parametri su korišćeni u analizi: početak EAE-a (prvi dan posle imunizacije kada su primećeni prvi klinički znaci), zbirna EAE ocena (suma svih dnevnih ocena kliničkih znaka), i najveća EAE ocena (najveća zabeležena klinička ocena tokom bolesti). U odgovarajućim vremenskim tačkama (dan 14., 21. ili 28. posle imunizacije) pacovi su u etarskoj anesteziji žrtvovani cervikalnom dislokacijom da bi se uzorkovala tkiva (kičmena moždina i limfni čvorovi) neophodna za dalje eksperimente i analize.

3.3. TRETMAN ARILPIPERAZINSKIM LIGANDIMA

Arilpiperazinski ligandi **6a** i **6b** su sintetisani kao što je prethodno opisano (Tovilovic i sar., 2012) i čuvani na +4°C kao 10 mM štok rastvor u dimetil sulfoksidu (DMSO; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Neposredno pre upotrebe ovaj rastvor je

razblaživan u sterilnom PBS-u, i pacovima je jednom dnevno intraperitonealno (ip.) injektovano 500 µl rastvora, što je odgovaralo približno dozi od 10 mg/kg telesne mase. Tretman eksperimentalnih životinja vršen je na tri različita načina: 1- od dana imunizacije do kraja eksperimenta (21./28.dan); 2- tokom prvih sedam dana od dana imunizacije; 3- počevši od sedmog dana posle imunizacije do kraja eksperimenta. Kontrolne životinje su tretirane ip. sa 500 µl sterilnog PBS-a koji sadrži isti procenat DMSO-a kao u tretmanu.

3.4. PRIPREMA ĆELIJSKIH SUSPENZIJA I KULTIVISANJE ĆELIJA

3.4.1. Medijumi za pripremu i kultivisanje ćelija

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 (Sigma, USA) u koji su dodavane sledeće supstance: 20 mM pufer HEPES (Flow Laboratories, V. Britanija), 50 µM 2-merkaptoetanol (Fluka, Nemačka), 2 mM L-glutamin (US Biochemical Corp., SAD), 10 mM natrijum-piruvat (Sigma), antibiotici penicilin (100 IU/ml), gentamicin (100 µg/ml) i antimikotik nistatin (svi Galenika, Srbija). Fetalni teleći serum (FCS, PAA laboratories, Austrija) koji je prethodno inaktivisan 30 minuta na 56 °C, dodavan je medijumu za kultivisanje ćelija u koncentraciji od 5 %. Za potrebe stimulacije ćelija baznim proteinom mijelina (MBP) (Sigma-Aldrich) korišćen je medijum sa 2 % pacovskog seruma.

3.4.2. Izolovanje i određivanje broja ćelija limfnog čvora

Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja sterilnim instrumentima su vađeni cervikalni i poplitealni limfni čvorovi i prenošeni u sterilne posude sa medijumom. U cilju dobijanja suspenzije ćelija limfnog čvora, tkivo je potom protiskivano kroz sterilnu najlonsku mrežicu i dobijena ćelijska suspenzija je filtrirana kroz istu najlonsku mrežicu. Ćelije su zatim centrifugirane (500 g, 5 minuta), resuspendovane u medijumu i brojane nakon bojenja sa tripan plavim. Iz ćelijskih suspenzija dobijenih ekstrakcijom iz

životinja, deo ćelija je resuspendovan u PBS sa 0,1% tripan-plavog (BDSL, V. Britanija) (20 µl ćelijske suspenzije i 180 µl tripan plavog) i broj živih ćelija je određivan brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u. Potom su ćelijske suspenzije podešavane do željene gustine za odgovarajući eksperiment.

3.4.3. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Mononuklearne ćelije su izolovane iz kičmenih moždina imunizovanih pacova. Nakon žrtvovanja životinje su perfundovane sterilnim rastvorom PBS-a u cilju uklanjanja ćelija krvi iz kičmene moždine. Po završenoj perfuziji kičmena moždina (KM) je izolovana iz eksperimentalnih životinja sterilnim priborom. Potom je izolovana kičmena moždina homogenizovana protiskivanjem kroz sterilnu najlonsku mrežicu i dobijena suspenzija ćelija centrifugirana 2 minuta na 700 g. Dobijeni talog je resuspendovan u 40% Perkolu (Sigma-Aldrich) i ovako dobijena suspenzija je nanošena na gustinski gradijent Perkola koji se dobija naslojavanjem različitih koncentracija (70% i 40%) izotoničnog Perkola. U konusne epruvete od 15 ml prvo je nanošeno 6 ml 70% Perkola, a zatim 3 ml suspenzije ćelija resuspendovane u 40% Perkolu. Nakon centrifugiranja u trajanju od 55 minuta na 850 g u epruveti sa gradijentom Perkola interfazni prsten je pažljivo sakupljan i dva puta ispiran (900 g 5 minuta) od ostataka Perkola u RPMI-1640 medijumu (Sigma-Aldrich) sa 2% pacovskog seruma. Broj ćelija je određivan bojenjem ćelija sa tripan plavim na ranije opisan način.

3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE I PROTOČNA CITOFLUORIMetriJA

3.5.1. Detekcija površinskih markera

Fenotipizacija MNČKM pacova vršena je tehnikom direktne i indirektno imunofluorescencije korišćenjem protočnog citofluorimetra (FACS ARIA III, Becton Dickinson, USA). Na mononuklearnim ćelijama DA pacova je ispitivana ekspresija sledećih površinskih markera: CD3 (marker T limfocita), CD4 (marker Th ćelija), CD8

(marker citotoksičnih T limfocita), i CD11b (marker monocita/makrofaga). Monoklonska antitela koja su korišćena u eksperimentima, kao i njihove koncentracije/razblaženja su navedeni u tabeli 1. Po dobijanju suspenzije mononuklearnih ćelija KM, ćelije (5×10^5) su prebacivane u plastične epruvete i centrifugirane (500 g, 3 minuta). Posle centrifugiranja i odlivanja supernatanta na talog ćelija su naneta odgovarajuća antitela resuspendovana u 200 μ l PBS-a sa 2 % FCS. Ovako pripremljene ćelije su inkubirane 30 do 45 minuta na +4 °C. Po isteku inkubacije, ćelije su isprane dva puta (PBS, 500g), resuspendovane u 300 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru pomoću DIVA softvera.

Tabela 1. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju ćelija

Antitelo	Proizvođač	Koncentracija (mg/ml)	Razblaženje	Obeleživač
Anti-pacovsko CD3	BD Biosciences	0,5	1:500	FITC
Anti-pacovsko CD4	Bio Legend	0,2	1:200	APC/Cy7
Anti-pacovsko CD8	BD Biosciences	0,2	1:200	V450
Anti-pacovsko CD11b	BD Biosciences	0,2	1:200	PE/Cy7

FITC – fluorescein izotiocijanat; APC/Cy7- alofikocijanin/cijanin boja Cy7; V450- kumarin boja; PE/Cy7- fikoeritrin/ cijanin boja Cy7

3.5.2. Detekcija unutarćelijskih citokina

Detekcija unutarćelijskih citokina na protočnom citofluorimetru vršena je metodom trostrukog unutarćelijskog bojenja. U tu svrhu, 5×10^5 ćelija resuspendovanih u 400 μ l medijuma u plastičnim epruvetama je stimulirano sa forbol miristat acetatom (PMA) (100 ng/ml) i jonomicinom (400 ng/ml) i inkubirano na 37 °C tokom 5 h.

Tabela 2. Antitela korišćena za detekciju unutarćelijskih citokina

Antitelo	Proizvođač	Koncentracija (mg/ml)	Razblaženje	Obeleživač
Anti-pacovsko IFN- γ	Bio Legend	0,05	1:40	Alexa Fluor 647
Anti-pacovsko IgG1 κ irelevantne specifičnosti	Bio Legend	0,1	1:40	Alexa Fluor 647
Anti-pacovsko IL-17	eBioscience	0,2	1:200	PerCP-Cy 5.5
Anti-pacovsko IgG2a irelevantne specifičnosti	eBioscience	0,2	1:200	PerCP-Cy 5.5
Anti-pacovsko IL-10	BD Biosciences	0,2	1:200	PE
Anti-pacovsko IgG2b irelevantne specifičnosti	BD Biosciences	0,2	1:200	PE

PerCP-Cy 5.5- peridin hlorofil protein- cijanin boja Cy 5.5; PE- fikoeritrin

Nakon prvog sata inkubacije je dodavan inhibitor oslobađanja proteina, Brefeldin A (5 μ M) (Sigma-Aldrich). Posle inkubacije sledilo je obeležavanje ćelija sa anti-CD4 i anti-CD8 antitelom (kao što je opisano u prethodnom poglavlju). Ćelije su potom fiksirane 2 % paraformaldehidom (PFA) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, oprane u PBS-u i čuvane na +4 °C u frižideru do permeabilizacije. Za permeabilizaciju je korišćen pufer za permeabilizaciju koji se sastojao od 2 % FCS-a, 0,1% Triton-a i 0,1% BSA-a rastvorenih u PBS-u, u kome su ćelije inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, ćelije su centrifugirane i resuspendovane u 100 μ l istog pufera. Ćelije su potom inkubirane 30 min na +4 °C u prisustvu anti-IFN- γ , anti-IL-17, i anti IL-10 antitela i odgovarajućih izotipskih kontrola (Tabela 2.), potom isprane (800 g, 3 minuta) dva puta u puferu za permeabilizaciju, i finalno resuspendovane u 300 μ l PBS-a. Obojene ćelije su brojane na protočnom citofluorimetru FACS ARIA III (BD Biosciences), a dobijeni rezultati su analizirani pomoću *FlowJo TriStar* softvera.

3.6. ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE GENA

Relativna ekspresija određenih gena u različitim ćelijama (ćelije limfnog čvora i MNČKM) poreklom iz imunizovanih DA pacova je određivana korišćenjem kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja (engl. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR), gde se količina amplifikovane komplementarne DNK (cDNK) detektuje tokom PCR reakcije u realnom vremenu. Prethodno se iz ispitivanih ćelija izoluje RNK koja se reverznom transkripcijom prevodi u cDNK.

3.6.1. Izolovanje RNK

Uzorci ispitivanih ćelija, čiji je broj podešen na 5×10^6 ćelija, su prenošeni u epruvete od 2 ml (Sarstedt), centrifugirani (2000 g, 3 minuta) i po uklanjanju medijuma lizirani blagim pipetiranjem u 500 μ l reagensa za izolaciju ukupne RNK (Total RNA

Isolation Kit, Metabion, Nemačka). U uzorke je zatim dodavano po 100 μ l hloroforma, i oni su mešani na vorteksu 10 sekundi na sobnoj temperaturi, ostavljeni 10 minuta na +4°C i centrifugirani 15 minuta (12000 g, +4°C). Nakon centrifugiranja i formiranja tri faze u epruveti, vodena faza u kojoj se nalazi RNK je prenošena u drugu epruvetu, i izdvojena RNK je precipitirana dodavanjem izopropanola u zapremini koja je jednaka zapremini prenete vodene faze (oko 300 μ l). Nakon intenzivnog mešanja, epruvete su ostavljane tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirane 15 minuta (12000 g, +4°C). Istaložena RNK je potom dva puta isprana sa 1 ml 75 % etanola centrifugiranjem od 5 minuta (7500 g, 4 °C). Po završetku ispiranja i odstranjivanja etanola, precipitati su sušeni i rastvarani u 10 μ l demineralizovane vode. Koncentracija izolovane ukupne RNK je određivana u uzorcima merenjem apsorpcije na 260 nm i poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu, odnosno ispitivan stepen njene čistoće na talasnoj dužini 280 nm koja odgovara maksimalnoj apsorpciji aromatičnih amino kiselina. (Odnos $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu je korišćen spektrofotometar (GeneQuant pro, Amersham, USA).

3.6.2. Reverzna transkripcija

Izolovana ukupna RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevedena u cDNK. Iz uzoraka je uzimana ona zapremina koja sadrži 1 μ g rastvorene RNK i dopunjavana do 13 μ l demineralizovanom vodom sa 0,2 μ g heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci (Fermentas, Litvanija) i smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas) u količini koja odgovara finalnoj koncentraciji od 1 mM za svaki dNTP. Po mešanju, rastvorena RNK je denaturisana na 70°C 10 minuta, posle čega su uzorci hlađeni na ledu tokom 2 minuta. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 μ l pet puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5x Reaction buffer, Fermentas), 0.5 μ l inhibitora RNase (40 U/ μ l) (Thermo Scientific) i 1 μ l (200 U/ μ l) reverzne transkriptaze (RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas), uzorci su mešani i inkubirani na 25 °C, 15 minuta, a potom na 42 °C, 60 minuta. Na kraju, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 95 °C, 3 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na +4°C do dalje upotrebe. Reakcija reverzne transkripcije je izvedena u epruvetama od 200 μ l

(Eppendorf, Nemačka), a inkubacija na različitim temperaturama pomoću odgovarajućeg aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf). U cilju provere kontaminacije, u svakoj reakciji je korišćena i negativna kontrola koja je sadržavala sve reagense osim RNK.

3.6.3. Prajmeri i probe

TaqMan prajmeri i probe korišćeni u qRT-PCR reakciji naručeni su iz Life Technologies. Finalne koncentracije prajmera ispitivanih gena iznosile su 900 nM, a odgovarajućih proba 200 nM, za sve eseje. Za kontrolni *housekeeping* gen 18s rRNA finalna koncentracija prajmera je iznosila 475 nM, a odgovarajuće probe 200 nM. Obeleživači TaqMan proba koje su korišćene za umnožavanje i detektovanje cDNK bili su FAM za sve gene, izuzev za kontrolni *housekeeping* gen 18s rRNK gde je to VIC. Kataloški brojevi svih eseja navedeni su u tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri i probe korišćeni u PCR reakciji

	Gen	Kataloški broj		Gen	Kataloški broj
1.	IL-1	Rn00580432_m1	8.	TNF	Rn99999017_m1
2.	IL-12p35	Rn00584538_m1	9.	IL-1Ra	Rn02586400_m1
3.	IL-23p19	Rn00590334_g1	10.	GM-CSF	Rn01456850_m1
4.	IL-6	Rn01410330_m1	11.	IL-10	Rn00563409_m1
5.	IL-17A	Rn01757168_m1	12.	T-bet	Rn01461633_m1
6.	TGF-β1	Rn00572010_m1	13.	RORγt	Rn01533717_g1
7.	IFN-γ	Rn00594078_m1	14.	Foxp3	Rn01525092_m1

3.6.4. Kvantitativni PCR

Kvantitativni PCR je korišćen za analizu relativne ekspresije gena za proinflatorne i anti-inflatorne citokine, kao i transkripcione faktore. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bunara za kvantitativni PCR (MicroAmp

Optical 96-Well Reaction Plate, Life Technologies) i u svaki od bunara je naliveno po 10 μ l reakcione smeše, koja se sastojala od 5 μ l dva puta koncentrovanog komercijalnog master-miksa (2x TaqMan Gene Expression Master Mix, Life Technologies) i po 0.5 μ l mešavine specifičnih polinukleotida za gen od interesa odnosno za kontrolni *housekeeping* gen 18s rRNK (20x koncentrovana mešavina za svaki gen sadržavala je par prajmera *forward* i *reverse* i obeleženu probu). Potom je u svaki bunar dodavano po 4.5 μ l cDNK odgovarajućeg uzorka razblaženog 10 puta (20 μ l cDNK uzorka dobijenog u reverznoj transkripciji u 180 μ l demineralizovane vode). Optimalne koncentracije prajmera i proba za različite gene od interesa su određene od strane proizvođača, izuzev za kontrolni *housekeeping* gen, čije su optimalne koncentracije odrađene naknadno u laboratoriji. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Bunari su zatvoreni adhezivnim filmom (MicroAmp Optical Adhesive Film, Life Technologies), sadržaj bunara je oboren kratkotrajnim centrifugiranjem 1 minut na 3000 g, ploča je prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (Realplex Mastercycler, Eppendorf). Uslovi amplifikacije su bili sledeći: 2 minuta na 50 °C, zatim 10 minuta na 95 °C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali po 15 sekundi na 95 °C i 1 minut na 60 °C. Da bi se odredio nivo ekspresije ispitivanog gena, srednja vrednost Ct (threshold cycle) kontrolnog *housekeeping* gena je oduzeta od Ct vrednosti gena od interesa da bi se dobile Δ Ct vrednosti, pa je relativna ekspresija gena određena kao $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su predstavljeni u odnosu na vrednosti koje su dobijene u kontrolnim životinjama i koje su arbitrarno podešene na 1.

3.7. IMUNOBLOT ANALIZA

3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Sadržaj proteina je određivan u tkivu lumbalnog dela kičmene moždine eksperimentalnih životinja. Tkivo je najpre lizirano u puferu za liziranje (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40), u koji je dodat 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil florid), 1mM Na vanadat, 10mM NaF i koktel inhibitora proteaza (20 μ l/ml) (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) na ledu, u trajanju od 30 minuta, centrifugirano 15 minuta na 14000 g na +4°C, a supernatanti su izdvojeni za dalju analizu.

Koncentracija ukupnih proteina u lizatima je određivana metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Princip ovog testa se zasniva na promeni boje Coomassie Brilliant Blue G-250 iz crvene (u odsustvu proteina) u plavu (u prisustvu proteina) u kiseloj sredini, pri čemu se apsorbanca nastalih plavih jedinjenja meri na talasnoj dužini od 570 nm, a intenzitet razvijene plave boje je direktno srazmeran koncentraciji proteina u uzorku. Uzorci su razblaživani 1000 puta sa rastvorom 1x koncentrovane boje Coomassie Brilliant Blue G-25, da bi njihova apsorbanca bila u okviru konstruisane standardne krive (5-25 µg/ml eng. *bovine serum albumin*; BSA). Ovako konstruisana standardna kriva je korišćena za izračunavanje koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima.

3.7.2. Kvantifikacija ekspresije i fosforilacije proteina

Ekspresija i fosforilacija proteina u uzorcima homogenata KM i limfnih čvorova je određena imunoblot analizom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina. Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 min, 100°C) određene zapremine ukupnog tkivnog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptoetanol, 0.002% bromfenol plavo, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim molekulima SDS-a. Dodatkom 2-merkaptoetanela u puffer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS-u svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i međusobno su se razlikovali jedino po molekulskim masama što je iskorišćeno za njihovo elektroforetsko razdvajanje.

Proteini iz skuvanih uzoraka su zatim razdvojeni elektroforezom na osnovu razlika u molekulskim masama u 10% (za analizu kinaze Src (engl. *SRC proto-oncogene non-receptor tyrosine kinase*), Akt (engl. *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*), protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK), p70S6K (engl. *ribosomal protein*

S6 kinase), poli-ADP ribozomske polimeraze (PARP) i β -aktina), odnosno 8% poliakrilamidnom gelu za mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*). U bunare poliakrilamidnog gela su sipane jednake količine proteina (od 10 μ g do 50 μ g, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje proteina (4% akrilamid/0.14% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0.34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0.41% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8). Za ubrzanje polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare u kojima se odigrava elektroforeza se sastojao od 192 mM glicina, 0.1% SDS i 25m M Tris-HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 min. Prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su se kretali kroz gel do izlaska boje bromfenol plavo sa gela. U cilju praćenja kretanja ispitivanog proteina kroz gel, na svaki gel je nanet i marker koji predstavlja smešu referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska).

Posle završene elektroforeze proteini sa gela su odmah preneti na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) pomoću aparature za polusuvi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane su potapane 1-2 minuta u pufer za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir, koji je prethodno takođe natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela je smešten još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine (0.8 mA/cm^2 membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na tom putu ka anodi proteini su se zaustavljali na membrani. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi u trajanju od 90 minuta. Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) sa 0.05% Tween 20 deterdženta (u

kasnijem tekstu TBST), da bi se blokirala mesta nespecifičnog vezivanja proteina na membranama. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na temperaturi od +4°C uz blago mešanje, pri čemu su se antitela vezivala za odgovarajuće proteinske epitope. Korišćena su sledeća razblaženja primarnih antitela u rastvoru za blokiranje: 1:500 za anti-phospho (p)-Src, anti-p-Akt i anti-PARP; 1:800 za anti-p-p70S6K, 1:600 za anti-p-mTOR, 1:1000 za anti-p-AMPK i 1:2000 za anti- β -aktin. Nakon 3 ispiranja u TBST-u, membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom (1:1000 u rastvoru za blokiranje) 75 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta u TBST-u i prelivane 3 minuta sa supstratom za peroksidazu rena (ECL; GE Healthcare). U ovom koraku peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, je razgrađivala H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji je emitovao foton. Nastala svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), a intenzitet osvetljenja na rendgenskom filmu je bio direktno srazmeran količini proteina vezanog za membranu. Nakon razvijanja filma relativna optička gustina imunoreaktivnih traka je kvantifikovana pomoću programa *ImageJ*. Aktivnost ispitivanih proteina je izražena u odnosu na signal β -aktina.

3.8. HISTOLOŠKA ANALIZA

Hirurški izvađeni uzorci kičmene moždine pacova su fiksirani u 4% paraformaldehidu (PFA) i ukalupljeni u parafinu. Preseci tkiva (debljine 5 μ m) su potom deparafinizirani u ksilolu, dehidrirani u rastvorima alkohola rastuće koncentracije, i obojeni hematoksilin-eozinom (HE). Digitalni snimci preseka tkiva obojenih sa HE napravljeni su na fotomikroskopu Leica DM40000B LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka), koji je opremljen digitalnom kamerom (Leica DFC295) i softverom LAS 4.4. Morfometrijska analiza oblasti sa infiltratom mononuklearnih ćelija urađena je Fiji (ImageJ 1.49) softveru koristeći *tool*-opciju “analiza merenja”.

3.9. DETEKCIJA APOPTOZE *IN SITU*

Da bismo detektovali fragmentisanu DNK, koja je jedan od markera apoptotske smrti ćelija, korišćen je TUNEL esej, u kome TdT (terminalna dezoksinukleotidil transferaza) katalizuje dodavanje dUTP (dezoksiuridin trifosfat) nukleotida obeleženih markerom na krajeve fragmenata prekinute DNK. Ovaj esej je izveden na presecima lumbalnog dela kičmene moždine koji su fiksirani u paraformaldehidu, i ukalupljeni u parafinu. Posle deparafinizacije i permeabilizacije sa 0.2% Tritonom X-100, ćelije su tretirane sa 3% BSA i TUNEL-reakcionom mešavinom (Roche, Manhajm, Nemačka). U reakciji se anti-fluorescein antitelo obeleženo alkalnom fosfatazom vezuje za FITC-dUTP, a potom dodavanje precipitujućeg supstrata Fast red (Roche) omogućava vizuelizaciju signala na svetlosnom mikroskopu. Apoptotične ćelije, koje pokazuju granularno, crveno jedarno bojenje su brojane u 5 nasumično izabranih polja (x 200) na svakom ćelijskom preseku.

3.10. EKSPERIMENTI KOKULTIVACIJE

3.10.1. Kokultivacija ćelijskih linija OLN93 i PC12 sa limfocitima

Ćelijska linija oligodendrocita pacova OLN93 je dobijena ljubaznošću prof. Markusa Kipa (Institut za Neuroanatomiju, Medicinski fakultet, Ahen, Nemačka). Ćelije su održavane u medijumu za kultivaciju ćelija – DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium), koji je sadržao 5% FCS, i 1% penicilina/streptomicina (sve Sigma-Aldrich). Ćelijska linija feohromocitoma pacova PC12 je dobijena ljubaznošću dr. Andrijane Klajn (Institut za Molekularnu Genetiku i Genetičko Inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Srbija), i ove ćelije su gajene u DMEM medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (10 g/l), 10% konjskog seruma (Sigma-Aldrich), 5% *FetalClone III serum-a* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) i 1% penicilina/streptomicina. Suspenzije limfocita su dobijene iz cervikalnih limfnih

čvorova neimunizovanih ili drenirajućih (poplitealnih) limfnih čvorova pacova imunizovanih homogenatom KM. OLN93 i PC12 ćelije su ko-kultivisane sa limfocitima u *Corning Transwell 3460 System* pločama sa 12 bunara (Corning Inc. Life Sciences, Tewksbury, MA) pri čemu su OLN93 i PC12 ćelije zasejavane na dno bunara (3×10^5), dok su limfociti (1×10^6) zasejavani u plastične inserte sa permeabilnom membranom (pore dijametra $0.4 \mu\text{m}$). OLN93 i PC12 ćelije su preinkubirane sa arilpiperazinima ($10 \mu\text{M}$) u trajanju od jednog sata, a potom su limfociti stimulisani mitogenom T ćelija konkanavalinom A (ConA, $5 \mu\text{g/ml}$) tokom 48 h, ili mijelin baznim proteinom zamorca (MBP, $10 \mu\text{g/ml}$) (sve Sigma-Aldrich) tokom 72 h. Koncentracija arilpiperazina ($10 \mu\text{M}$) je izabrana na osnovu prethodne studije u kojoj je pokazano da ova koncentracija ne ispoljava nikakav toksičan efekat na humanu SH-SY5Y neuronsku ćelijsku liniju (Tovilovic i sar., 2012). Kontrolne ćelije su inkubirane sa odgovarajućom količinom rastvarača (DMSO).

3.10.2. Određivanje ćelijskog vijabiliteta

Po isteku ko-kultivacije OLN93 i PC12 ćelija sa netretiranim (kontrola) i stimulisanim limfocitima u pristvu ili bez arilpiperazina uklanjani su inserti sa limfocitima i vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija je određivan MTT testom. Princip ove metode se zasniva na merenju kolorimetrijske reakcije posredovane dehidrogenazama mitohondrija, do koje dolazi redukcijom MTT-a (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) u ljubičasti formazan. MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija, pa je ovaj kolorimetrijski test pogodan za merenje broja vijabilnih. Nakon završetka kultivacije i uklanjanja medijuma u bunare je nalivano po $50 \mu\text{l}$ rastvora MTT ($0,5 \text{ mg/ml}$), koji je inkubiran tokom 1 sata. Supernatanti su zatim odlivani, a ćelije lizirane sa DMSO, koji ujedno služi i za rastvaranje nerastvornog formazana, pri čemu se u bunarima razvijala karakteristična ljubičasta boja, čiji je intenzitet određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost absorbancije srazmerni su broju živih ćelija. Rezultati su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrole koji je arbitrarno postavljen na 100%.

3.11. STATISTIČKE ANALIZE

Rezultati ove teze dobijeni u više nezavisnih eksperimenata su predstavljeni kao srednje vrednosti (SV) \pm standardna devijacija (SD). U pojedinim priložima su rezultati prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od nekoliko ponovljenih eksperimenata sa sličnim ishodom. Za procenu značajnosti razlika nezavisnih uzoraka korišćeni su Studentov t-test ili jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI

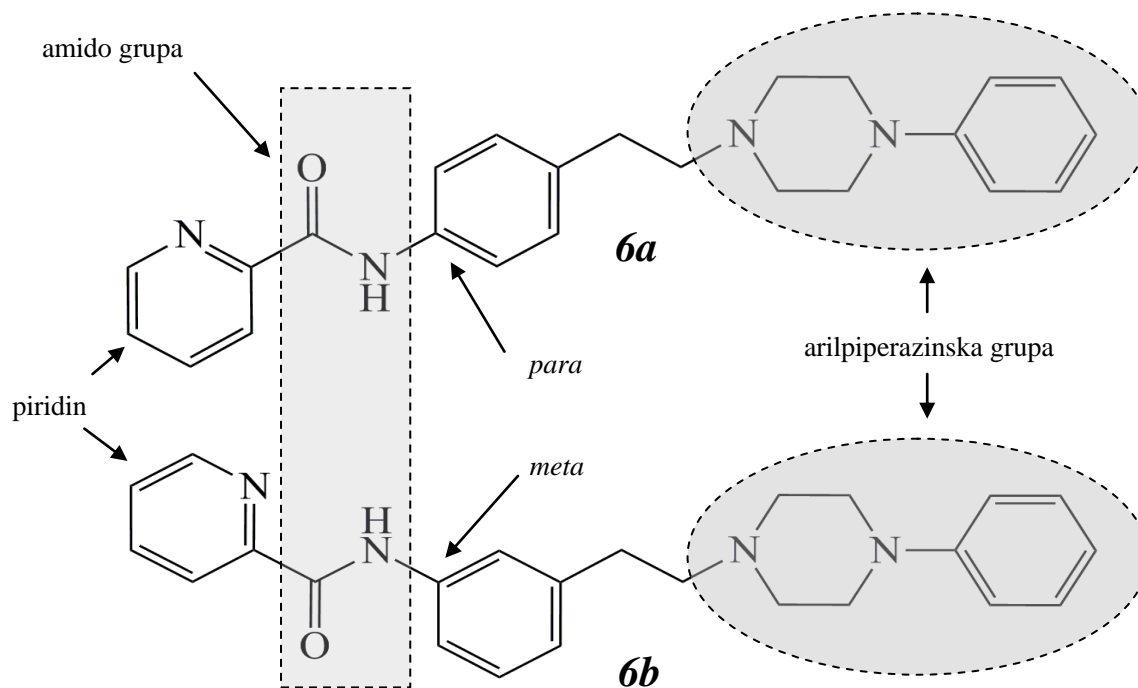
4.1. ISPITIVANJE UTICAJA KONTINUIRANOG TRETMANA ARILPIPERAZINIMA NA KLINIČKE ZNAKE EAE-a

4.1.1. Ispitivanje znaka akutne toksičnosti i moguće interferencije sa kliničkim znacima EAE-a u tretmanu arilpiperazinima 6a i 6b

Derivati arilpiperazina, N-{4-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid (označen kao arilpiperazin **6a**), i N-{3-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid, (označen kao arilpiperazin **6b**), koji su ispitivani u ovoj tezi, sintetisani su u grupi profesora Vukića Šoškića (ProteoSys AG, Majnc, Nemačka) i njihove hemijske strukture prikazane su na Slici 1. Ova dva jedinjenja se međusobno razlikuju jedino po položaju amido grupe (Ar-CONH-R), koja se kod jedinjenja **6a** nalazi u *para* položaju, dok se kod jedinjenja **6b** nalazi u *meta* položaju benzenovog prstena u odnosu na arilpiperazinski ostatak. Konstante inhibicije (K_i), kao mere afiniteta ovih arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada za humane dopaminske D2 receptore i serotoninске 5HT_{1A} receptore određene su u prethodnoj studiji i iznosile su 1400 nM i 304.9 nM za **6a** derivat, odnosno 71.6 nM i 2.4 nM za **6b** derivat, pri čemu niža vrednost K_i ukazuje na viši afinitet vezivanja derivata za receptor (Sukalovic i sar., 2013).

Polazeći od skorijeg istraživanja u kome je pokazano da među 19 nedavno sintetisanih arilpiperazina, derivati **6a** i **6b** ispoljavaju najpotentnije neuroprotektivno dejstvo *in vitro* (Tovilovic i sar. 2013), u cilju ispitivanja njihovog potencijalnog protektivnog delovanja u *in vivo* modelu EAE-u, bilo je neophodno prethodno ispitati da li ova jedinjenja ispoljavaju znake akutne toksičnosti *in vivo*, kod eksperimentalnih pacova soja DA. U tom cilju praćeno je ispoljavanje znaka akutne toksičnosti (poremećaji disanja, nemogućnost porasta telesne mase, anoreksija, slabost, gubitak uobičajenog interesovanja/ponašanja, i smrt) kod neimunizovanih životinja koje su

tretirane sa oba jedinjenja. Pored ovih znaka ispitivali smo da li ova jedinjenja ispoljavaju i efekte koji bi mogli da odgovaraju tipičnim kliničkim znacima EAE-a, kao što su: ukočenost, smirenost, i promena u tonusu repa.



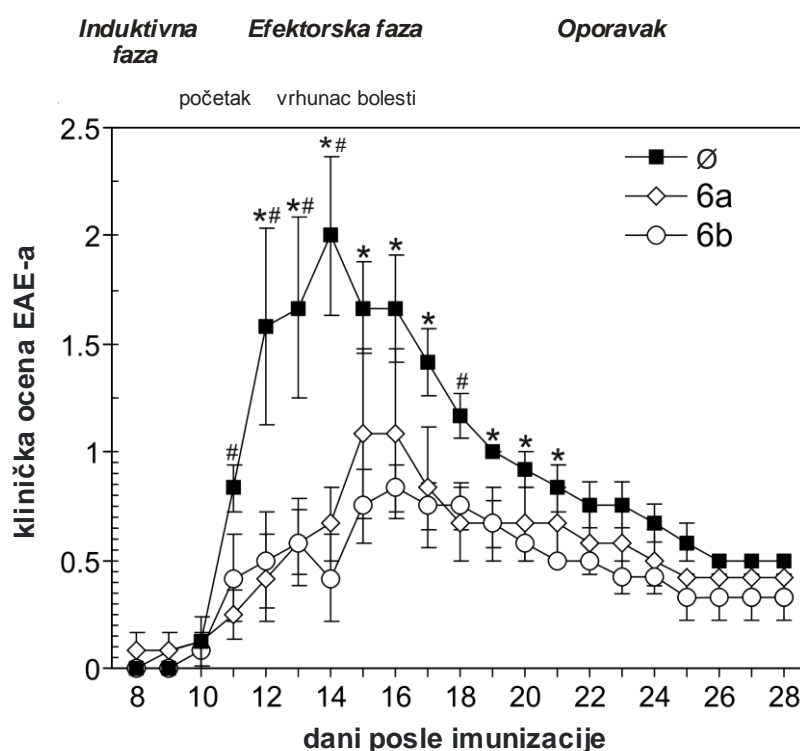
Slika 1. Hemijske strukture arilpiperazina 6a i 6b. Oba jedinjenja imaju identičnu molekulsku formulu, jedina razlika jeste položaj amido grupe koja se kod 6a derivata nalazi u para položaju dok se kod 6b derivata nalazi u meta položaju benzenovog prstena.

Derivati arilpiperazina su rastvarani najpre u sterilnom DMSO-u a potom je postepeno dodavan sterilan PBS do finalne zapremine od 500 μ l po pacovu u ultrazvučnom sonifikatoru MSE Soniprep 150 (intenzitet 10) tri puta po 30 sekundi sa pauzama od po 30 sekundi između svakog sonifikovanja. Na kraju je pH vrednost rastvora podešena na 7 sa KOH. Intraperitonealno primenjene doze veće od 20 mg/kg su kod nekih životinja izazivale bolno uvlačenje stomaka, usled čega je za dalje eksperimente korišćena doza od 10 mg/kg, koja nije ispoljavala znake akutne toksičnosti, niti ikakva očigledna neželjena dejstva niti kod jedne životinje. Pored toga, ovim početnim ogledom je, pažljivim posmatranjem tretiranih životinja, ustanovljeno da ispitivani derivati

arilpiperazina ne ispoljavaju nikakve efekte koji bi odgovarali kliničkim znacima koji se obično prate u EAE-u, te da se mogu koristiti u daljim eksperimentima.

4.1.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na klinički tok EAE-a u kontinuiranom tretmanu

Da bi se utvrdilo da li arilpiperazini **6a** i **6b** ispoljavaju efekat u animalnom modelu MS-a u kontinuiranom tretmanu, eksperimentalnim životinjama je indukovan EAE imunizacijom sa homogenatom KM u KFA. Pacovi su svakodnevno tretirani arilpiperazinima **6a** i **6b** počevši od dana imunizacije pa sve do kraja eksperimenta (ukupno 28 dana).



Slika 2. Arilpiperazini snižavaju kliničke znake EAE-a u kontinuiranom tretmanu. Pacovi su tretirani svakodnevno PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa), ili arilpiperazinima **6a** i **6b** (10 mg/kg) od prvog dana imunizacije homogenatom KM u KFA (0. dan) do kraja eksperimenta (28. dan). Broj životinja po grupi je bio 8. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, gde * $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinom **6b**, dok # $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinom **6a** u odgovarajućem vremenskom trenutku.

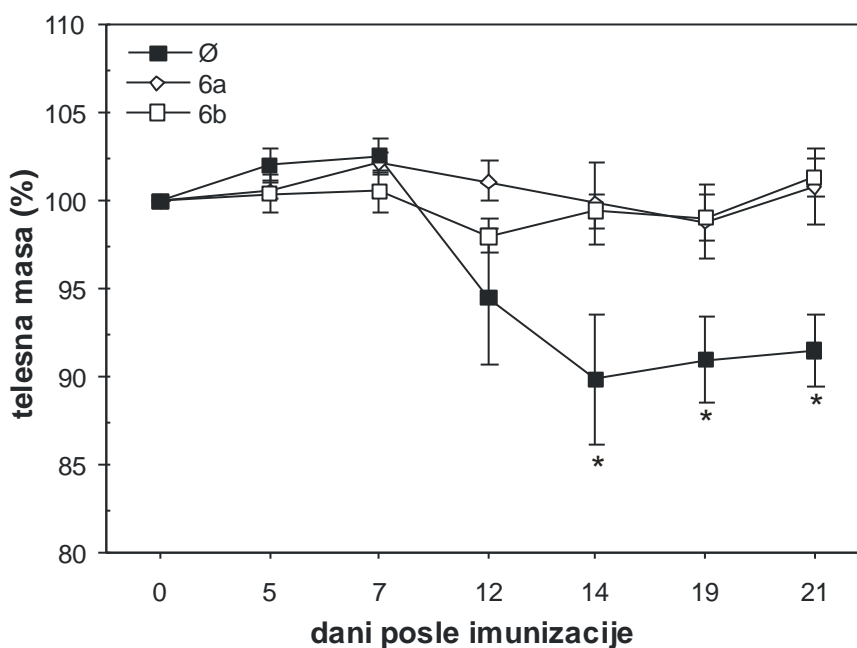
Imunizovane životinje su razvile klasičnu akutnu, monofaznu bolest, koja se sastojala od induktivne faze bez vidljivih simptoma (od 0. do 8-9. dana posle imunizacije), efektorske faze (od oko 9. dana pa na dalje, sa vrhuncom bolesti oko 14. dana posle imunizacije), i faze oporavka (od oko 18. dana posle imunizacije pa do kraja eksperimenta) (Slika 2). EAE se odlikovao tipičnom kliničkom slikom koja se manifestovala smanjenim tonusom repa, parezom ili paralizom zadnjih ekstremiteta. Kao što je prikazano na Slici 2, oba tretmana su statistički značajno snižavali kliničke manifestacije EAE-a u više vremenskih tačaka, pri čemu je **6b** derivat ispoljavao nešto izraženiji protektivni efekat. Obzirom da se klinička ocena nije značajno menjala od 22. do 28. dana, trajanje narednih eksperimenata je skraćeno na 21 dan, da bi se izbegla nepotrebna patnja eksperimentalnih životinja. Dodatne analize su pokazale da je prosečna zbirna klinička ocena bila značajno niža u grupi životinja tretiranih arilpiperazinima u odnosu na EAE kontrole (Tabela 1). Prosečna najveća ocena je takođe bila snižena pod dejstvom arilpiperazina, ali je razlika bila statistički značajna samo za **6b** (Tabela 1). Slično, početak bolesti je bio značajno odložen kod pacova tretiranih sa **6b**, dok ova razlika nije bila značajna u tretmanu arilpiperazinom **6a** (Tabela 1). Zbog izraženije efikasnosti derivat **6b** je češće korišćen u narednim eksperimentima.

Tabela 1. Uticaj arilpiperazina na kliničke parametre EAE-a. Pacovi imunizovani homogenatom KM u KFA su tretirani svakodnevno sa PBS/DMSO (kontrolna grupa, n=8), ili arilpiperazinima **6a** i **6b** (sa dozom od 10 mg/kg, n=8 po grupi). Bolest je praćena svakodnevno i računati su klinički parametri (*p<0.05).

	Zbirna klinička ocena	Najveća klinička ocena	Dan početka EAE-a
kontrola	19.3 ± 2.0	2.1 ± 0.4	10.5 ± 0.2
6a	11.2 ± 2.0*	1.2 ± 0.4	11.8 ± 1.0
6b	9.5 ± 2.0*	0.8 ± 0.1*	12.7 ± 1.0*

4.1.3. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na promenu telesne mase životinja u EAE-u u kontinuiranom tretmanu

Poznato je da se kod eksperimentalnih životinja kojima je indukovano EAE, kao jedan od kliničkih znaka bolesti, javlja i gubitak telesne mase (Xu i sar. 2000), pa je sledeće ispitivano da li arilpiperazini **6a** i **6b** deluju na održanje telesne mase eksperimentalnih životinja. U tom cilju, DA pacovi su imunizovani homogenatom KM u KFA i svakodnevno tretirani i.p. arilpiperazinima **6a** i **6b** počevši od dana imunizacije pa sve do kraja eksperimenta (ukupno 21 dan), uz praćenje telesne mase. Analiza promene telesne mase životinja je pokazala da tretman arilpiperazinima sprečava gubitak telesne mase (Slika 3), koji obično prati EAE, potvrđujući i na taj način protektivno dejstvo ovih jedinjenja.

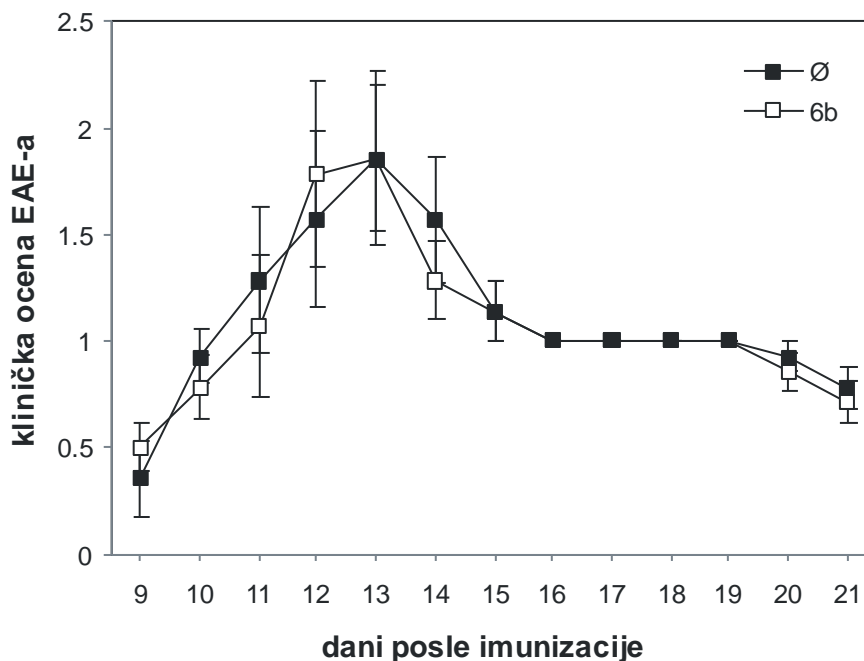


Slika 3. Arilpiperazini 6a i 6b sprečavaju gubitak telesne mase u EAE-u. Pacovi su tretirani svakodnevno PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa), ili arilpiperazinima **6a** i **6b** (10 mg/kg) od prvog dana imunizacije homogenatom KM u KFA (0. dan) do kraja eksperimenta (21. dan). Broj životinja po grupi je bio 8. Rezultati su predstavljeni kao procenat promene telesne mase u odnosu na 0. dan u vidu srednje vrednosti \pm SD, dok * $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinima u odgovarajućem vremenskom trenutku.

4.2. UTICAJ TRETMANA ARILPIPERAZINIMA TOKOM INDUKTIVNE I EFEKTORSKE FAZE BOLESTI NA KLINIČKE ZNAKE EAE-a

4.2.1. Uticaj arilpiperazina 6b na kliničke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana u induktivnoj fazi bolesti

Da bi se detaljnije ispitaio mehanizam kojim arilpiperazin **6b** ostvaruje svoj protektivan efekat na EAE, pristupili smo ispitivanju faze bolesti u kojoj se taj efekat ostvaruje.



Slika 4. Tretman arilpiperazinom 6b tokom induktivne faze bolesti nema efekta na EAE. Pacovi su tretirani svakodnevno PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa) ili arilpiperazinom **6b** (10 mg/kg) od prvog dana imunizacije homogenatom KM u KFA (0. dan) do sedmog dana od dana imunizacije (induktivna faza). Broj životinja po grupi je bio 8. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD.

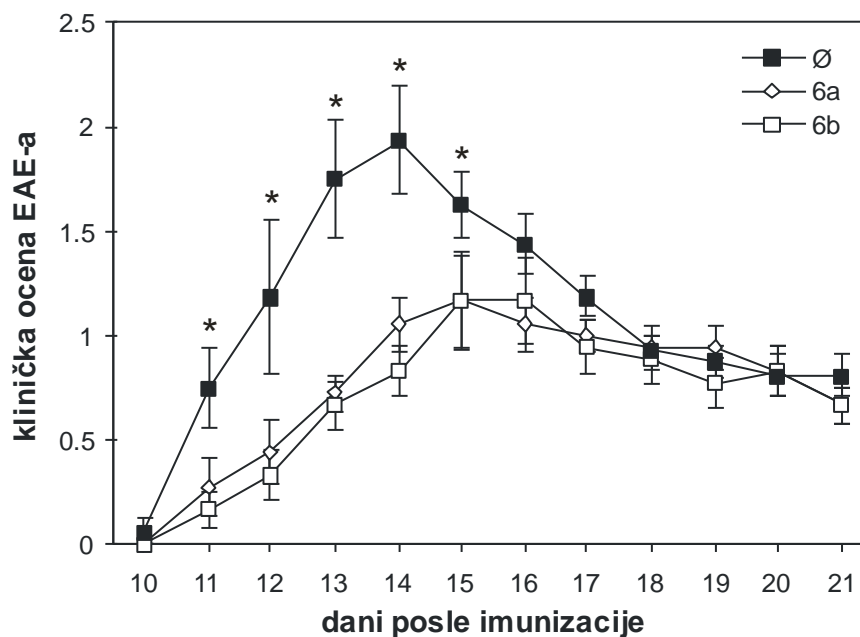
U tom cilju, životinje kojima je indukovano EAE svakodnevno su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 mg/kg) tokom prvih sedam dana po imunizaciji, odnosno tokom induktivne faze bolesti. Za razliku od kontinuiranog tretmana (počevši od dana

imunizacije – 0. dan do kraja eksperimenta - 28. dan) nikakav zaštitni efekat na kliničko ispoljavanje EAE-a nije primećen kod pacova tretiranih arilpiperazinom **6b** u prvih sedam dana, tj. tokom induktivne faze EAE-a (Slika 4). Rezultati ovog eksperimenta ukazuju na to da ispitivani derivat najverovatnije ne interferira sa osnovnim procesima induktivne faze bolesti, kao što su prepoznavanje i obrada antigena, kao i aktivacija, proliferacija i diferencijacija limfocita u efektorske ćelije, već svoj efekat verovatno ostvaruje tokom efektorske faze bolesti.

4.2.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na kliničke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana u efektorskoj fazi bolesti

Da bi se ispitalo da li arilpiperazini svoj pozitivan efekat na kliničke znake EAE-a ostvaruju u efektorskoj fazi bolesti, životinje kojima je indukovano EAE su svakodnevno tretirane arilpiperazinima (10 mg/kg) selektivno od osmog do 21. dana po imunizaciji, odnosno prevažodno tokom efektorske faze EAE-a. Nasuprot prethodnom eksperimentu, kada su eksperimentalne životinje tretirane arilpiperazinima **6a** ili **6b** tokom efektorske faze bolesti primećena je mnogo blaža forma EAE-a. Naime, rezultati su pokazali da arilpiperazini statistički značajno smanjuju kliničke manifestacije EAE delujući u efektorskoj fazi bolesti (Slika 5), u kojoj inače dolazi do ispoljavanja neuroloških nedostataka. Pojava prvih kliničkih znakova bolesti bila je odložena ($12,3 \pm 0,3$ dan u tretmanu u odnosu na $11,3 \pm 0,3$ u kontrolnoj grupi), prosečna kumulativna ocena ($8,4 \pm 1,1$ u tretmanu u odnosu na $13,4 \pm 1,2$ u kontroli) i prosečna maksimalna ocena kliničkih znakova ($1,3 \pm 0,2$ u tretmanu u odnosu na $2,0 \pm 0,2$ u kontroli) su bile niže u odnosu na kontrolne EAE pacove ($p < 0,05$). U skladu sa odloženim početkom bolesti, bolest je u grupi pacova tretiranih arilpiperazinima dostizala vrhunac kasnije (15-16. dan) u odnosu na kontrolne životinje (13-14. dan) (Slika 5).

Zaštitni efekat arilpiperazina tokom efektorske, ali ne i tokom induktivne faze bolesti, ukazuje na to da ovi derivati možda direktno utiču na sprečavanje oštećenja CNS-a posredovanog autoimunskim odgovorom, pre nego da utiču na aktivaciju i proliferaciju autoreaktivnih ćelija u EAE-u.

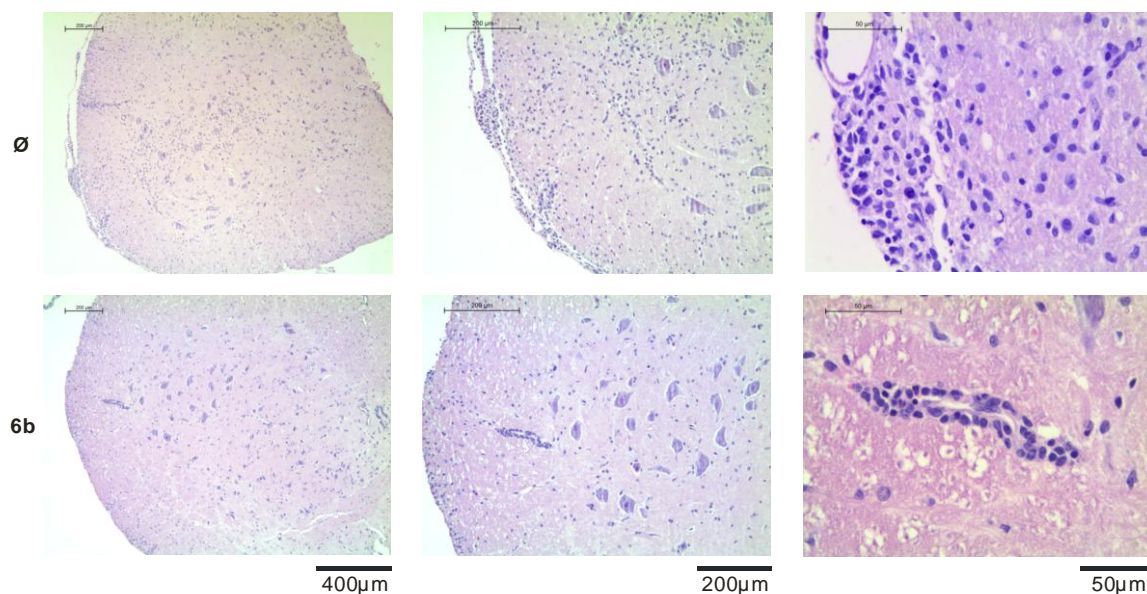


Slika 5. Tretman arilpiperazinima 6a i 6b tokom efektorske faze bolesti smanjuje kliničke znake EAE-a. Pacovi (n=8 po grupi) su tretirani svakodnevno PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa) ili arilpiperazinima **6a/6b** (10 mg/kg) od 8. dana imunizacije u KFA do 21. dana od dana imunizacije. Broj životinja po grupi je bio 8. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD, dok *p<0.05 označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinima u odgovarajućem vremenskom trenutku.

4.3. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA INFILTRACIJU IMUNSKIH ČELIJA U CNS U EAE-u

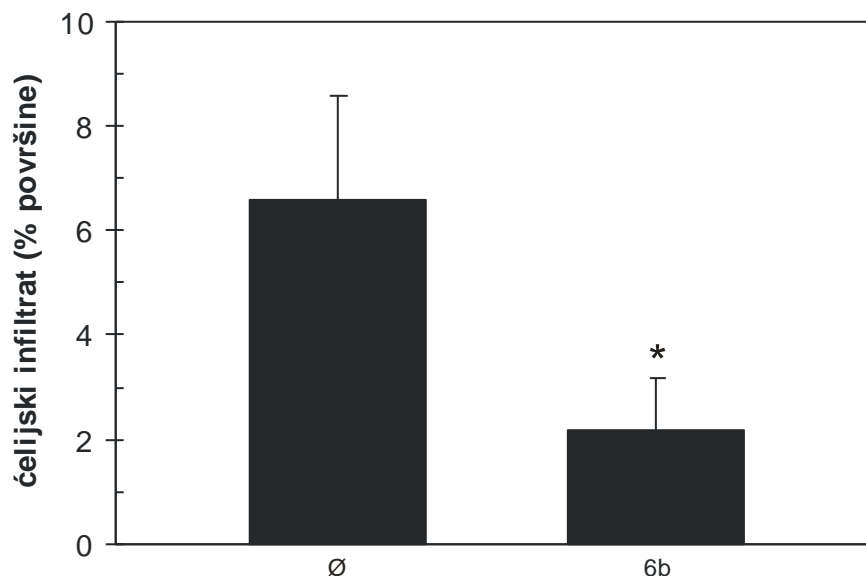
4.3.1. Uticaj arilpiperazina 6b na infiltraciju imunskih ćelija u CNS u piku EAE-a

Da bi se utvrdilo da li je blaža klinička slika u grupi životinja tretiranih arilpiperazinima praćena i smanjenom infiltracijom ćelija u CNS obolelih životinja, 14. dana bolesti izvršena je analiza preseka lumbalnog dela kičmene moždine obojenih hematoksilinom i eozinom. Mikroskopska analiza preseka kičmene moždine je pokazala



Slika 6. Tretman arilpiperazinima smanjuje infiltraciju imunskih ćelija u CNS životinja obolelih od EAE-a. Preseci lumbalnog dela kičmene moždine 14. dana bolesti analizirani su HE bojenjem radi utvrđivanja prisustva infiltrata imunskih ćelija kod imunizovanih životinja tretiranim ili netretiranim arilpiperazinom **6b** (10 mg/kg).

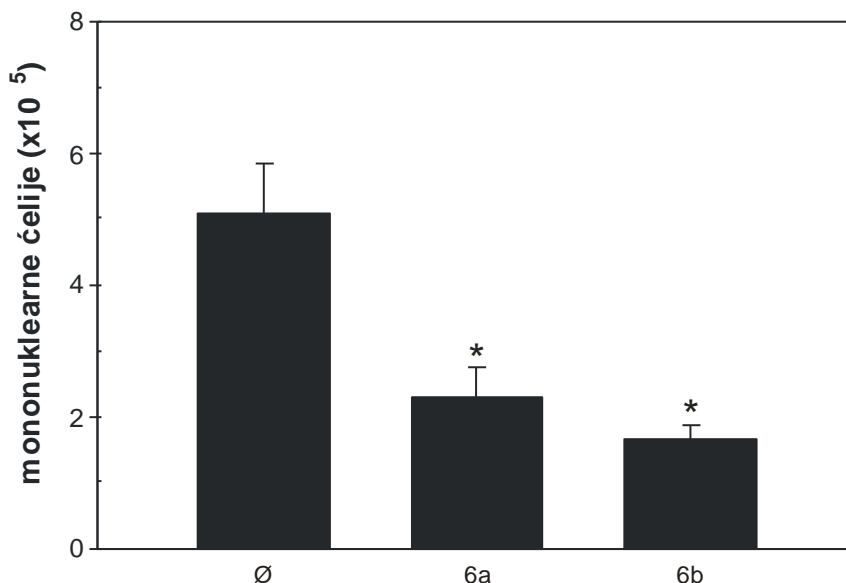
masovnu subpialnu/perivaskularnu infiltraciju ćelija kod imunizovanih životinja obolelih od EAE-a (Slika 6). Inflamatorne ćelije su bile prisutne u prednjim rogovima kičmene moždine kao i u beloј masi, dok je analiza na većem uveličanju pokazala da se infiltrati sastoje u glavnom od mononuklearnih ćelija i ponekog neutrofila (Slika 6). Perivaskularni ćelijski infiltrati, kao i oni u površinskim delovima bele mase, bili su manji kod pacova tretiranih arilpiperazinom **6b**. U skladu sa time, morfometrijska analiza je pokazala da je površina preseka kičmene moždine koja je bila infiltrirana inflamatornim ćelijama bila manja kod životinja tretiranih arilpiperazinima (Slika 7). Dakle, može se zaključiti da arilpiperazini svoj protektivan efekat ostvaruju smanjivanjem infiltracije imunskih ćelija u CNS tokom EAE-a.



Slika 7. Morfometrijska analiza preseka kičmene moždine ukazuje na smanjenu površinu ćelijskog infiltrata u CNS-u životinja tretiranih arilpiperazinima. Preseci lumbalnog dela kičmene moždine imunizovanih životinja tretiranih i netretiranih arilpiperazinima (n = 5 po grupi) 14. dana bolesti su podvrgnuti morfometrijskoj analizi. Broj životinja po grupi je bio 5. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD, dok *p<0.05 označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinima.

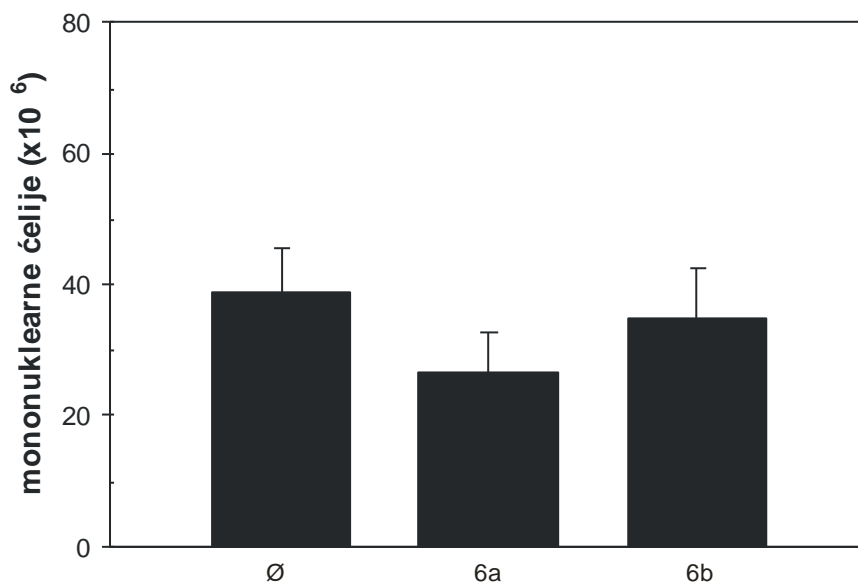
4.3.2. Uticaj arilpiperazina na brojnost mononuklearnih ćelija u CNS-u i drenirajućim limfnim čvorovima u EAE-u

U cilju potvrđivanja nalaza sa mikroskopskih preseka kičmene moždine, eksperimentalne životinje su žrtvovane u vrhuncu bolesti (14.dan), i nakon perfuzije kičmene moždine, iz homogenata KM su izolovane mononuklearne ćelije koje su infiltrirale tkivo CNS-a da bi se utvrdila njihova brojnost. Kao što je prethodno pokazano histohemijskom analizom, i brojanjem izolovanih ćelija je primećeno značajno smanjenje broja mononuklearnih ćelija infiltriranih u CNS kod pacova tretiranih arilpiperazinima **6a** i **6b**, u odnosu na kontrolnu grupu imunizovanih životinja (Slika 8).



Slika 8. Tretman arilpiperazinima smanjuje broj mononuklearnih ćelija infiltriranih u CNS. Iz perfundovanih kičmenih moždina imunizovanih životinja tretiranih ili netretiranih arilpiperazinima (n = 5 po grupi) izolovane su infiltrirane mononuklearne ćelije čiji broj je određivan brojanjem u hemocitometru. Rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$, dok * $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinima.

Ovo smanjenje inflamacije i infiltracije imunskih ćelija u CNS je u skladu sa odloženim počekom pojave prvih kliničkih znaka kao i blažom kliničkom slikom EAE-a u grupi pacova tretiranih arilpiperazinima. Sa druge strane, kada je posmatrana brojnost mononuklearnih ćelija u drenirajućim (poplitealnim) limfnim čvorovima nije primećena statistički značajna promena broja ćelija između životinja tretiranih arilpiperazinima i kontrolnih imunizovanih, netretiranih životinja (Slika 9). Ovakvi podaci navode na zaključak da ispitivani arilpiperazini svoje povoljno dejstvo na kliničke manifestacije EAE-a ostvaruju centralno, a ne periferno, i to utičući na smanjivanje broja infiltriranih patogenih ćelija imunskog sistema unutar CNS-a kod obolelih životinja koje su tretirane arilpiperazinima.



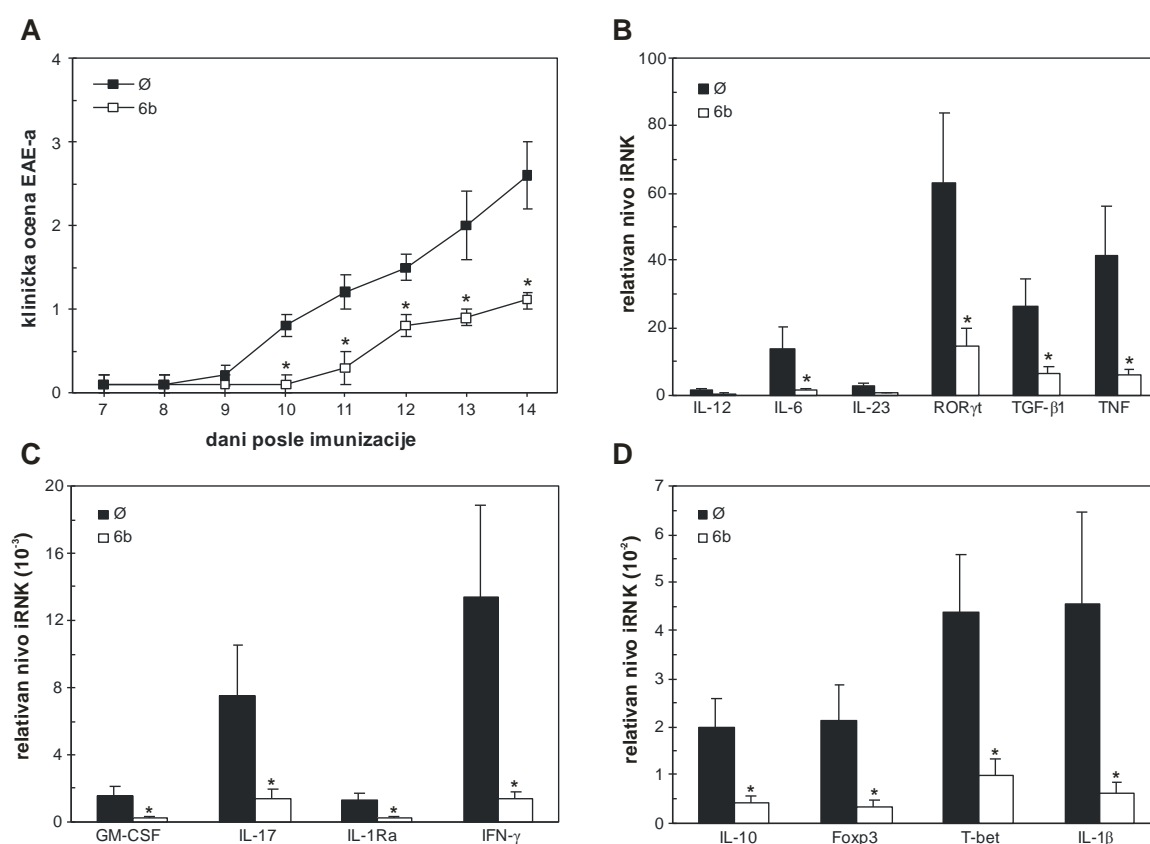
Slika 9. Tretman arilpiperazinima ne utiče na broj mononuklearnih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima. Iz drenirajućih (poplitealnih) limfnih čvorova imunizovanih životinja tretiranih ili netretiranih arilpiperazinima (n = 5 po grupi) izolovane su mononuklearne ćelije čiji broj je određivan brojanjem u hemocitometru. Rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$.

4.4. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA EKSPRESIJU INFLAMATORNIH MEDIJATORA U CNS-u I INFILTRATU MONONUKLEARNIH ĆELIJA U EAE-u

4.4.1. Uticaj arilpiperazina 6b na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u tkivu CNS-a u piku EAE-a

Ravnoteža između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina, kao glavnih posrednika u komunikaciji između imunskih ćelija, neposredno određuje započinjanje, tok, kao i krajnji ishod normalnog imunskog odgovora, ali i onog koji je usmeren na antigene sopstvenog organizma kao što je slučaj u EAE-u i MS-u. Stoga je bilo važno ispitati kakav je uticaj arilpiperazina na ekspresiju inflamatornih medijatora/regulatora u tkivu CNS-a (Slika 10). U tom cilju, u tkivu kičmene moždine imunizovanih životinja (kontrola) i onih tretiranih arilpiperazinom **6b** analiziran je nivo iRNK za

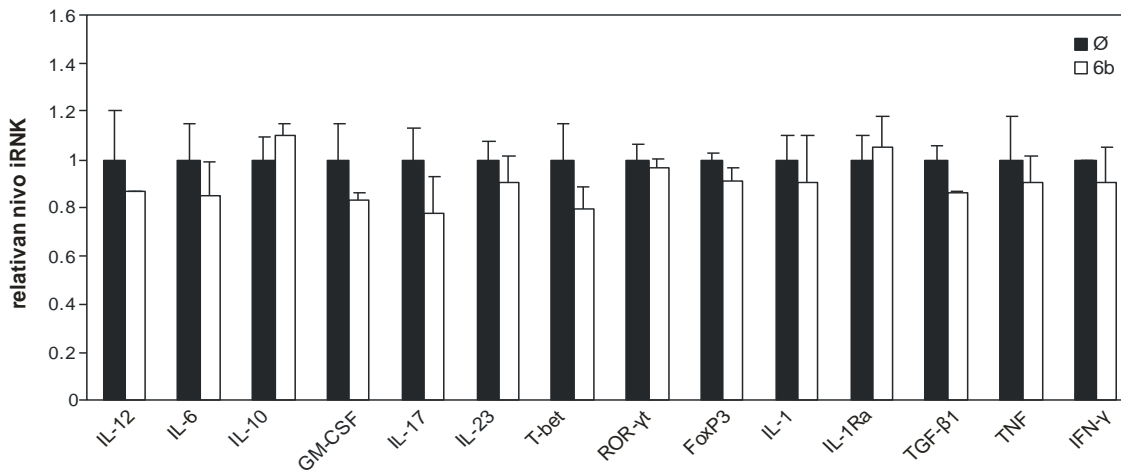
proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1 i GM-CSF, Th1 citokine IL-12 i IFN- γ , Th17 citokine IL-23 i IL-17, antiinflamatorne/imunosupresivne citokine i medijatore kao što su IL-10, TGF- β , i IL-1Ra, kao i za transkripcione faktore ključne u polarizaciji Th1 ćelija (T-bet), Th17 ćelija (ROR γ t) i regulatornih T ćelija (Foxp3). U skladu sa smanjenjem težine kliničke slike bolesti (Slika 10 A) rezultati *qRT-PCR-a* su pokazali da tretman arilpiperazinom **6b** značajno snižava ekspresiju iRNK svih inflamatornih medijatora izuzev IL-12 i IL-23 u tkivu CNS-a 14. dana posle imunizacije, odnosno u vrhuncu bolesti (slike 10 B, C, D).



Slika 10. Arilpiperazini smanjuju ekspresiju iRNK inflamatornih medijatora u CNS-u. (A) Imunizovani pacovi su tretirani PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa) ili arilpiperazinom **6b** (10 mg/kg) svakog dana (n = 8 po grupi), a klinički znaci EAE-a su praćeni sve do vrhunca bolesti (14. dan). (B-D) Ekspresija iRNK za različite proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore i transkripcione faktore u vrhuncu bolesti (14. dan) je analizirana *qRT-PCR*-om u tkivu lumbalnog dela kičmene moždine kontrolnih i tretiranih životinja. Rezultati (SV + SD) su predstavljani kao odnos ekspresije iRNK posmatranog gena odgovarajuće grupe životinja i ekspresije iRNK kod zdravih životinja, koja je arbitrarno postavljena na 1 (* $p < 0.05$ označava statističku značajnost razlike kontrole u odnosu na tretman arilpiperazinima).

4.4.2. Uticaj arilpiperazina **6b** na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u mononuklearnim ćelijama infiltriranim u CNS u EAE-u

Sledeći cilj bio je da se ispita da li je smanjenje ekspresije inflamatornih medijatora u CNS-u obolelih životinja pod dejstvom arilpiperazina posledica smanjene infiltracije ili promene u produkciji ovih medijatora. Analiza nivoa iRNK za proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1, i GM-CSF, Th1 citokine IL-12 i IFN- γ , Th17 citokine IL-23 i IL-17, antiinflamatorne/imunosupresivne medijatore kao što su IL-10, TGF- β , i IL-1Ra, kao i za transkripcione faktore ključne u polarizaciji Th1 ćelija (Tbet), Th17 ćelija (ROR γ t) i regulatornih T ćelija (Foxp3) u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz CNS-a, nije pokazala statistički značajne razlike između kontrolnih i životinja tretiranih arilpiperazinom **6b** (Slika 11). U kontekstu prethodno dobijenih rezultata, ovi rezultati ukazuju na to da je smanjenje u ekspresiji proinflamatornih/antiinflamatornih medijatora u CNS-u životinja tretiranih arilpiperazinima najverovatnije posledica smanjene infiltracije mononuklearnih ćelija, a ne promene u ekspresiji gena za ove medijatore.

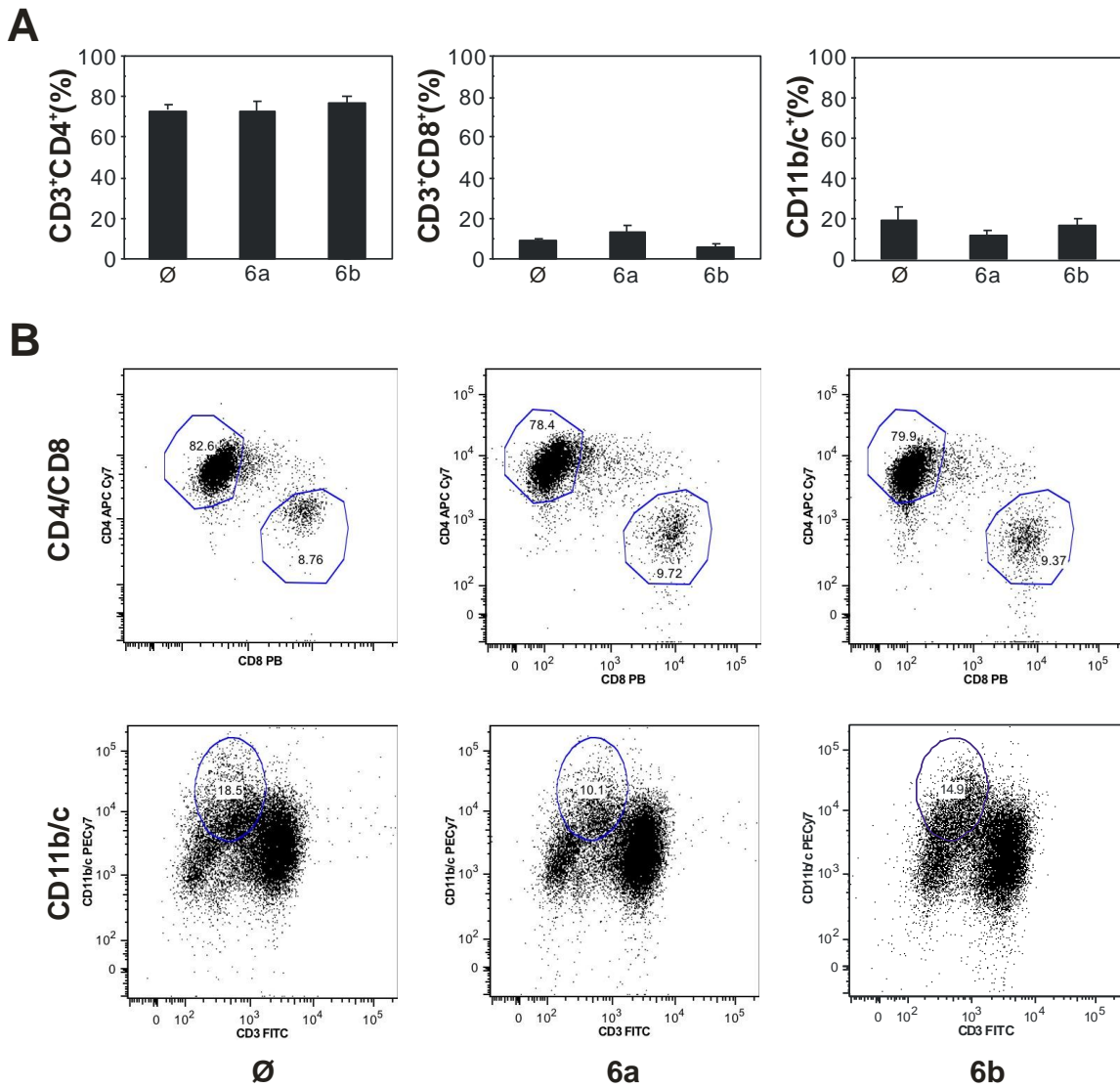


Slika 11. Arilpiperazini ne utiču na ekspresiju iRNK inflamatornih medijatora u mononuklearnim ćelijama infiltriranim u CNS. Imunizovani pacovi su (n = 8 po grupi) tretirani PBS-om/DMSO-om (kontrolna grupa) ili arilpiperazinom **6b** (10 mg/kg) a klinički znaci EAE-a su praćeni do 14. dana bolesti. Ekspresija iRNK za različite proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore i transkripcione faktore u vrhuncu bolesti (14. dan) je analizirana *qRT-PCR*-om u izolovanim infiltriranim MNČKM kontrolnih i tretiranih životinja. Rezultati (SV + SD) su predstavljeni kao odnos ekspresije iRNK posmatranog gena odgovarajuće grupe životinja i ekspresije iRNK kontrolnih imunizovanih životinja, koja je arbitrarno postavljena na 1.

4.5. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA ZASTUPLJENOST ĆELIJSKIH POPULACIJA I NJIHOVU PROIZVODNJU CITOKINA U INFILTRATU MONONUKLEARNIH ĆELIJA U EAE-u

4.5.1. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, i CD11b/c⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija u piku EAE-a

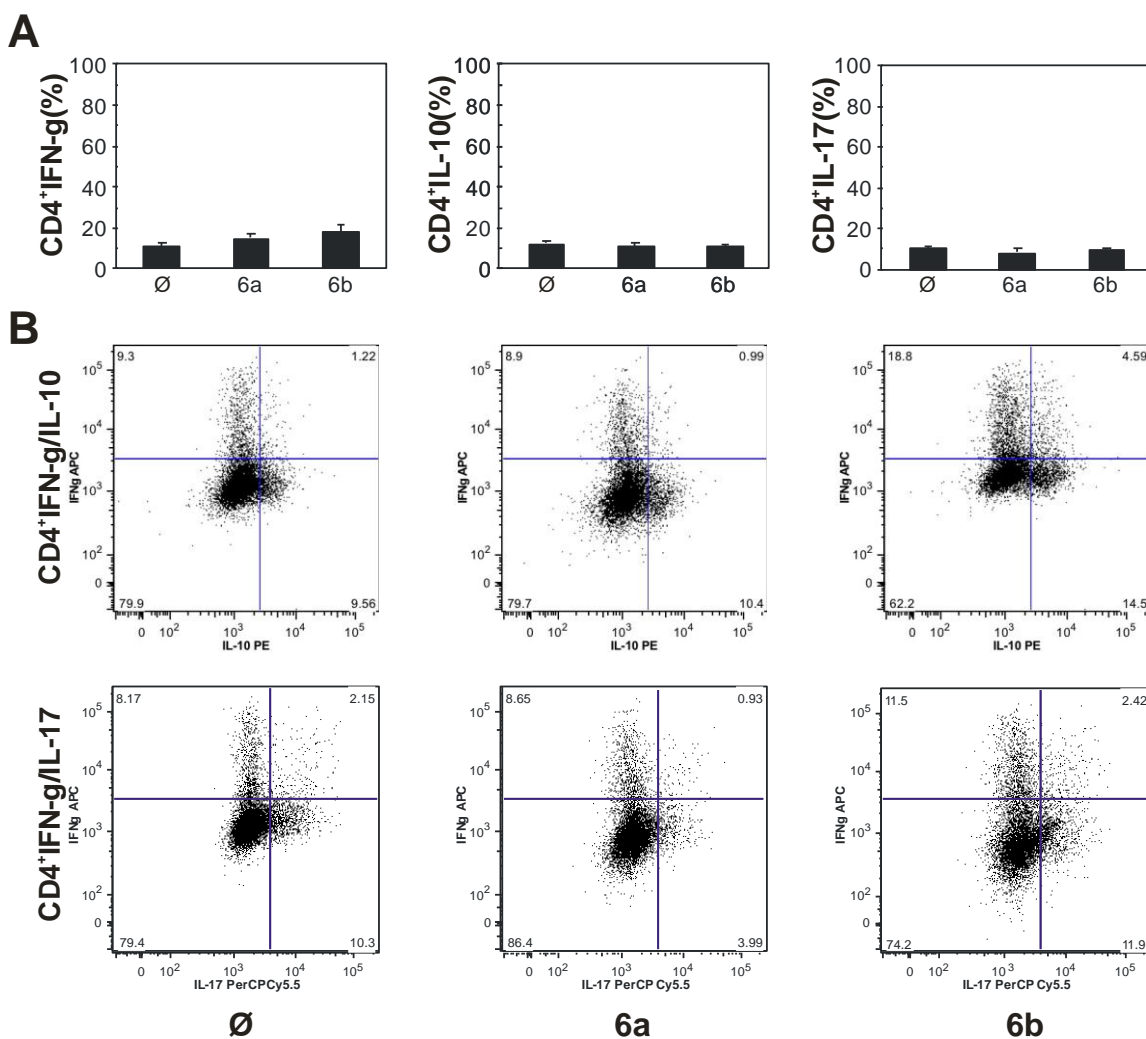
U jednom od prethodnih rezultata je pokazano da tretman arilpiperazinima **6a** i **6b** kod životinja kojima je indukovano EAE dovodi do smanjene infiltracije CNS-a mononuklearnim ćelijama. Obzirom da se izolat mononuklearnih ćelija sastoji od mešavine različitih populacija ćelija kao što su T limfociti, B limfociti, makrofagi i mikroglialne ćelije (koje nisu infiltrirane, već rezidentne u CNS-u, ali su prisutne u izolatu zbog nesavršenosti metode za izolaciju infiltrata), kao i da svaka od njih ima veliki značaj u imunopatogenezi EAE, bilo pokretanjem bilo održavanjem inflamacije u EAE-u, bilo je neophodno ispitati kakav je uticaj *in vivo* primenjenih arilpiperazina na zastupljenost fenotipski različitih populacija ćelija koje infiltriraju CNS tokom EAE-a. U tom cilju je određivan ćelijski sastav infiltrata mononuklearnih ćelija na osnovu različite ekspresije površinskih molekula, CD3 (marker T limfocita), CD4 (marker Th limfocita), CD8 (marker citotoksičnih T limfocita) i CD11b/c (marker monocita/makrofaga) (Slika 12). Primenom metode imunofluorescence i protočne citofluorimetrije upotrebom anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, i anti-CD11b/c antitela obeleženih odgovarajućim fluorohromom, identifikovali smo tri populacije u suspenziji mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine kontrolnih i tretiranih pacova 14. dana od imunizacije (Slika 12B). Rezultati kvantifikacije su pokazali da nema statistički značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, i CD11b/c⁺ ćelija između kontrolnih i pacova tretiranih arilpiperazinima **6a** i **6b** (Slika 12A), odnosno da tretman arilpiperazinima ne utiče na promenu ćelijskog sastava inflamatornog infiltrata.



Slika 12. Arilpiperazini ne utiču na zastupljenost CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ i CD11b/c⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija u piku EAE-a. **A** Prisustvo različitih ćelijskih subpopulacija u okviru mononuklearnog infiltrata izolovanog iz kičmene moždine imunizovanih životinja tretiranih i netretiranih arilpiperazinima (n = 8 po grupi) 14. dana bolesti kvantifikovano je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD. **B** Reprezentativni dot-plotovi različitih ćelijskih subpopulacija za sve tri eksperimentalne grupe.

4.5.2. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD4⁺IFN γ ⁺, CD4⁺IL10⁺, i CD4⁺IL17⁺ ćelija u infiltratu mononukleranih ćelija u piku EAE-a

U prethodnom eksperimentu je pokazano da arilpiperazini **6a** i **6b** ne utiču na procentualnu zastupljenost glavnih ćelijskih subpopulacija u okviru infiltrata mononuklearnih ćelija, kao što su: CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, i CD11b/c⁺ ćelije tokom EAE-a.

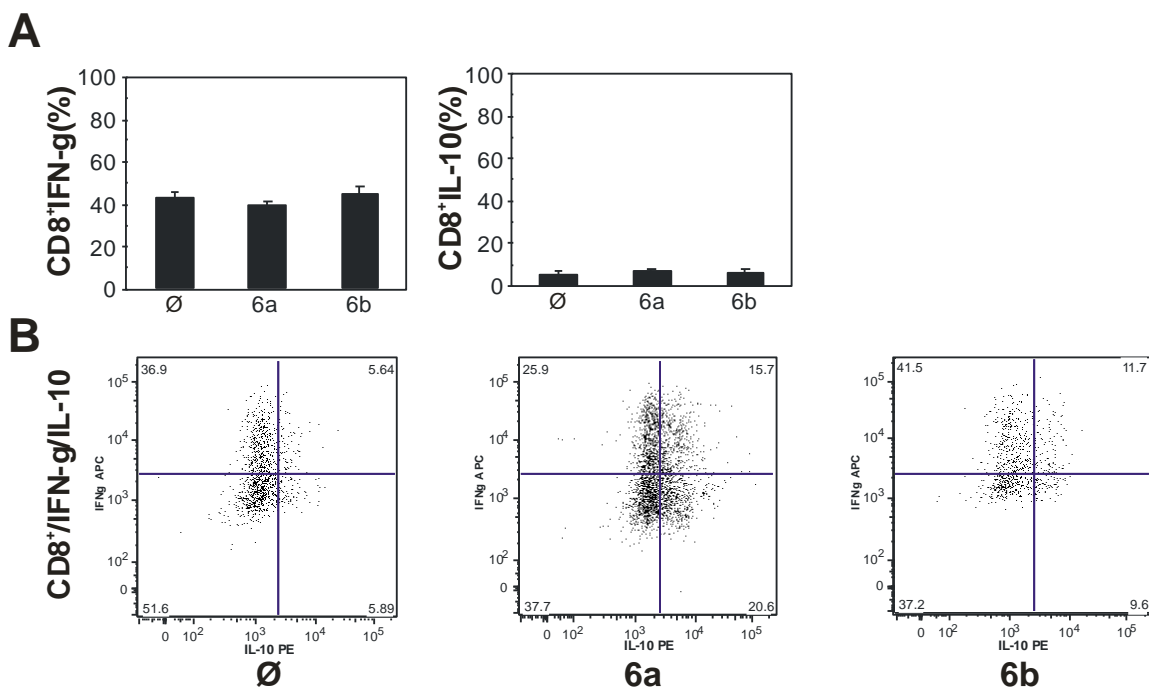


Slika 13. Arilpiperazini ne utiču na zastupljenost CD4⁺ IFN- γ ⁺, CD4⁺ IL-17⁺ i CD4⁺ IL-10⁺ ćelija u infiltratu mononukleranih ćelija u piku EAE-a. **A** Prisustvo različitih ćelijskih subpopulacija CD4⁺ ćelija u okviru mononuklearnog infiltrata izolovanog iz kičmene moždine imunizovanih životinja tretiranih i netretiranih arilpiperazinima (n = 8 po grupi) 14. dana bolesti kvantifikovano je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao SV \pm SD. **B** Reprerzentativni dot-plotovi različitih ćelijskih subpopulacija za sve tri eksperimentalne grupe.

Uzimajući u obzir postojeće podatke o patogenom potencijalu Th1 i Th17 ćelija, kao i ulozi regulatornih T ćelija u zaustavljanju autoimunskog odgovora i inflamacije (Petermann F i sar. 2011), sledeći cilj bio je da se u mononuklearnim ćelijama infiltrata kičmene moždine u piku EAE-a ispita unutarćelijska proizvodnja citokina (IFN- γ , IL-17 i IL-10) koji su glavna fenotipska odlika pomenutih ćelijskih subpopulacija. Mononuklearne ćelije su izolovane u vrhuncu bolesti (14. dana) iz kičmene moždine pacova imunizovanih sa homogenatom KM u KFA (kontrola) kao i iz imunizovanih životinja koje su tretirane sa arilpiperazinima. Metodama dvostrukog unutarćelijskog bojenja i protočne citometrije u infiltratu KM detektovane su i IFN- γ^+ IL-17 $^+$ i IFN- γ^+ IL-10 $^+$ ćelije (Slika 13B). Rezultati kvantifikacije su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti CD4 $^+$ IFN- γ^+ , CD4 $^+$ IL-17 $^+$ i CD4 $^+$ IL-10 $^+$ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija 14. dana EAE-a (Slika 13A), odnosno da tretman ispitivanim derivatima ne utiče na promenu produkcije citokina koji su glavna fenotipska odlika pojedinih ćelijskih subpopulacija.

4.5.3. Uticaj arilpiperazina 6a i 6b na zastupljenost CD8 $^+$ IFN γ^+ i CD8 $^+$ IL10 $^+$ ćelija u okviru infiltrata mononuklearnih ćelija u piku EAE-a

U narednom koraku trebalo je utvrditi kakva je produkcija citokina od strane CD8 $^+$ ćelijske subpopulacije izolovane iz kičmene moždine obolelih životinja tretiranih ili netretiranih arilpiperazinima. Rezultati kvantifikacije citokina na protočnom citofluorimetru pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti populacija CD8 $^+$ IFN- γ^+ i CD8 $^+$ IL-10 $^+$ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija 14. dana EAE-a (Slika 14A). Prema tome, na osnovu ovih i prethodno izloženih rezultata, može se zaključiti da je smanjenje u ekspresiji proinflamatornih/antiinflamatornih medijatora u CNS-u životinja tretiranih arilpiperazinima **6a** i **6b** najverovatnije posledica smanjene i odložene infiltracije mononuklearnim ćelijama, pre nego promene u zastupljenosti različitih ćelijskih subpopulacija unutar inflamatornog infiltrata.



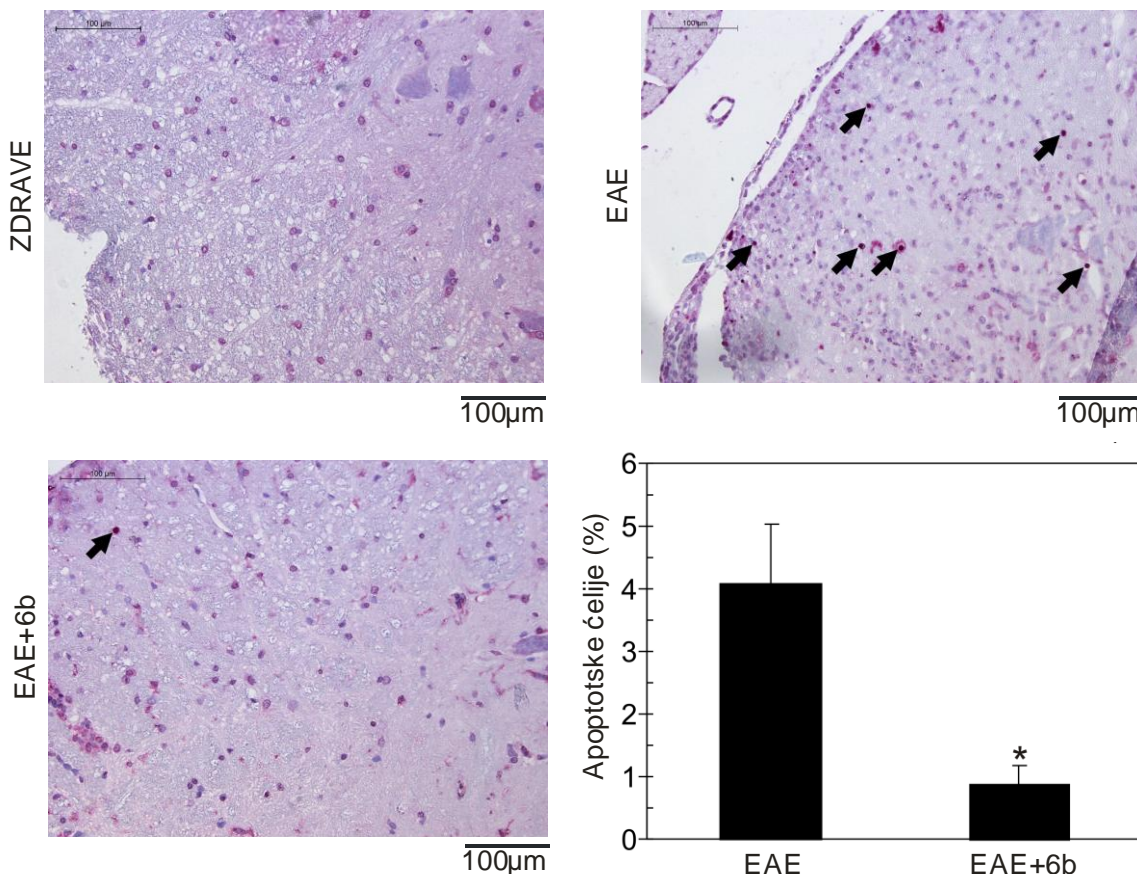
Slika 14. Arilpiperazini ne utiču na zastupljenost CD8⁺IFN- γ ⁺, i CD8⁺IL-10⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija u piklu EAE-a. **A** Prisustvo različitih ćelijskih subpopulacija CD8⁺ ćelija u okviru mononuklearnog infiltrata izolovanog iz kičmene moždine imunizovanih životinja tretiranih i netretiranih arilpiperazinima (n = 8 po grupi) 14. dana bolesti kvantifikovano je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao SV \pm SD. **B** Reprerzentativni dot-plotovi različitih ćelijskih subpopulacija za sve tri eksperimentalne grupe.

4.6. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA APOPTOZU I AKTIVNOST Akt/mTOR SIGNALNOG PUTA U CNS-u U PIKU EAE-a

4.6.1. Uticaj arilpiperazina 6b na apoptozu u kičmenoj moždini pacova sa EAE-om

Da bi se procenio efekat tretmana arilpiperazinima na apoptotsku ćelijsku smrt u tkivu CNS-a tokom EAE-a, primenjena je TUNEL analiza koja se zasniva na detekciji fragmentacije DNK, kao jedne od osnovnih odlika apoptoze. Za razliku od uzoraka kičmene moždine zdravih, neimunizovanih eksperimentalnih životinja, kod kojih nisu

uočene apoptotske ćelije, TUNEL- pozitivna jedra su uočena u beloj masi kičmene moždine životinja sa EAE-om (Slika 15).

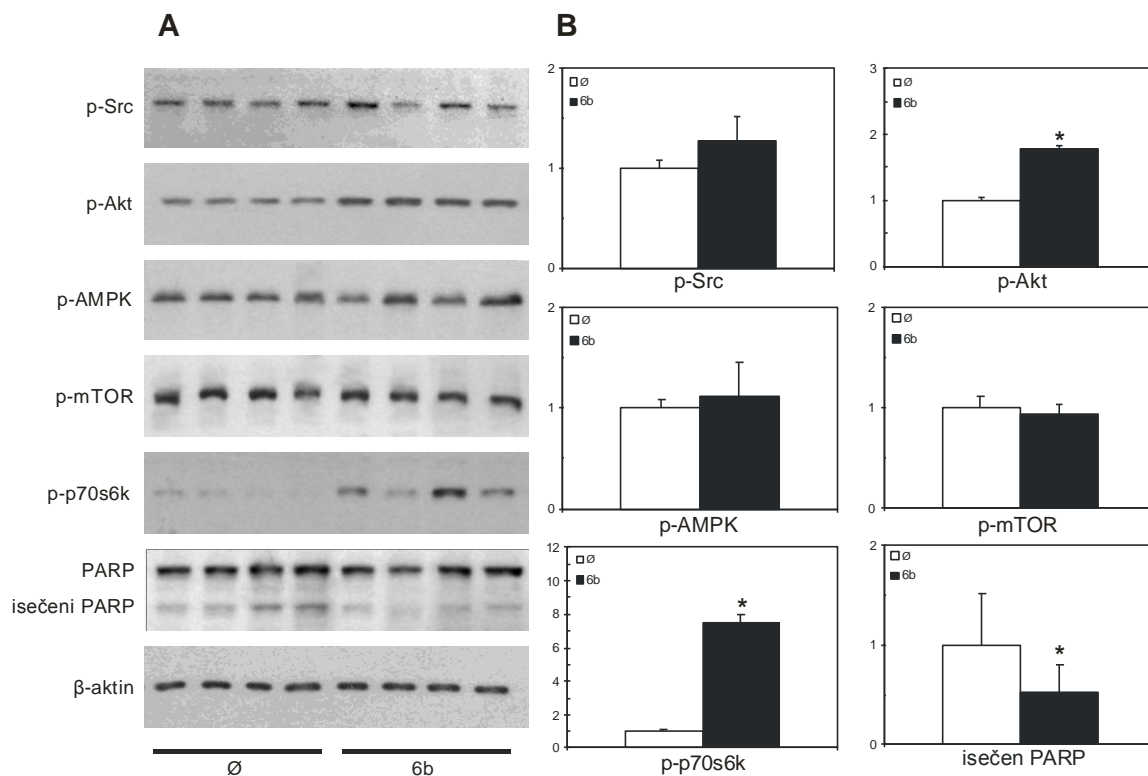


Slika 15. Tretman arilpiperazinima smanjuje apoptozu u CNS-u pacova tokom EAE-a. Apoptotska jedra (označena strelicama) su detektovana TUNEL bojenjem preseka kičmene moždine zdravih pacova (n=5) i imunizovanih pacova tretiranih ili netretiranih arilpiperazinom **6b** (n=5 po grupi), u vrhuncu bolesti (14. dan). Prikazane su reprezentativne mikrografije i procenti (SV+SD) apoptotskih ćelija (*p<0.05).

Na osnovu položaja i veličine, apoptotske ćelije su verovatno bile oligodendrociti. U skladu sa već pokazanim zaštitnim efektom arilpiperazina, TUNEL-pozitivna ćelijska jedra su bila statistički značajno manje zastupljena na presecima kičmene moždine bolesnih životinja tretiranih sa **6b** (Slika 15), ukazujući na to da tretman arilpiperazinima utiče na smanjenje apoptotske smrti ćelija CNS-a tokom EAE-a.

4.6.2. Uticaj arilpiperazina 6b na aktivnost Akt/AMPK/mTOR signalnih puteva i PARP u kičmenoj moždini pacova sa EAE-om

U prethodnim *in vitro* studijama (Tovilovic i sar., 2013) je pokazano da je neuroprotektivni potencijal arilpiperazina delimično posredovan aktivacijom Akt signalnog puta, koji je jedan od najznačajnijih antiapoptotskih signalnih puteva uključenih u ćelijsko preživljavanje (Datta i sar., 1997; Zhou i sar., 2000). Obzirom da je za fiziološku metaboličku aktivnosti tkiva CNS-a važan energetska status ćelije, a koji je u autoimunskoj inflamaciji često poremećen, bilo je značajno ispitati i kakav je efekat arilpiperazina na signalne molekule koji održavaju energetska homeostazu u ćelijama, kao što su protein kinaza aktivirana adenzin-monofosfatom (AMPK) i njen ciljni molekul mTOR.



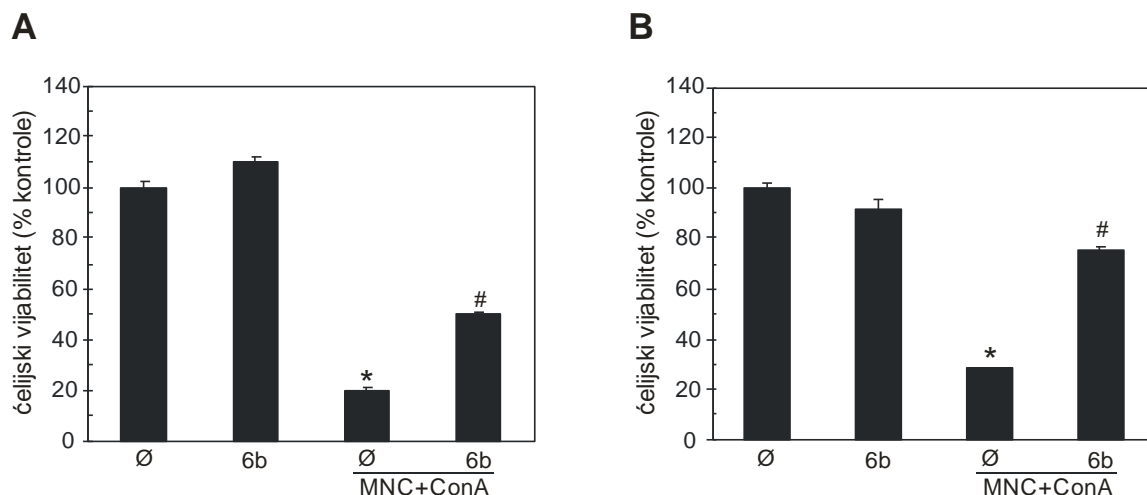
Slika 16. Arilpiperazini povećavaju aktivnost Akt-a i p70S6K u CNS-u imunizovanih pacova. **A** Aktivnost proteina Src, Akt, AMPK, mTOR, p70s6k i PARP ispitivani su imunoblot analizom tkiva lumbalnog dela KM imunizovanih pacova (kontrolna grupa, n=4), i imunizovanih pacova tretiranih arilpiperazinom **6b** (n=4), koji su žrtvovani 14.dana bolesti. **B** Densitometrijska analiza signala u odnosu na signal β -aktina u istim uzorcima. Rezultati su predstavljeni kao SV \pm SD. *p<0.05 označava statističku značajnost razlike između kontrole i tretmana arilpiperazinima.

Imunoblot analiza tkiva kičmene moždine imunizovanih pacova tretiranih arilpiperazinima i kontrolnih, netretiranih životinja je pokazala da tretman arilpiperazinom **6b** značajno povećava fosforilaciju, a time i aktivnost Akt-a i p70S6 kinaze, koja je direktan supstrat mTOR-a (Slika 16). Sa druge strane, imunoblot analiza nije pokazala statistički značajnu promenu u stepenu fosforilacije tirozin kinaze Src, AMPK, i mTOR-a (Slika 16). Pored toga, imunoblot analizom je pokazano da je degradacija nuklearne polimeraze PARP, koja sprečava njenu DNK-reparativnu aktivnost i tako stimuliše apoptozu (Oliver i sar. 1998), bila smanjena u CNS-u životinja tretiranih arilpiperazinom **6b**. Ovi rezultati ukazuju na to da bi aktivacija antiapoptotskog Akt/p70S6 signalnog puta mogla da bude bar delimično odgovorna za zaštitno delovanje arilpiperazina u EAE modelu.

4.7. ISPITIVANJE UTICAJA ARILPIPERAZINA NA OŠTEĆENJE NEURONA I OLIGODENDROCITA IZAZVANO T ČELIJAMA *IN VITRO*

4.7.1. Uticaj arilpiperazina **6b na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija kokultivisanih mitogenom-aktiviranim T limfocitima**

Izučavanje efekata arilpiperazina **6a** i **6b** na humanu neuroblastomsku ćelijsku liniju SH-SY5Y u ranijim *in vitro* studijama (Tovilovic i sar., 2012, 2013) je pokazalo neuroprotektivno dejstvo ovih jedinjenja u tretmanu neurotoksinima 6-hidroksidopaminom (6-OHDA) i azot monoksidom (NO). Po analogiji sa ovim istraživanjima sledeći cilj ove studije bio je ispitati da li arilpiperazini pokazuju slična protektivna svojstva i u oštećenju neurona i oligodendrocita posredovanom aktivacijom ćelija imunskog sistema (Slika 17). Da bi se dobio odgovor na ovo pitanje izvedeni su eksperimenti u kojima su ćelije pacovske oligodendrocitne linije OLN93, kao i neuronske PC12 ćelije kokultivisane sa mononuklearnim ćelijama izolovanim iz limfnog čvora zdrave, neimunizovane životinje, koje su prethodno nespecifično stimulisane T-ćelijskim mitogenom konkanavalinom A (ConA).



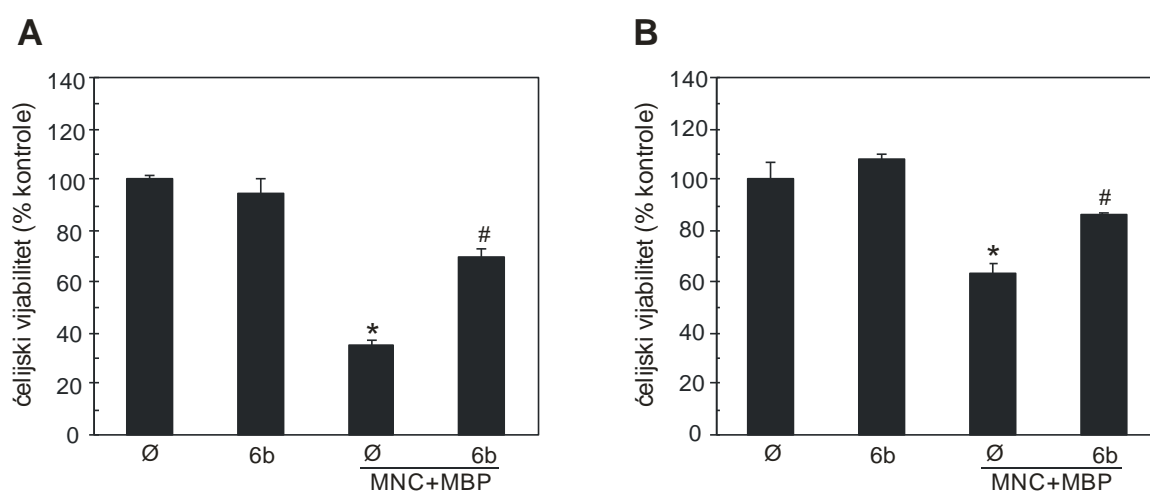
Slika 17. Arilpiperazini štite oligodendrocitnu i neuronsku ćelijsku liniju od oštećenja posredovanog mitogenom-stimulisanim T ćelijama *in vitro*. Ćelije pacovske oligodendrocitne linije OLN93 (A) i neuronske ćelijske linije pacova PC12 (B) su inkubirane sa mononuklearnim ćelijama normalnog limfnog čvora koje su stimulisane sa ConA (5 µg/ml), u prisustvu ili odsustvu arilpiperazina **6b**. Vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija je određivan MTT metodom, a dobijeni rezultati su predstavljani kao SV + SD triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta. (*p<0.05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, dok #p<0.05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na kokultivaciju sa ConA-stimulisanim MNC bez arilpiperazina.

Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da normalne mononuklearne ćelije limfnog čvora pacova, aktivirane sa ConA, statistički značajno smanjuju vijabilitet OLN93 oligodendrocita (Slika 17A) i PC12 neurona (Slika 17B), dok je tretman arilpiperazinom **6b** doveo do statistički značajnog povećanja vijabiliteta oba tipa ćelija.

4.7.2. Uticaj arilpiperazina **6b** na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija kokultivisanih sa MBP-stimulisanim mononuklearnim ćelijama pacova sa EAE-om

Pošto je u prethodnom eksperimentu pokazano da nespecifično stimulisane mononuklearne ćelije limfnog čvora pacova značajno smanjuju vijabilitet oligodendrocitne i neuronske ćelijske linije, naredni korak bio je ispitati da li se ovakav zaštitini efekat javlja i u eksperimentalnim uslovima koji u većoj meri podražavaju „*in*

vivo“ situaciju. U tom cilju izvedeni su eksperimenti u kojima su OLN93 oligodendrociti i PC12 neuroni inkubirani zajedno sa mononuklearnim ćelijama izolovanim iz drenirajućih (poplitealnih) limfnih čvorova pacova imunizovanih homogenatom KM u KFA, stimulisanim CNS antigenom MBP-om. Kao i u prethodnom eksperimentu, rezultati su pokazali da antigenom stimulisane mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora imunizovanih pacova, statistički značajno smanjuju vijabilitet OLN93 (Slika 18A) i PC12 ćelija (Slika 18B), dok je tretman arilpiperazinima doveo do značajnog smanjenja citotoksičnosti vijabiliteta.

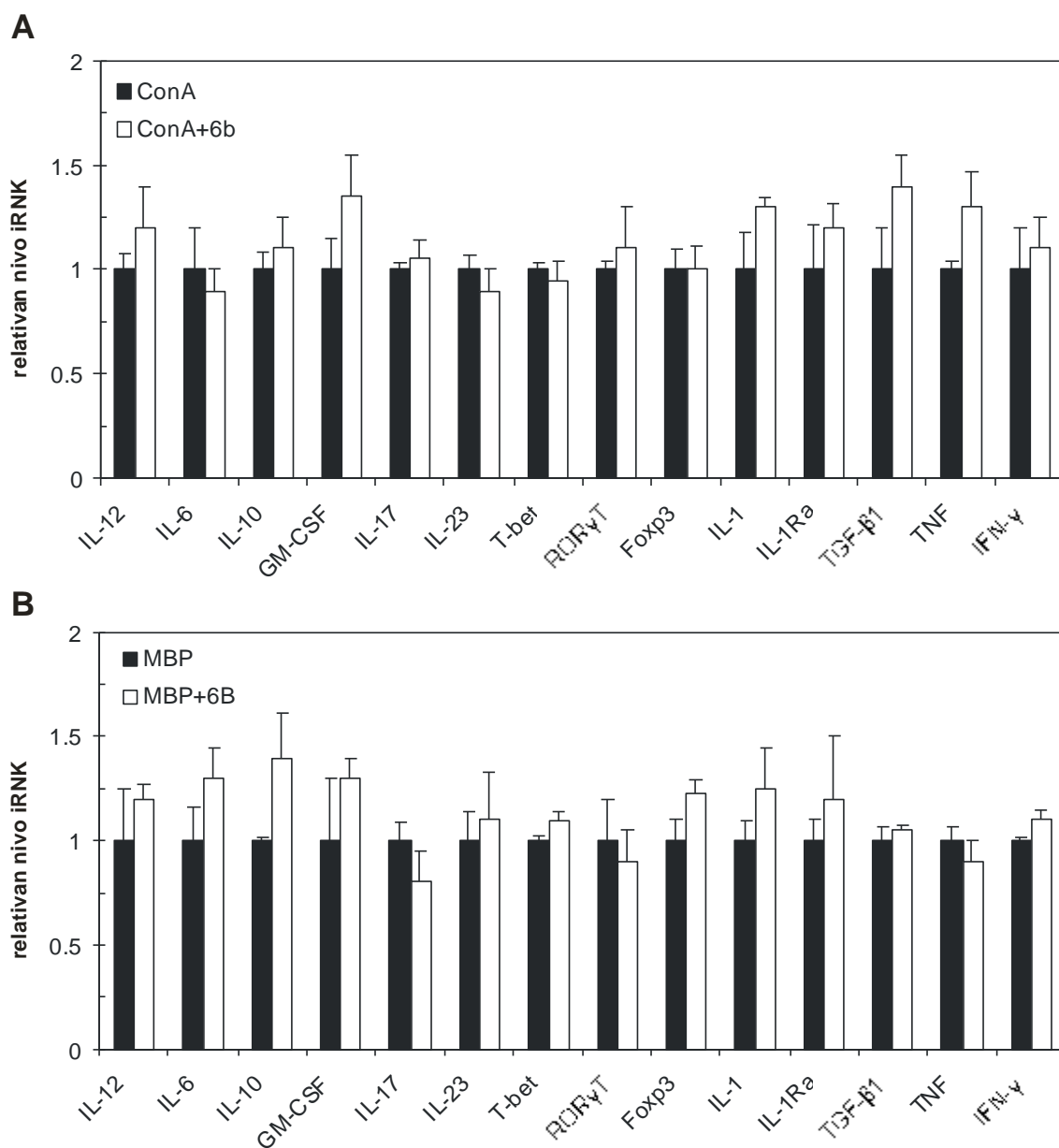


Slika 18. Arilpiperazini štite oligodendrocitnu i neuronsku ćelijsku liniju od oštećenja posredovanog MBP-stimulisanim T ćelijama *in vitro*. Ćelije pacovske oligodendrocitne linije OLN93 (A) i neuronske ćelijske linije pacova PC12 (B) su inkubirane sa mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja koje su stimulisane sa MBP-om (10 µg/ml), u prisustvu ili odsustvu arilpiperazina **6b**. Vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija je određivan MTT metodom, a dobijeni rezultati su predstavljeni kao SV + SD triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta (*p<0.05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, dok #p<0.05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na kokultivaciju sa MBP-stimulisanim MNC bez arilpiperazina).

Na osnovu ovih, kao i rezultata prethodnog eksperimenta, može se zaključiti da arilpiperazini štite oligodendrocite i neurone od oštećenja citotoksičnog dejstva encefalitogenih ćelija.

4.7.3. Uticaj arilpiperazina **6b** na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore u mononuklearnim ćelijama stimulisanim mitogenom ili antigenom

Rezultati prethodnih eksperimenata su pokazali da arilpiperazini štite ćelije oligodendrocitne (OLN-93) i neuronske (PC12) ćelijske linije od oštećenja izazvanog aktivacijom T ćelija imunskog sistema *in vitro*. Da bi se ispitalo da li je primećeni efekat posledica promene u produkciji medijatora inflamacije, mononuklearne ćelije cervikalnog limfnog čvora zdravih životinja stimulisane su sa ConA, dok su mononuklearne ćelije poplitealnog limfnog čvora imunizovanog pacova stimulisane sa MBP-om, u odsustvu ili u prisustvu arilpiperazina. Analizom nivoa iRNK za proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1 i GM-CSF, Th1 citokine IL-12 i IFN- γ , Th17 citokine IL-23 i IL-17, antiinflamatorne/imunosupresivne medijatore IL-10, TGF- β , i IL-1Ra, kao i za transkripcione faktore Th1 ćelija (T-bet), Th17 ćelija (ROR γ t) i regulatornih T ćelija (Foxp3), nije pokazana statistički značajna razlika između kontrolnih i mononuklearnih ćelija tretiranih arilpiperazinom **6b** (Slika 19). Ovi rezultati pokazuju da arilpiperazini direktno štite oligodendrocite i neurone od oštećenja posredovanog imunskim ćelijama *in vitro*, bez ispoljavanja imunomodulatorne aktivnosti.



Slika 19. Arilpiperazini ne utiču na ekspresiju iRNK inflamatornih medijatora u mononuklearnim ćelijama limfnog čvora *in vitro*. Mononuklearne ćelije limfnog čvora pacova (5×10^6) izolovane iz zdravih pacova (**A**; $n = 5$) ili pacova imunizovanih homogenatom KM u KFA (**B**; $n = 5$) stimulisane su sa ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) odnosno sa MBP-om (10 $\mu\text{g/ml}$), u prisustvu ili odsustvu arilpiperazina **6b** (10 μM). RNK je izolovana radi određivanja proinflamatornih/antiinflamatornih medijatora i transkripcionih faktora metodom qRT-PCR-a. Rezultati (SV + SD) su predstavljeni kao odnos ekspresije iRNK posmatranog gena u ConA/MBP-stimulisanim ćelijama i ekspresije iRNK ($2^{-\Delta\text{ct}}$) u netretiranim ćelijama, koja je arbitrarno postavljena na 1.

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji, korišćenjem animalnog modela MS-a, eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa - EAE-a, prvi put je pokazana sposobnost novosintetisanih arilpiperazinskih derivata da smanje autoimunske inflamatorne oštećenje centralnog nervnog sistema. Osnovni mehanizmi protektivnog dejstva arilpiperazina bili su smanjenje infiltracije CNS-a imunskim ćelijama kao i porast aktivnosti antiapoptotskih kinaza Akt i p70S6K, i posledično smanjenje apoptotske smrti ćelija CNS-a.

U prethodno objavljenim studijama, dva od 19 novosintetisanih dopaminergičkih i serotoninergičkih arilpiperazinskih liganada, označena kao derivati **6a** i **6b**, koji su dalje ispitivani u ovoj studiji, su ispoljili najveći neuroprotektivni potencijal *in vitro* (Tovilovic i sar., 2013; Tovilovic i sar., 2012). Ova jedinjenja su povećavala preživljavanje ćelija neuroblastoma SH-SY5Y u kulturi, utičući na apoptotske i autofagne puteve ćelijske smrti pokrenute neurotoksinima. Iako su protektivna svojstva arilpiperazina pokazana i ranije u *in vitro* tretmanu različitim neurotoksinima (Druse i sar., 2005; Koprivica i sar., 2011; Park i sar., 2009), mehanizam njihovog neuroprotektivnog dejstva, kao ni njihova moguća zaštitna svojstva *in vivo*, na primer u EAE modelu, nisu bili ispitivani.

Obzirom da je ispitivanje efekata arilpiperazina **6a** i **6b** u ovoj studiji vršeno *in vivo*, na animalnom modelu MS-a, oba jedinjenja su najpre testirana za moguću preklapanje sa kliničkim manifestacijama koje se inače prate u ovom modelu, ali nikakva interferencija sa kliničkim znacima tipičnim za EAE nije primećena. Takođe, iako se ova studija nije bavila detaljnim ispitivanjem neželjenih dejstava ispitivanih derivata nisu primećeni nikakvi znaci njihove akutne toksičnosti, a čak su i delovali

protektivno u smislu oporavka telesne mase, čiji gubitak je uobičajena odlika EAE-a (Xu i sar., 2000).

U ovoj studiji je pokazano da primena arilpiperazina **6a** i **6b** u kontinuiranom tretmanu u trajanju od 28 dana od trenutka indukcije EAE-a značajno smanjuje kliničke manifestacije bolesti kod imunizovanih pacova. Tretman arilpiperazinima doveo je do odlaganja pojave prvih kliničkih znaka bolesti, kao i smanjenja zbirne i maksimalne kliničke ocene zabeležene u posmatranom periodu. Da bi se detaljnije ustanovilo u kojoj fazi bolesti se zapravo ostvaruje zaštitni efekat ovih jedinjenja izvršen je niz eksperimenata u kojima su eksperimentalne životinje tretirane u različitim fazama bolesti. Tako je pokazano da tokom prvih sedam dana od imunizacije, odnosno tokom induktivne faze EAE-a, primena arilpiperazina nema efekta na kliničku sliku EAE-a, dok je tretman od 8. do 21. dana, tj. tokom efektorske faze bolesti značajno snižavao težinu bolesti. U ovim eksperimentima primećeno je da jedinjenje **6b** pokazuje nešto jači zaštitni efekat u odnosu na **6a**, što je u skladu sa razlikom primećenom i u *in vitro* uslovima (Tovilovic i sar., 2013).

Prethodne studije su pokazale da je zaštitni efekat dibenzodiazepinskog derivata kvetiapina, inače često korišćenog atipičnog antipsihotika koji poseduje piperazinski prsten u svojoj strukturi, bio posredovan inhibicijom proliferacije autoimunskih efektorskih T ćelija u EAE-u (Mei i sar., 2012). Ipak, niz rezultata koji su dobijeni u ovoj studiji ne idu u prilog tezi direktnog imunomodulatornog dejstva arilpiperazina u našim eksperimentima. Prvo, poznato je da nakon aktivne indukcije EAE-a u drenirajućim limfnim čvorovima dolazi do prezentacije CNS antigena autoreaktivnim T limfocitima, što dovodi do njihove aktivacije, proliferacije i diferencijacije u efektorske encefalitogene ćelije. Za razliku od studije u kojoj je umnožavanje autoreaktivnih T ćelija bilo inhibirano kvetiapienom (Mei i sar., 2012), odsustvo statistički značajne promene broja mononuklearnih ćelija u poplitealnim (drenirajućim) limfnim čvorovima imunizovanih životinja tretiranih arilpiperazinima **6a** i **6b** ukazuje na to da ova jedinjenja ne inhibiraju aktivaciju i ekspanziju autoreaktivnih T ćelija na periferiji. U skladu sa ovom pretpostavkom je i odsustvo zaštitnog dejstva arilpiperazina u induktivnoj fazi bolesti. Drugo, rezultati qRT-PCR analize mononuklearnih ćelija

infiltriranih u CNS ili *in vitro* stimuliranih mononuklearnih ćelija potvrđuju da arilpiperazini nisu uticali na ekspresiju najznačajnijih transkripcijskih faktora i citokina (TNF, IL-1, GM-CSF, IFN- γ , IL-17, ROR γ T, T-bet, Foxp3) koji regulišu inflamaciju CNS-a. Treće, iako je tretman arilpiperazinima doveo do zapaženog smanjenja broja mononuklearnih ćelija u CNS-u, analiza glavnih encefalitogenih/regulatornih imunskih ćelijskih populacija (CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺) i njihovih subpopulacija (CD4⁺IFN γ ⁺, CD4⁺IL17⁺, CD8⁺IFN γ ⁺, CD4⁺IL10⁺, CD8⁺IL10⁺) jasno ukazuje na to da arilpiperazini ne utiču na ćelijski sastav inflamatornih infiltrata u CNS-u. Pored toga, iako je poznato da aktivirani makrofagi/mikroglia značajno doprinose procesu destruktivnog autoimunskog oštećenja CNS-a u EAE-u i MS-u (Howell i sar., 2010; Kuhlmann i sar., 2002), zastupljenost CD11b/c⁺ ćelija u okviru infiltrata mononuklearnih ćelija nije se značajno promenila u tretmanu arilpiperazinima. Posmatrani zajedno, ovi podaci ukazuju da zaštitni efekat arilpiperazinskih derivata nije posledica njihove direktne interakcije sa procesom periferne aktivacije/prolifracije T ćelija, kao ni sa procesom reaktivacije encefalitogenih Th1 i Th17 ćelija u tkivu CNS-a.

Najverovatniji mehanizam povoljnog dejstva arilpiperazina u EAE-u jeste neselektivno smanjenje infiltracije imunskih ćelija u CNS, delujući na encefalitogene Th1 i Th17 ćelije koje proizvode IFN-g i IL-17 i ekspresiraju transkripcijske faktore T-bet i ROR- γ T, kao i na one ćelije koje proizvode proinflamatorne citokine TNF, IL-1, GM-CSF i IL-6, ili imunoregulatorne/imunosupresivne citokine IL-10, TGF- β ili IL-1Ra. Obzirom da je analiza infiltracije CNS-a i ekspresije citokina/transkripcijskih faktora i u kontrolnoj i u grupi tretiranoj arilpiperazinima vršena u istoj vremenskoj tački, zabeležene razlike su verovatno odraz ne samo smanjenog intenziteta, već i odloženog početka infiltracije CNS-a imunskim ćelijama. Ovi rezultati su u skladu sa studijama u kojima je pokazano da atipični antipsihotici smanjuju akumulaciju CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija u kičmenoj moždini tretiranih životinja (Mei i sar., 2012). Smanjena infiltracija CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita korelira sa nižim stepenom oštećenja i gubitka oligodendrocita, kao i sa slabije izraženom demijelinizacijom i manjim propadanjem aksona u EAE-u (Linker i sar., 2005). Obzirom da arilpiperazinski derivati nisu uticali na induktivnu fazu bolesti niti su menjali ekspresiju inflamatornih medijatora u infiltriranim ćelijama, njihov inhibicioni efekat na infiltraciju CNS je pre posledica

dejstva na samo ciljno tkivo nego na infiltrirajuće ćelije. Na primer, moguće je da arilpiperazini utiču na adhezivna svojstva vaskularnih endotelnih ćelija CNS-a ili na proizvodnju hemokina i proinflammatoryh citokina od strane rezidentnih ćelija CNS-a, što može predstavljati predmet budućih istraživanja.

Tretman arilpiperazinima je značajno smanjio apoptozu ćelija CNS-a tokom EAE-a, što je pokazano smanjenom fragmentacijom jedarne DNK, odnosno inaktivacijom PARP. Na osnovu pozicije u beloj masi kičmene moždine, kao i veličine ćelija, moglo se zaključiti da su u pitanju uglavnom glijalne ćelije, najverovatnije oligodendrociti. U skladu sa in vivo rezultatima, u in vitro eksperimentima je pokazano da arilpiperazini štite OLN93 oligodendrocite i PC12 neurone od toksičnih medijatora mitogenom-aktiviranih normalnih T ćelija ili MBP-om aktiviranih encefalitogenih T limfocita. Antiapoptotsko dejstvo arilpiperazina u CNS-u životinja obolelih od EAE-a, moglo bi da doprinese njihovom antiinflammatorym efektu unutar CNS-a. Naime, umiranje oligodendrocita i neurona je primećeno u CNS-u tokom MS-a/EAE-a (Das i sar., 2008; Fang i sar., 2013; Herz i sar., 2010). Molekulski obrasci oštećenja (DAMP) (engl. damage-associated molecular pattern), koji se oslobađaju iz oštećenih ćelija CNS-a (kao što su proteini toplotnog šoka, adeninski nukleotidi, HMBG-1 proteini, mokraćna kiselina, RNK), ili se stvaraju u vanćelijskom matriksu (fragменти hijaluronske kiseline, tenascini, fibronektin i sulfatisani proteoglikani) stimulišu inflamaciju CNS-a (Gaudet i Popovich, 2014; Kigerl i sar., 2014; Miranda-Hernandez i Baxter, 2013). Dakle, moguće je da je direktna zaštita oligodendrocita i neurona od strane arilpiperazina, pored neposrednog protektivnog dejstva na CNS, doprinela ublažavanju inflamacije CNS-a smanjivanjem oslobađanja proinflammatoryh DAMP-ova.

Neuroprotektivno dejstvo arilpiperazina **6a** i **6b** opisano u ovoj tezi u skladu je sa prethodnim studijama koje su pokazale da ova jedinjenja sprečavaju neurotoksičnost NO i 6-OHDA stabilizacijom potencijala mitohondrijalne membrane i posledičnim sprečavanjem oksidativnog stresa, aktivacije kaspaza i fragmentacije DNK (Tovilovic i sar., 2013; Tovilovic i sar., 2012). Neutralizacija slobodnih radikala, smanjenje oksidativnog stresa, kao i promena ekspresije i lokalizacije proapoptotskih (Bax) i antiapoptotskih (Bcl-XL) gena pokazana je i u drugim studijama sa različitim atipičnim

antipsihoticima (Wei i sar., 2008; Xu i sar., 2008). Neuroprotektivna svojstva arilpiperazina **6a** pokazana su i u slučaju aktiviranih makrofaga kao izvora neurotoksičnog NO, što ukazuje na potencijalni terapijski značaj arilpiperazina u lečenju neuroinflamatornih oboljenja u kojima su aktivirani makrofagi i mikroglija jedan od glavnih izvora toksičnih inflamatornih medijatora, uključujući i NO (Tovilovic i sar., 2012; Brown i Neher, 2010). Derivati arilpiperazina značajno inhibiraju stvaranje NO i TNF-a u mikroglijalnim ćelijama miša stimulisanim sa IFN-g *in vitro*, a pokazuju i antioksidativne efekte inhibicijom stvaranja superoksida radikala u ćelijama mikroglije glodara (Kato i sar., 2008; Kato i sar., 2011). Moguće je da je neuroprotektivno dejstvo arilpiperazina **6a** i **6b** posredovano nekim od ovih mehanizama. Pored toga, bilo bi značajno ispitati da li arilpiperazini 6a i 6b imaju kapacitet da stimulišu proliferaciju prekursora oligodendrocita i njihovu diferencijaciju u zrele oligodendrocite, čime bi se pospešila remijelinizacija u EAE-u, kao što je to slučaj sa nekim atipičnim antipsihoticima sa piperazinskom strukturom (Xiao i sar., 2008). Takođe je pokazano da neki arilpiperazinski derivati, kao što je aripiprazol, svoje neuroprotektivno dejstvo mogu da ostvare i indukcijom aktivnosti promotora BDNF, glavnog neuroprotektivnog proteina koji reguliše preživljavanje neurona, diferencijaciju i stvaranje sinapsi (Park i sar., 2009), kao i sprečavanjem neurotoksičnosti indukovane ekscitatornim neurotransmiterom glutamatom (Koprivica i sar., 2011). Ostaje da se ispita da li slični mehanizmi učestvuju i u neuroprotektivnom efektu arilpiperazina **6a** i **6b** u EAE-u.

Postavlja se pitanje intracelularnih signalnih mehanizama odgovornih za direktnu protekciju CNS-a arilpiperazinima. Prethodno je pokazano da je aktivacija antiapoptotske Akt kinaze bila odgovorna za protektivno dejstvo arilpiperazina **6a** u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y, izloženim neurotoksičnom slobodnom radikalu NO (Tovilovic i sar., 2012). Naime, Akt blokira smrt ćelije direktnom inaktivacijom proapoptotskih molekula kao što je BAD ili blokadom FOXO/p53-zavisne transkripcije gena „smrti“, kao i stimulacijom NF-κB-zavisne transkripcije gena važnih za preživljavanje ćelije (Brunet i sar., 2001; Diem i sar. 2007). Istovremeno, nishodni efektor Akt-a, p70S6K, održava transkripciju i translaciju na nivou koji je neophodan da bi neuroni preživeli u uslovima apoptotskog stresa (Wu i sar. 2004; Chen i sar. 2010). Rezultati ove teze proširuju prethodna saznanja pokazujući da arilpiperazini

povećavaju fosforilaciju Akt-a i p70S6K u CNS-u pacova sa EAE-om. Deo aktivnosti Akt-a u tkivu CNS-a verovatno potiče i od infiltriranih mononuklearnih ćelija, ali nije verovatno da su one odgovorne za primećeni porast aktivnosti ove kinaze, ako se uzmu u obzir rezultati koji pokazuju da je tretman arilpiperazinima značajno smanjio infiltraciju mononuklearnih ćelija u CNS. Ovo je u skladu sa rezultatima koji pokazuju da aktivacija estrogenskog receptora β na oligodendrocitima podstiče remijelinizaciju u EAE-u upravo putem aktivacije Akt/p70S6K signalnog puta (Khalaj i sar. 2013; Kumar i sar. 2013), što ukazuje na mogućnost da je aktivacija Akt-a i p70S6K u CNS-u bar delimično doprinela protektivnom dejstvu arilpiperazina u EAE-u.

Takođe je važno napomenuti da je mTOR kinaza, koja fosforiliše p70S6K nakon aktivacije Akt-om (Magnuson i sar., 2012), neophodna za nastanak encefalitogenih Th1 i Th17 ćelija (Delgoffe i sar. 2011). U skladu sa tim, farmakološka inhibicija mTOR/S6K signalnog puta rapamicinom ublažava EAE modulacijom kako efektorske tako i regulatorne uloge T ćelija (Donia i sar. 2009; Esposito i sar. 2010). Dakle, izgleda da Akt/mTOR/S6K signalni put može da ima dvostruku ulogu u neuroinflamaciji, podstičući preživljavanje neurona i oligodendrocita sa jedne strane, i uporedo upravljajući odgovorom patogenih T ćelija sa druge strane (Dello Russo i sar., 2013). Pošto je u ovoj studiji tretman arilpiperazinima značajno smanjio infiltraciju mononuklearnih ćelija, verovatnije je da su ćelije CNS-a, pre nego infiltrirane T ćelije bile izvor povećane Akt/p70S6K aktivnosti u tkivu CNS-a. Zanimljivo je da rezultati ove studije nisu pokazali porast aktivacije mTOR-a kao posledicu tretmana arilpiperazinima, što se može objasniti sposobnošću Akt-a da fosforiliše p70S6K nezavisno od mTOR-a (Jaeschke i sar., 2002), i/ili aktivacijom drugih unutarćelijskih signalnih puteva koji su u stanju da aktiviraju p70S6K nezavisno od Akt/mTOR puta, kao što su na primer aktivacija protein kinaze C ili MAP/ERK kinaze (Fang i sar., 2007; Deguil i sar., 2008; Liu i sar. 2013). Mehanizam modulacije Akt/mTOR/p70S6K signalnog puta arilpiperazinima, u različitim vrstama ćelija CNS-a i infiltriranih imunskih ćelija, kao i njegova uloga u zaštiti od neuroinflamacije, zahteva detaljnija istraživanja u budućnosti.

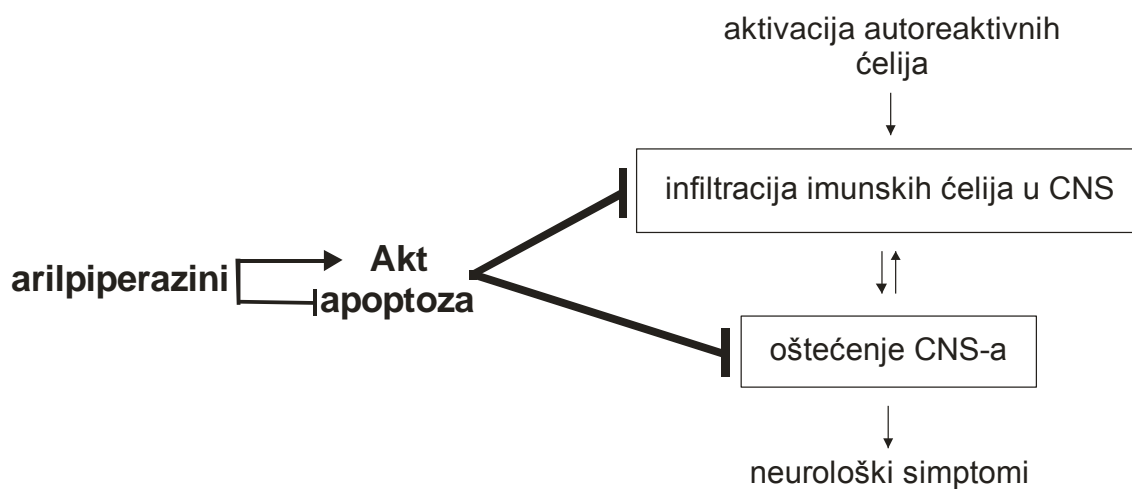
Poznato je da neuroendokrini sistem ima imunomodulatorni potencijal (Qiu i sar., 1996), i da neuroendokrini i imunski sistem komuniciraju međusobno u oba smera putem zajedničkih receptora i signalnih molekula, kao što su hormoni, neurotransmiteri i citokini (Deckx i sar., 2013). Poremećaj na bilo kom nivou ove komunikacije može da dovede do promena u osetljivosti na različite autoimunske i inflamatorne bolesti, kao što su EAE i MS. Iako su oba arilpiperazina pokazivala parcijalnu agonističku aktivnost na D2 receptorima (Tovilovic i sar., neobjavljeni rezultati), njihov neuroprotektivni efekat u *in vitro* stresu izazvanom NO-om i 6-hidroksidopaminom najverovatnije nije bio zavisao od vezivanja za dopaminske receptore, jer nije bio sprečen visokoafinitetnim blokatorom D1/D2 receptora butaklamolom (u slučaju **6a**) (Tovilovic i sar., 2012) ili selektivnim blokatorom D2 receptora sulpiridom (u slučaju **6b**) (Tovilovic i sar., neobjavljeni rezultati). U skladu sa tim rezultatima, neuroprotektivno dejstvo drugih dopaminergičkih liganada nije izostalo kada su dopaminergički receptori bili farmakološki blokirani ili njihova ekspresija isključena u genetski modifikovanim (*knock-out*) miševima (Ramirez i sar. 2003; Gu i sar. 2004; Matsuo i sar. 2010). Takođe, u *in vitro* studijama koje su se bavile proučavanjem neuroprotektivnih svojstava dopaminergičkih liganada pokazalo se da je njihov zaštitni efekat najverovatnije posledica sprečavanja aktivacije proapoptotskih signala neutralisanjem reaktivnih oblika kiseonika (Hara i sar., 2003) ili povećanjem antioksidativnog kapaciteta neurona (Le i sar., 2000).

Dopaminski receptori D1-D5 su klasifikovani u 2 podgrupe: D1 slične (D1R i D5R) i D2 slične receptore (D2R, D3R i D4R) (Missale C i sar., 1998), koji stimulišu (D1 slični) ili inhibiraju (D2 slični) intracelularnu proizvodnju cAMP-a (Sibley i sar., 1993). D1 slični receptori inhibiraju funkciju citotoksičnih i regulatornih T ćelija (Saha i sar., 2001; Kipnis i sar., 2004), a D2 slični receptori stimulišu produkciju antiinflamatornog i imunosupresivnog IL-10 i proinflamatornog TNF u Th1 ćelijama (Besser i sar., 2005), i modulišu migraciju CD8⁺ T ćelija (Watanabe i sar., 2006). Pored toga, dok antagonisti D2 sličnih receptora indukuju, antagonisti D1 sličnih receptora inhibiraju diferencijaciju Th17 ćelija posredovanu dendritičnim ćelijama u EAE-u (Nakano i sar. 2008). Ove studije pokazuju da je efekat stimulacije različitih dopaminskih receptora na imunski sistem veoma složen. Ipak, obzirom da je pokazano

da N-arilpiperazinska grupa ulazi u sastav liganada za dopaminske i serotoninske receptore (Leopoldo, 2004; Ignjatović i sar, 2012), kao i da se arilpiperazinski derivati **6a** i **6b** vezuju za dopaminske D2 i serotoninske 5HT_{1A} receptore (Sukalovic i sar., 2013) i deluju kao parcijalni agonisti humanih D2 receptora (Tovilovic i sar., neobjavljeni rezultati), moguće je da bar deo svog protektivnog efekta u EAE-u ostvaruju na taj način. Nešto veća efikasnost **6b**, koja se odražavala kasnijim početkom bolesti i nižom maksimalnom kliničkom ocenom, u skladu je sa većim afinitetom vezivanja za D2 receptor (K_i 1400 za **6a** i 71.6 nM i **6b**, redom) i 5-HT_{1A} receptor (K_i 304.9 i 2.4 nM) (Sukalovic i sar. 2013). U drugim studijama u kojima je ispitivan afinitet vezivanja različitih arilpiperazinskih derivata za dopaminske i serotoninske receptore, najčešće je afinitet vezivanja za D1 receptor bio mnogo manji od afiniteta vezivanja za D2 receptor (Soskić i sar., 1998). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima koji pokazuju da parcijalni agonista D2 receptora, bromokriptin, smanjuje težinu akutnog EAE-a (Dijkstra i sar., 1994), dok antagonizam D2 receptora pogoršava bolest stimulisanjem diferencijacije Th17 ćelija (Nakano i sar. 2008). Takođe treba imati u vidu da anksioznost, depresija, i drugi neuropsihijatrijski poremećaji uočeni i u EAE-u i u MS-u (Feinstein 2007; Gentile i sar., 2015) verovatno nastaju usled dopaminergičke disfunkcije prouzrokovane inflamacijom (Gentile i sar., 2015). Dakle, moguće je da interakcija arilpiperazina sa dopaminergičkim signalnim putem, čak iako nije direktno uključena u sprečavanje neuroinflamatornog oštećenja, može da doprinese u ublažavanju pratećih poremećaja u ponašanju.

Arilpiperazini takođe mogu da deluju kao ligandi serotoninskih receptora ili inhibitori acetilholinesteraze (Cappelli i sar. 2005; Obniska i sar. 2012), a interferencija sa serotoninergičkom ili acetilholinesteraznom aktivnošću je snižavala inflamaciju CNS-a i kliničku težinu EAE-a (Freire-Garabal i sar. 2003; Jiang i sar. 2013; Nizri i sar. 2006; Yuan i sar. 2012). Pored dopaminergičkih receptora, i serotoninergički receptori su eksprimirani na brojnim ćelijama imunskog sistema, kao što su dendritične ćelije, Th ćelije i citotoksični T limfociti. Serotonin (5-HT) i agonisti 5-HT receptora mogu da indukuju antigen-specifičnu proliferaciju Th1 i citotoksičnih T limfocita preko svog 5-HT₂ receptora, dok blokada 5-HT₁ receptora smanjuje težinu kliničkih znakova u EAE-u (Inoue i sar., 2011, Freire-Garabal i sar., 2003). Aktivacija 5HT_{1A} receptora stimuliše

proliferaciju i citotoksičnu funkcije NK ćelija (Hellstrand i sar., 1993), dok aktivacija 5HT₂ receptora smanjuje proliferaciju limfocita (Pellegrino i Bayer, 2002), kao i broj citotoksičnih T limfocita (Davydova i sar., 2010). Derivati arilpiperazina mogu imati istovremeno različite afinitete vezivanja za dopaminergičke (D_{1,2}) i serotoninergičke (5HT_{1A,2A,2C}) receptore, usled čega mogu ostvarivati antagonističke, agonističke i parcijalno agonističke efekte (Tomić i sar., 2003). Efekti acetilholina na imunski sistem zavise od tipa receptora koji je aktiviran. Na primer, stimulacija α 7-nAChR na makrofagima, limfocitima i neutrofilima inhibira transkripcioni faktor NF- κ B i posledičnu proizvodnju proinflamatornih citokina (Wang i sar., 2004). Pored toga neki inhibitori acetilholinesteraze kao što je donepezil, mogu značajno da utiču na poboljšanje memorijske i kognitivne sposobnosti MS pacijenata (Christodoulou i sar., 2006). Dakle, ispitivanje moguće uloge vezivanja serotoninских receptora ili inhibicije acetilholinesteraze u protektivnom dejstvu arilpiperazina u neuroinflamaciji predstavlja cilj vredan budućeg istraživanja.



Šema 1. Pojednostavljeni prikaz najvažnijih efekata arilpiperazina na EAE kod pacova

Rezultati ove teze pokazuju da arilpiperazinski derivati **6a** i **6b** ublažavaju kliničku sliku EAE-a mehanizmima koji obuhvataju smanjenu infiltraciju autodestruktivnih inflamatornih ćelija kao i direktno neuroprotektivno dejstvo zavisno

od antiapoptotske kinaze Akt, pre nego imunomodulaciju (šema 1). Ova teza podržava buduća istraživanja neuroprotektivnih arilpiperazina kao mogućeg dodatnog pristupa u lečenju neuroinflamacije kao važnog aspekta patogeneze različitih autoimunskih i neurodegenerativnih bolesti.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove studije a na osnovu dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj tezi mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Novosintetisani arilpiperazinski dopaminergički ligandi snižavaju kliničke znake EAE-a, što se ispoljava odlaganjem početka bolesti i smanjenjem maksimalne kliničke težine bolesti, kao i oporavkom telesne mase. Protektivno dejstvo arilpiperazini ostvaruju tokom efektorske, ali ne i induktivne faze bolesti.
- Arilpiperazini smanjuju infiltraciju inflamatornih ćelija u CNS ne utičući na brojnost mononuklearnih ćelija u perifernim limfoidnim organima i ne menjajući ćelijski sastav inflamatornog infiltrata u CNS-u, kao i njihovu proizvodnju inflamatornih medijatora. Arilpiperazini smanjuju apoptozu ćelija i povećavaju aktivnost antiapoptotskog signalnog puta Akt/p70S6 kinaza u CNS-u pacova sa EAE-om, a u *in vitro* uslovima direktno spasavaju oligodendrocite i neurone od oštećenja posredovanog T ćelijama, bez uticaja na imunomodulatornu aktivnost T-limfocita.

7. L I T E R A T U R A

Abrial E, Bétourné A, Etiévant A, Lucas G, Scarna H, Lambás-Señas L, Haddjeri N. Protein Kinase C Inhibition Rescues Manic-Like Behaviors and Hippocampal Cell Proliferation Deficits in the Sleep Deprivation Model of Mania. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(2).

Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest.* 2003;111:1887-95.

Adams DO, Hamilton TA. Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev.* 1987; 97:5-27.

Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, et al. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol.* 1995;63:17-27.

Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):153-60.

Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, Sullivan JM, Solomon A, Rodriguez-Manzanet R, et al. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T and B cells. *J Immunol.* 2012;188:2084-92.

Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):323-40.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* 2007;61:288-99.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007;61:504-13.

Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2013;13:3-9.

Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, Broer L, Jafari N, Hillert J, et al. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2008;40:1402-3.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 2000;192:393-404.

Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *J Neurosci Res.* 2002;69:278-83.

Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci.* 2001;21:6480-91.

Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, et al. Wellcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC), Compston A Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1309-13.

Barcellos LP, Kamdar BB, Ramsay PP, DeLoa C, Lincoln RR, Caillier S, et al. Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006;5:824–931.

Barton A, Woolmore JA, Ward D, Eyre S, Hinks A, Ollier WE, Strange RC, Fryer AA, John S, Hawkins CP, Worthington J. Association of protein kinase C alpha (PRKCA) gene with multiple sclerosis in a UK population. *Brain.* 2004;127:1717-22.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011;63:182-217.

Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, et al. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: Impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun.* 2014;54C:33-50.

Ben-Nun A, Kerlero de Rosbo N, Kaushansky N, Eisenstein M, Cohen L, Kaye JF, Mendel I. Anatomy of T cell autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein

(MOG): prime role of MOG44F in selection and control of MOG-reactive T cells in H-2b mice. *Eur J Immunol.* 2006;36:478-93.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981;11(3):195-9.

Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 2003;349:139-45.

Bermel RA, Rudick RA Interferon-beta treatment for multiple sclerosis..*Neurotherapeutics.* 2007;4:633-46.

Besser MJ, Ganor Y, Levite M. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *J Neuroimmunol.* 2005;169(1-2):161-71.

Bettelli E, Baeten D, Jäger A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2393-402.

Bian Q, Kato T, Monji A, Hashioka S, Mizoguchi Y, Horikawa H, Kanba S. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:42-8.

Brok HP, van Meurs M, Blezer E, Schantz A, Peritt D, Treacy G, Laman JD, Bauer J, 't Hart BA.Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol.* 2002;169(11):6554-63.

Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* 2010;41(2-3):242-7.

Bruijnzeel D, Suryadevara U, Tandon R. Antipsychotic treatment of schizophrenia: An update. *Asian J Psychiatr.* 2014;11C:3-7.

Brunet A., Datta S. R. and Greenberg M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin. Neurobiol.* 2001;11, 297-305.

Brust TF, Hayes MP, Roman DL, Watts VJ. New functional activity of aripiprazole revealed: Robust antagonism of D2 dopamine receptor-stimulated G β γ signaling. *Biochem Pharmacol.* 2015;93(1):85-91.

Calabresi PA, Fields NS, Maloni HW, Hanham A, Carlino J, Moore J, et al. Phase 1 trial of transforming growth factor beta 2 in chronic progressive MS. *Neurology.* 1998;51:289-92.

Cappelli A, Gallelli A, Manini M, Anzini M, Mennuni L, Makovec F, Menziani MC, Alcaro S, Ortuso F, Vomero S. Further studies on the interaction of the 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) receptor with arylpiperazine ligands. development of a new 5-HT₃ receptor ligand showing potent acetylcholinesterase inhibitory properties. *J Med Chem.* 2005;48(10):3564-75.

Cassarino DS, Fall CP, Smith TS, Bennett JP Jr. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *J Neurochem.* 1998;71:295-301.

Chen BH, Yan BC, Park JH, Ahn JH, Lee DH, Kim IH, Cho JH, Lee JC, Kim SK, Lee B, Cho JH, Won MH, Lee YL. Aripiprazole, an atypical antipsychotic drug, improves maturation and complexity of neuroblast dendrites in the mouse dentate gyrus via increasing superoxide dismutases. *Neurochem Res.* 2013;38(9):1980-8.

Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J.* 2004;18(10):1162-4.

Chen L., Xu B., Liu L., Luo Y., Yin J., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X. and Huang S. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab. Invest.* 2010;90,762-773.

Chen ML, Yan BS, Kozoriz D, Weiner HL. Novel CD8⁺ Treg suppress EAE by TGF- β - and IFN- γ -dependent mechanisms. *Eur J Immunol.* 2009;39:3423-35.

Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, Macallister WS, Elkins LE, Krupp LB. Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2006;245(1-2):127-36.

Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2011;69:759-77.

Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*. 2014;311:1670-83.

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

Cornaby C, Gibbons L, Mayhew V, Sloan CS, Welling A, Poole BD. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2014;163:56-68.

Cosi C, Waget A, Rollet K, Tesori V, Newman-Tancredi A. Clozapine, ziprasidone and aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: role of 5-HT1A receptor activation. *Brain Res*. 2005;1043(1-2):32-41.

Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol*. 2001;112:1-14.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.

D'Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2012;124:599-614.

Das A, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of Lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2008a;86(13):2992-3001.

Das A., Guyton M. K., Butler J. T., Ray S. K. and Banik N. L. Activation of calpain and caspase pathways in demyelination and neurodegeneration in animal model of multiple sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2008b; 7, 313-320.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231-41.

Davydova SM, Cheido MA, Gevorgyan MM, Idova GV Effects of 5-HT_{2A} receptor stimulation and blocking on immune response. *Bull Exp Biol Med.* 2010;150(2):219-21.

De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. International MS Genetics Consortium. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;41:776-82.

Deckx N, Lee WP, Berneman ZN, Cools N. Neuroendocrine immunoregulation in multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:705232.

Deguil J., Perault-Pochat M. C., Chavant F., Lafay-Chebassier C., Fauconneau B. and Pain S. Activation of the protein p70S6K via ERK phosphorylation by cholinergic muscarinic receptors stimulation in human neuroblastoma cells and in mice brain. *Toxicol. Lett.* 2008;182:91-96.

Delgoffe G. M., Pollizzi K. N., Waickman A. T., Heikamp E., Meyers D. J., Horton M. R., Xiao B., Worley P. F. and Powell J. D. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* 2011;12,295-303.

Dello Russo C., Lisi L., Feinstein D. L. and Navarra P. mTOR kinase, a key player in the regulation of glial functions: relevance for the therapy of multiple sclerosis. *Glia* 2013;61: 301-311.

Dhib-Jalbut S Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2002;58:S3-9.

Diem R., Sattler M. B. and Bahr M. Neurodegeneration and -protection in autoimmune CNS inflammation. *J. Neuroimmunol.* 2007;184:27-36.

Dijkstra CD, van der Voort ER, De Groot CJ, Huitinga I, Uitdehaag BM, Polman CH, Berkenbosch F. Therapeutic effect of the D₂-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinology.* 1994;19(2):135-42.

Donia M., Mangano K., Amoroso A., Mazzarino M. C., Imbesi R., Castrogiovanni P., Coco M., Meroni P. and Nicoletti F. Treatment with rapamycin ameliorates clinical and histological signs of protracted relapsing experimental allergic

encephalomyelitis in Dark Agouti rats and induces expansion of peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Autoimmun.* 2009; 33, 135-140.

Dündar Y, Gökçe M, Küpeli E, Sahin MF. Synthesis and analgesic and anti-inflammatory activity of ethyl (6-substituted-3 (2H)-pyridazinone-2-yl)acetate derivatives. *Arzneimittelforschung.* 2007;57(12):777-81.

Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2006;59:478-89.

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature.* 1995;377:150-1.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011;12(6):568-75.

Ellwardt E, Zipp F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. *Exp Neurol.* 2014;262PA:8-17.

Eren I, Naziroğlu M, Demirdaş A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res.* 2007;32(7):1188-95. Epub 2007 Mar 31.

Esposito M., Ruffini F., Bellone M., Gagliani N., Battaglia M., Martino G. and Furlan R. Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. *J. Neuroimmunol.* 2010;220, 52-63.

Fang C. X., Yang X., Sreejayan N. and Ren J. Acetaldehyde promotes rapamycin-dependent activation of p70(S6K) and glucose uptake despite inhibition of Akt and mTOR in dopaminergic SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Exp. Neurol.* 2007;203: 196-204.

Fang M, Sun Y, Hu Z, Yang J, Davies H, Wang B, Ling S, Han S. C16 peptide shown to prevent leukocyte infiltration and alleviate detrimental inflammation in acute allergic encephalomyelitis model. *Neuropharmacology.* 2013;70:83-99.

Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3:944-50.

Fraussen J, Claes N, de Bock L, Somers V. Targets of the humoral autoimmune response in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2014;13:1126-1137.

Freire-Garabal M, Núñez MJ, Balboa J, García-Vallejo LA, Argibay S, Rodrigo E, Rey-Méndez M. Administration of the 5-hydroxytryptamine(1A) receptor antagonist WAY100635 suppresses acute experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Neurosci Lett.* 2003;342(1-2):33-6.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354:942-55.

Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev.* 2007;6(3):169-75.

Gaudet AD, Popovich PG Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. *Exp Neurol.* 2014;258:24-34.

Gilden DH. Infective causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4:195–202.

Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006;129:1953-71.

Gold R, Lühder F. Interleukin-17--extended features of a key player in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172:8-10.

Gonsette RE. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg.* 2012;112:133-40.

González-Gómez JC, Santana L, Uriarte E, Brea J, Villazón M, Loza MI, De Luca M, Rivas ME, Montenegro GY, Fontenla JA. New arylpiperazine derivatives with high affinity for alpha1A, D2 and 5-HT2A receptors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13:175-8.

Gouault N, Pinel B, Cupif JF, Depince A, Martin-Chouly CA, Belleguic C, David M. Synthesis and potential anti-inflammatory activity of some tetrahydrophthalazinones. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004;19(6):475-80.

Grifka-Walk HM, Giles DA, Segal BM. IL-12-polarized Th1 cells produce GM-CSF and induce EAE independent of IL-23. *Eur J Immunol.* 2015;45(10):2780-6.

Gu M., Iravani M. M., Cooper J. M., King D., Jenner P. and Schapira A. H. Pramipexole protects against apoptotic cell death by non-dopaminergic mechanisms. *J. Neurochem.* 2004;91:1075-1081.

Haegert DG. Analysis of the threshold liability model provides new understanding of causation in autoimmune diseases. *Med Hypotheses*. 2004;63:257-61.

Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2009;10:5-10.

Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Lindå H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*. 2000;20(14):5283-91.

Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S, Adachi T. Apomorphine attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptotic cell death in SH-SY5Y cells. *Redox Rep*. 2003;8:193-7.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358:676-88.

Heber-Katz E, Acha-Orbea H. The V-region disease hypothesis: evidence from autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Today*. 1989;10:164-9.

Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler*. 2012;18:1334-6.

Hellstrand K, Hermodsson S. Serotonergic 5-HT1A receptors regulate a cell contact-mediated interaction between natural killer cells and monocytes. *Scand J Immunol*. 1993;37(1):7-18.

Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol*. 2010;225(1):9-17.

Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, Gold R. The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine*. 2007;40:35-43.

Høglund RA, Maghazachi AA. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World J Exp Med*. 2014;4:27-37.

Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Janssens AC, Ramagopalan SV, Broer L, Kayser M, et al. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *J Hum Genet.* 2009;54:676-80.

Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(10):1017-33.

Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 2010;24:1023-34.

Ignjatović Đ, Vojnović Milutinović D, Nikolić-Kokić A, Slavić M, Andrić D, Tomić M, Kostić-Rajačić S. The mechanisms responsible for neuroprotective capacity of arylpiperazine dopaminergic ligands against cell death induced by sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol.* 2012;683(1-3):93-100.

Inoue M, Okazaki T, Kitazono T, Mizushima M, Omata M, Ozaki S. Regulation of antigen-specific CTL and Th1 cell activation through 5-Hydroxytryptamine 2A receptor. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(1):67-73.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2010;19:953-62.

Ishigooka J, Nakamura J, Fujii Y, Iwata N, Kishimoto T, Iyo M, Uchimura N, Nishimura R, Shimizu N; ALPHA Study Group. Efficacy and safety of aripiprazole once-monthly in Asian patients with schizophrenia: A multicenter, randomized, double-blind, non-inferiority study versus oral aripiprazole. *Schizophr Res.* 2015;161(2-3):421-8.

Ishima T, Iyo M, Hashimoto K: Neurite outgrowth mediated by the heat shock protein Hsp90alpha: a novel target for the antipsychotic drug aripiprazole. *Translational Psychiatry* 2012, 2:e170.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 2006;126:1121-33.

Jacobs CA, Baker PE, Roux ER, Picha KS, Toivola B, Waugh S, Kennedy MK. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 alpha and suppressed by soluble IL-1 receptor. *J Immunol.* 1991;146(9):2983-9.

Javed A., Khan O. Acute disseminated encephalomyelitis. *Handb. Clin. Neurol.* 2014;123: 705-717.

Jaeschke A., Hartkamp J., Saitoh M., Roworth W., Nobukuni T., Hodges A., Sampson J., Thomas G. and Lamb R. Tuberos sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositide-3-OH kinase is mTOR independent. *J. Cell Biol.* 2002;159:217-224.

Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet.* 1972;1:1240-1.

Jiang Y, Zou Y, Chen S, Zhu C, Wu A, Liu Y, Ma L, Zhu D, Ma X, Liu M, Kang Z, Pi R, Peng F, Wang Q, Chen X. The anti-inflammatory effect of donepezil on experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. *Neuropharmacology.* 2013;73:415-24.

Jiang Z, Yu PH. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and (phosphoinositide 3-kinase)/Akt signal pathways in acquired resistance against neurotoxin of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y cells following cell-cell interaction with astrocytes. *Neuroscience.* 2005;133(2):405-11.

Johnson HL, Jin F, Pirko I, Johnson AJ. Theiler's murine encephalomyelitis virus as an experimental model system to study the mechanism of blood-brain barrier disruption. *J Neurovirol.* 2014;20:107-12.

Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol.* 1998;160:3056-9.

Kakalacheva K, Lünemann JD. Environmental triggers of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011;585:3724-9.

Kato T, Mizoguchi Y, Monji A, Horikawa H, Suzuki SO, Seki Y, Iwaki T, Hashioka S, Kanba S. Inhibitory effects of aripiprazole on interferon-gamma-induced microglial activation via intracellular Ca²⁺ regulation in vitro. *J Neurochem.* 2008;106(2):815-25.

Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inoguchi T, Utsumi H, Kanba S. Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia. *Schizophr Res.* 2011;129(2-3):172-82.

Kawakami N, Lassmann S, Li Z, Odoardi F, Ritter T, Ziemssen T, Klinkert WE, Ellwart JW, Bradl M, Krivacic K, Lassmann H, Ransohoff RM, Volk HD, Wekerle H, Linington C, Flügel A. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2004;199(2):185-97.

Kaye JF, Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Flechter S, Hoffman M, Yust I, Ben-Nun A. The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol.* 2000;102:189-98.

Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet.* 2005;366:579-82.

Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Ben-Nun A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol.* 1995;25:985-93.

Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest.* 1993;92:2602-8.

Khalaj A. J., Yoon J., Nakai J., Winchester Z., Moore S. M., Yoo T., Martinez-Torres L., Kumar S., Itoh N. and Tiwari-Woodruff S. K. Estrogen receptor (ER) beta expression in oligodendrocytes is required for attenuation of clinical disease by an ERbeta ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013;110, 19125-19130.

Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of

transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med*. 1992;176:1355-1364.

Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25:491-502.

Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol*. 2014;258:5-16.

Kipnis J, Cardon M, Avidan H, Lewitus GM, Mordechay S, Rolls A, Shani Y, Schwartz M. Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci*. 2004;24(27):6133-43.

Kirino E. Use of aripiprazole for delirium in the elderly: a short review. *Psychogeriatrics*. 2014.

Klöße SS, Allen RC, Wilker JC, Woodward DL. Benzenesulfenamides as antihypertensive agents. Substituted piperidine and 1-arylpiperazine derivatives. *J Med Chem*. 1980;23:677-9.

Klose J, Schmidt NO, Melms A, Dohi M, Miyazaki J, Bischof F, Greve B. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. *J Neuroinflammation*. 2013;10:117.

Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, Mak TW. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*. 1992;256:1210-3.

Koprivica V, Regardie K, Wolff C, Fernald R, Murphy JJ, Kambayashi J, Kikuchi T, Jordan S. Aripiprazole protects cortical neurons from glutamate toxicity. *Eur J Pharmacol*. 2011;651(1-3):73-6.

Korn-Lubetzki I, Kahana E, Cooper G, Abramsky O. Activity of multiple sclerosis during pregnancy and puerperium. *Ann Neurol* 1984;16:229–31.

Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol*. 2009;39:2031-5.

Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 2008;205(7):1535-41.

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002;125(Pt 10):2202-12.

Kumar S, Patel R, Moore S, Crawford DK, Suwanna N, Mangiardi M, Tiwari-Woodruff SK Estrogen receptor β ligand therapy activates PI3K/Akt/mTOR signaling in oligodendrocytes and promotes remyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2013;56:131-44.

Laatsch RH, Kies MW, Gordon S, Alvord EC Jr. The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med*. 1962;115:777-88.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001;7:115-21.

Lee JE, Koh HY, Seo SH, Baek YY, Rhim H, Cho YS, Choo H, Pae AN. Synthesis and biological evaluation of oxazole derivatives as T-type calcium channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20:4219-22.

Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH. Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm*. 2000;107:1165-73.

Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008;180:825-32.

Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lacivita E, Perrone R, Tortorella V. Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(2):247-55.

Libbey JE, Fujinami RS Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine*. 2011;29:3356-62.

Lim SY and Constantinescu CS. TNF-alpha: A Paradigm of Paradox and Complexity in Multiple Sclerosis and its Animal Models. *Open Autoimmun J*. 2010; 2: 160-170.

Link H, Laurenzi MA. Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in multiple sclerosis determined by agarose gel electrophoresis and immunofixation. *Ann Neurol.* 1979;6:107-10.

Linker RA, Sendtner M, Gold R. Mechanisms of axonal degeneration in EAE-lessons from CNTF and MHC I knockout mice. *J Neurol Sci.* 2005;233(1-2):167-72.

Liu Y., Vertommen D., Rider M. H. and Lai Y. C. Mammalian target of rapamycin-independent S6K1 and 4E-BP1 phosphorylation during contraction in rat skeletal muscle. *Cell Signal.* 2013;25:1877-1886.

López-Rodríguez ML, Rosado ML, Benhamú B, Morcillo MJ, Sanz AM, Orensanz L, Beneitez ME, Fuentes JA, Manzanares J. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 1. 2-[[4-(o-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1, 3-dioxoperhydroimidazo[1,5- α]pyridine: a selective 5-HT_{1A} receptor agonist. *J Med Chem.* 1996;39(22):4439-50.

Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):332-8.

Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol.* 1999;29:3432-9.

Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol.* 2002;32(7):1905-13.

Ma GF, Raivio N, Sabrià J, Ortiz J. Agonist and antagonist effects of aripiprazole on D₂-like receptors controlling rat brain dopamine synthesis depend on the dopaminergic tone. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(4).

Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996; 183(1):147-57.

Magnuson B., Ekim B. and Fingar D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* 2012; 441, 1-21.

Malempati RN. Aripiprazole Adjunct Treatment in Bipolar I or II Disorder, Depressed State: A 2-Year Clinical Study. *J Nerv Ment Dis.* 2015;203(1):58-64.

Mandolesi G, Gentile A, Musella A, Centonze D. IL-1 β dependent cerebellar synaptopathy in a mouse model of multiple sclerosis. *Cerebellum*. 2015;14(1):19-22.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461:747-53.

Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 2001;7:899-905.

Martin D, Near SL. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol*. 1995;61:241-5.

Matsuo T., Izumi Y., Kume T., Takada-Takatori Y., Sawada H. and Akaike A. Protective effect of aripiprazole against glutamate cytotoxicity in dopaminergic neurons of rat mesencephalic cultures. *Neurosci. Lett*. 2010;481:78-81.

May MJ, Ager A. ICAM-1-independent lymphocyte transmigration across high endothelium: differential up-regulation by interferon gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 beta. *Eur J Immunol*. 1992; 22(1):219-26.

McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8:913-9.

McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(3):314-24.

Mei F, Guo S, He Y, Wang L, Wang H, Niu J, Kong J, Li X, Wu Y, Xiao L. Quetiapine, an atypical antipsychotic, is protective against autoimmune-mediated demyelination by inhibiting effector T cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42746.

Melcon MO, Correale J, Melcon CM. Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J Neurol Sci*. 2014;344:171-81.

Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:1951-9.

Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010;9:A387-94.

Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2014;13:518-24.

Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9:540-9.

Miranda-Hernandez S, Baxter AG. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013;2(1):75-93.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998;78(1):189-225.

Mizoguchi Y, Kato TA, Horikawa H, Monji A. Microglial intracellular Ca²⁺ signaling as a target of antipsychotic actions for the treatment of schizophrenia. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:370.

Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med.* 2013;210:2921-37.

Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010;11(1):21-7.

Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):641-51.

Nair VD, Olanow CW, Sealfon SC. Activation of phosphoinositide 3-kinase by D2 receptor prevents apoptosis in dopaminergic cell lines. *Biochem J.* 2003;373:25-32.

Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, et al. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest.* 2003;112:1037-48.

Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y, Matsushita S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(2):286-91.

Nicklas W., Baneux P., Boot R., Decelle T., Deeny A. A., Fumanelli M. and Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2002;36:20-42.

Nishibayashi S, Asanuma M, Kohno M, Gómez-Vargas M, Ogawa N. Scavenging effects of dopamine agonists on nitric oxide radicals. *J Neurochem.* 1996;67:2208-11.

Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology.* 2006;50(5):540-7.

Nowakowska E, Kus K, Ratajczak P, Cichocki M, Woźniak A. The influence of aripiprazole, olanzapine and enriched environment on depressant-like behavior, spatial memory dysfunction and hippocampal level of BDNF in prenatally stressed rats. *Pharmacol Rep.* 2014;66(3):404-11.

Obniska J, Chlebek I, Kamiński K, Bojarski AJ, Satała G. Synthesis, anticonvulsant activity and 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptors affinity of 1-[(4-arylpiperazin-1-yl)-propyl]-succinimides. *Pharmacol Rep.* 2012;64(2):326-35.

Oliver F. J., de la Rubia G., Rolli V., Ruiz-Ruiz M. C., de Murcia G. and Murcia J. M. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 33533-33539.

Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet.* 1987;1:893-5.

Pellegrino TC, Bayer BM. Role of central 5-HT₂ receptors in fluoxetine-induced decreases in T lymphocyte activity. *Brain Behav Immun.* 2002;16(2):87-103.

Pender MP, McCombe PA, Yoong G, Nguyen KB. Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmun.* 1992 ;5(4):401-10.

Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* 2011; 585(23):3747-57.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178(1):39-48.

Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest.* 1978;38:409-21.

Qing H, Xu H, Wei Z, Gibson K, Li XM. The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis. *Eur J Neurosci.* 2003;17:1563-70.

Qiu Y, Peng Y, Wang J. Immunoregulatory role of neurotransmitters. *Adv Neuroimmunol.* 1996;6(3):223-31.

Radad K, Gille G, Rausch WD. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 2005;57:701-12.

Ramirez A. D., Wong S. K. and Menniti F. S. Pramipexole inhibits MPTP toxicity in mice by dopamine D3 receptor dependent and independent mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 475: 29-35.

Ransohoff RM. Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2007;356:2622-9.

Raposo C, Graubardt N, Cohen M, Eitan C, London A, Berkutzki T, Schwartz M. CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *J Neurosci.* 2014;34(31):10141-55.

Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol.* 1995;154(2):944-53.

Rezayat AA, Hebrani P, Behdani F, Salaran M, Marvast MN. Comparison the effectiveness of aripiprazole and risperidone for the treatment of acute bipolar mania. *J Res Med Sci.* 2014;19(8):733-8.

Ries V., Henchcliffe C., Kareva T., Rzhetskaya M., Bland R., During M. J., Kholodilov N., Burke R. E. Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18757-62.

Rifa'i M, Shi Z, Zhang SY, Lee YH, Shiku H, Isobe K, Suzuki H. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int Immunol.* 2008;20:937-47.

Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* 1935;61:689-702.

Robinson A. P., Harp C. T., Noronha A. and Miller S. D. (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb. Clin. Neurol.* 122: 173-189.

Rott O, Fleischer B, Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol.* 1994;24:1434-40.

Rubio JP, Stankovich J, Field J, Tubridy N, Marriott M, Chapman C, et al. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes Immun.* 2008;9:624-30.

Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, Leslie C, Shaffer SA, Goodlett DR, Rudensky AY. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol.* 2012;13(10):1010-9.

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol.* 1993;33:281-5.

Saha B, Mondal AC, Basu S, Dasgupta PS. Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells by D1 dopamine receptors: an in vitro analysis. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(7):1363-74.

Salles MJ, Hervé D, Rivet JM, Longueville S, Millan MJ, Girault JA, Mannoury la Cour C. Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem.* 2013;125:532-44.

Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, et al. Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-beta (TGF-beta) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF-beta and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1993;151:1116-27.

Sanvito L, Constantinescu CS, Gran B, Hart BA. The Multifaceted Role of Interferon-gamma in Central Nervous System Autoimmune Demyelination. *Open Autoimmun J.* 2010; 2: 151-159.

Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case

Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis., *Nature*. 2011;476:214-9.

Schluesener HJ, Wekerle H. Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J Immunol*. 1985;135:3128-33.

Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH; Ustekinumab MS Investigators. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol*. 2008;7:796-804.

Seki Y, Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Horikawa H, Sato-Kasai M, Yoshiga D, Kanba S. Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. *Schizophr Res*. 2013;151(1-3):20-8.

Shemer A, Jung S. Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2015;37(6):613-23.

Sibley DR, Monsma FJ Jr, Shen Y. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol*. 1993;35:391-415.

Skurkovich S, Boiko A, Beliaeva I, Buglak A, Alekseeva T, Smirnova N, et al. Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2001;7:277-84.

Sosa RA, Forsthuber TG. The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(10):753-68.

Soskić V, Joksimović J. Bioisosteric approach in the design of new dopaminergic/serotonergic ligands. *Curr Med Chem*. 1998;5(6):493-512.

Sriram S. i Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol*. 2005;58:939-945.

Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol*. 2005;26:565-71.

Stevens DB, Chen K, Seitz RS, Sercarz EE, Bronstein JM. Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol.* 1999;162:7501-9.

Sukalovic V, Bogdan AE, Tovilovic G, Ignjatovic D, Andric D, Kostic-Rajacic S, Soskic V. N- $\{[2-(4\text{-Phenyl-piperazin-1-yl})\text{-ethyl}]\text{-phenyl}\}$ -arylamides with dopamine D and 5-Hydroxytryptamine 5HT(1A) activity: synthesis, testing, and molecular modeling. *Arch Pharm (Weinheim).* 2013;346(10):708-17.

Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2001;166:7579-87.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-69.

Taverne T, Diouf O, Depreux P, Poupaert JH, Lesieur D, Guardiola-Lemaître B, Renard P, Rettori MC, Caignard DH, Pfeiffer B. Novel benzothiazolin-2-one and benzoxazin-3-one arylpiperazine derivatives with mixed 5HT1A/D2 affinity as potential atypical antipsychotics. *J Med Chem.* 1998;41(12):2010-8.

Tomić M., M. Kundaković, B. Butorović, V. Vasilev, D. Dragović, G. Roglić, DJ. Ignjatović, V. Šoškić, S. Kostić-Rajačić. Pharmacological evaluation of 5- $\{2-[4-(2\text{-methoxyphenyl})\text{-piperazin-1-yl}]\text{-ethyl}\}$ -1,3-dihydro-benzimidazole-2-thione as a potential atypical antipsychotic Agent. *Pharmazie* 2003; 58(9): 677–678.

Tovilovic G, Zogovic N, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Janjetovic K, Vucicevic L, Kostic-Rajacic S, Schrattenholz A, Isakovic A, Soskic V, Trajkovic V. Arylpiperazine dopaminergic ligands protect neuroblastoma cells from nitric oxide (NO)-induced mitochondrial damage and apoptosis. *ChemMedChem.* 2012;7(3):495-508.

Tovilovic G, Zogovic N, Soskic V, Schrattenholz A, Kostic-Rajacic S, Misirkic-Marjanovic M, Janjetovic K, Vucicevic L, Arsikin K, Harhaji-Trajkovic L, Trajkovic V. Arylpiperazine-mediated activation of Akt protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from 6-hydroxydopamine-induced apoptotic and autophagic death. *Neuropharmacology.* 2013;72:224-35.

Tuohy VK, Lu ZJ, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1988;141:1126-30.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172:146-55.

Valentin-Torres A, Savarin C, Hinton DR, Phares TW, Bergmann CC, Stohlman SA. Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 2016 Feb 22;13:46.

Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JN, Mott R, Flint J. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics.* 2006;174:959-84.

Vartanian TK. MS as a neurodegenerative disease (a thought experiment): the clinical evidence. *Adv Stud Med* 2008;8:305–8.

Vila-del Sol V, Punzón C, Fresno M. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. *J Immunol.* 2008;181(7):4461-70.

Vila-del Sol V, Díaz-Muñoz MD, Fresno M. Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):272-83.

Vollmer T, Stewart T, Baxter N. Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S41-6.

Vu T, Myers LW, Ellison GW, Mendoza F, Bronstein JM. T-cell responses to oligodendrocyte-specific protein in multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2001;66:506-9.

Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004;10(11):1216-21.

Watanabe Y, Nakayama T, Nagakubo D, Hieshima K, Jin Z, Katou F, Hashimoto K, Yoshie O. Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8⁺ T cells via dopamine receptor D3. *J Immunol.* 2006;176(2):848-56.

Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:932-41.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006; 24:677–688.

Weber F, Fontaine B, Cournu-Rebeix I, Kroner A, Knop M, Lutz S, et al. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes Immun*. 2008;9:259-63.

Wei Z, Mousseau DD, Richardson JS, Dyck LE, Li XM. Atypical antipsychotics attenuate neurotoxicity of beta-amyloid(25-35) by modulating Bax and Bcl-X(l/s) expression and localization. *J Neurosci Res*. 2003;74(6):942-7.

Weir CR, Nicolson K, Bäckström BT. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(1):14-20.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl:S47-53.

Whitham RH, Bourdette DN, Hashim GA, Herndon RM, Ilg RC, Vandenberg AA, Offner H. Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1991;146:101-7.

Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1368-79.

Wingerchuk DM, Carter JL. Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clin Proc*. 2014;89:225-40.

Wu X., Reiter C. E., Antonetti D. A., Kimball S. R., Jefferson L. S. and Gardner T. W. Insulin promotes rat retinal neuronal cell survival in a p70S6K-dependent manner. *J. Biol. Chem*. 2004; 279, 9167-9175.

Xiao L, Xu H, Zhang Y, Wei Z, He J, Jiang W, Li X, Dyck LE, Devon RM, Deng Y, Li XM. Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes. *Mol Psychiatry*. 2008;13(7):697-708.

Xu H, Wang H, Zhuang L, Yan B, Yu Y, Wei Z, Zhang Y, Dyck LE, Richardson SJ, He J, Li X, Kong J, Li XM. Demonstration of an anti-oxidative stress

mechanism of quetiapine: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2008;275(14):3718-28.

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

Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008;28(1):29-39

Yoneyama M, Hasebe S, Kawamoto N, Shiba T, Yamaguchi T, Kikuta M, Shuto M, Ogita K. Beneficial in vivo effect of aripiprazole on neuronal regeneration following neuronal loss in the dentate gyrus: evaluation using a mouse model of trimethyltin-induced neuronal loss/self-repair in the dentate gyrus. *J Pharmacol Sci.* 2014;124(1):99-111.

Yuan XQ, Qiu G, Liu XJ, Liu S, Wu Y, Wang X, Lu T. Fluoxetine promotes remission in acute experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Neuroimmunomodulation.* 2012;19(4):201-8.

Zajdel P, Partyka A, Marciniak K, Bojarski AJ, Pawlowski M, Wesolowska A. Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole: novel antipsychotic agents? *Future Med Chem.* 2014;6(1):57-75.

Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature.* 1985; 317:355-8.

Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16(2):249-56.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 2000;151:483-94.

BIOGRAFIJA

Marjan S. Popović je rođen 26.05.1977. u Beogradu. Upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 1996. godine, gde je, kao redovan student studijske grupe Molekularna biologija i fiziologija na smeru Genetski inženjering i biotehnologija, diplomirao 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,17. Kao stipendista evropske Marija Kiri fondacije 2005. godine odlazi na poslediplomsko usavršavanje u Švedsku, na Univerzitet u Lundu i Karolinska Institutu u Stokholmu gde je radio na ispitivanju molekularne genetike reumatoidnog artritisa u modelu kod miša. Magistarsku tezu pod nazivom “Potraga za genima koji regulišu artritis na mišjim hromozomima 6 i 14” odbranio je 2008. godine na Karolinska Institutu u Stokholmu. U istoj laboratoriji u Stokholmu nastavlja dalji rad u oblasti molekularne genetike reumatoidnog artritisa do 2011. godine, koji je rezultirao objavljivanjem dve nove publikacije.

Od 2011. godine nastavlja poslediplomsko usavršavanje na doktorskim studijama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna Medicina, gde radi kao istraživač-saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja”, evidencioni broj 41025, čiji rukovodilac je prof.dr.Vladimir Trajković. Učestvovao je na više međunarodnih i domaćih naučnih skupova, i dobitnik je nagrade za najbolji sažetak na 27. kongresu evropskog koledža za neuropsihofarmakologiju (ECNP) 2014. godine u Berlinu. Član je Društva imunologa Srbije (DIS), Društva za neuronauke Srbije (DNS), Društva genetičara Srbije i evropskog udruženja društava za neuronauke (FENS). Od juna 2015. godine radi kao molekularni biolog i fiziolog u Laboratoriji za Humanu Genetiku i Prenatalnu Dijagnostiku Kliničko-Bolničkog Centra Zvezdara.

Autor i koautor je 4 rada objavljena u međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Marjan Popović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.05.2016.

Marjan Popović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Marjan Popović

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih
liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“

Mentor prof.dr Vladimir Trajković

Komentor prof.dr Aleksandra Isaković

Potpisani Marjan Popović

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.05.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“

koja je moje autorsko delo.

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

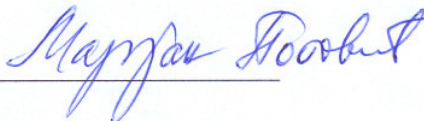
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.05.2016.



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.