

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Neda G. Đedović

**Mehanizmi antiencefalitogenog dejstva  
etil-piruvata u eksperimentalnom  
autoimunskom encefalomijelitisu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Neda G. Đedović

**Antiencephalitogenic mechanisms of  
ethyl pyruvate in experimental  
autoimmune encephalomyelitis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**Mentor:**

**dr Đorđe Miljković**, naučni savetnik

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

**Članovi komisije:**

**dr Đorđe Miljković**, naučni savetnik

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

**dr Biljana Božić Nedeljković**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Irena Lavrnja**, naučni savetnik

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

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekata finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 173035 i OI173013). Deo doktorske disertacije vezan za ispitivanje uticaja etil-piruvata na ćelije centralnog nervnog sistema urađen je u saradnji sa Odeljenjem za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Deo doktorske disertacije vezan za ispitivanje uticaja etil-piruvata na ljudske dendritske ćelije je urađen na Odeljenju za imunologiju Germans Trias i Pujol Univerzitetske bolnice i istraživačkog instituta u Badaloni, Španija.

Hvala,

**Dr Đorđu Miljkoviću**, svom mentoru, na konstantnoj podršci, razumevanju, ukazanom poverenju, strpljenju i entuzijazmu. Hvala na uvođenju u svet nauke i mentorstvu tokom izrade ove doktorske disertacije. Posebno hvala na nesebičnom deljenju znanja, prilici da svakodnevno učim i da se sa uživanjem bavim naukom u pravom smislu te reči.

**Dr Ireni Lavrnji** na učenju histoloških metoda i velikom doprinosu u izradi ove doktorske disertacije. Hvala na uloženom vremenu i trudu, divnoj radnoj atmosferi, kao i na svim savetima, naučnim i prijateljskim.

**Dr Biljani Božić Nedeljković** na zalaganju i konstruktivnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

Dr Mariji Mostarici Stojković na pružanju stručnih saveta, a posebno na učenju o kritičkom načinu razmišljanja u svetu nauke.

Dr Suzi i dr Bokiju na neizmernoj pomoći, podršci i savetima u eksperimentalnom radu, divnoj radnoj atmosferi punoj smeha i radosti, a posebno na prijateljstvu.

Dr Miljani Momčilović na pomoći i uvođenju u eksperimentalni rad od samog početka.

Dr Evi Martinez Kaseres, dr Mariji Hose Mansilja i Huanu Navaru Bariusou na velikom doprinosu u izradi ove doktorske disertacije, prilici da učim od njih, pomoći i trudu.

Dr Tamari Saksidi na saradnji i pomoći u eksperimentalnom radu, kao i na divnom druženju tokom rada i prijateljstvu van Instituta.

Dr Milici Vujičić na savetima i pomoći, kao i prijateljstvu i podršci i van laboratorije.

Dr Ivani Stojanović na učenju i saradnji, druženju i savetima.

Tanji, Miri, Neli, Sanji, Dragici, Milici L., Ivanu, Tamari K., Dijani, Ceci, Sanji J., na kolegijalnosti, pomoći i druženju.

Dini, Ivani Mirkov, Sandri i Jeleni na kolegijalnosti i prijatnoj atmosferi u 66.

Hvala mojim prijateljima iz detinjstva na podršci i razumevanju.

**Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima i Luki na neiscrpoj podršci, ljubavi i strpljenju. Hvala vam što verujete u mene. Bez svega toga ne bih bila ovde gde jesam i ovako srećna.**

## Mehanizmi antiencefalitogenog dejstva etil-piruvata u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

### Sažetak

Multipla skleroza (MS) je hronična, inflamacijska, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS-a). Autoimunski odgovor usmeren protiv CNS-a je bitan element patogeneze MS-e. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) predstavlja životinjski model MS-e pomoću kog se istražuju patogenetski mehanizmi ove bolesti. Glavne ćelije koje učestvuju u pokretanju autoimunskog odgovora usmerenog protiv CNS-a su antigen prezentujuće ćelije (APĆ) koje aktiviraju naivne CD4<sup>+</sup> T-ćelije specifične za antigene CNS-a. Ove CD4<sup>+</sup> T-ćelije se potom diferenciraju u efektorske Th1 (*engl.* T helper cells – Th ćelije) koje imaju sposobnost produkcije interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i Th17 koje proizvode interleukin 17 (IL-17). Prolaskom kroz-krvno-moždanu barijeru, Th1 i Th17 ćelije dolaze u CNS gde ih reaktiviraju rezidentne APĆ, te one sva.ojim produktima privlače druge imunske ćelije u CNS, što sve dovodi do inflamacije koja vodi oštećenju tkiva CNS-a. Patogenezi bolesti doprinose i rezidentne ćelije CNS-a kao što su astrociti i mikroglia.

Etil-piruvat (EP) je lipofilni estar pirogroždane kiseline koji poseduje antioksidativna i antiinflamacijska svojstva. U ovoj studiji je ispitivan antiencefalitogeni efekat EP-a na tok EAE-a i ćelije uključene u patogenezu EAE-a. Takođe, ispitivan je i njegov *in vitro* i *in vivo* tolerogeni uticaj na dendritske ćelije (DĆ). Rezultati su pokazali da EP ostvaruje terapijsko dejstvo na EAE kada se daje pacovima svakodnevno, počev od pojave prvih kliničkih simptoma bolesti sve do njihovog inicijalnog oporavka. Svoj antiencefalitogeni efekat EP je ispoljio sprečavanjem infiltracije imunskih ćelija u CNS, inhibicijom produkcije IL-17 od strane CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini, čime je sprečio zapaljensku reakciju u CNS-u. EP je doveo i do redukcije broja reaktivnih makrofaga i ćelija mikroglije, kao i do inhibicije reaktivnosti astrocita. Takođe, sprečio je i oštećenje neurona. Jedan od mehanizama kojim je EP ostvario svoje dejstvo je inhibicija HMGB1 (grupa proteina visoke mobilnosti 1 (*engl.* High-mobility group box 1) u reaktivnim makrofagima/mikrogliji. Da EP ima i druge efekte na APĆ pokazali su rezultati na makrofagima, *in vitro*. EP je redukovao produkciju proinflamacijskih citokina od strane makrofaga i ekspresiju molekula bitnih za prezentaciju antigena na ovim ćelijama. Zatim, istraživanje je prošireno na DĆ kao profesionalne APĆ. Rezultati su pokazali da EP vrši tolerogeni uticaj na DĆ poreklom iz kostne srži miševa.

Naime, tretman DĆ-a *in vitro* EP-om inhibira njihovu sposobnost efikasne prezentacije antigena, aktivacije T ćelija u alogenoj reakciji i produkcije proinflamacijskih citokina. Molekulski mehanizmi kojim EP ostvaruje svoje dejstvo na mišje DĆ, uključuju stimulaciju signalnog molekula nuklearnog faktora povezanog sa eritrocitima 2 (*engl.* Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2-Nrf2) i enzima hem oksigenaze 1 (HO-1) i NQO1 (*engl.* NADPH-quinone oxidoreductase 1), kao i inhibiciju regulatornog proteina transkripcije nuklearnog faktora κB (NF-κB). EP-om tretirane DĆ ispoljavaju efekte *in vivo* inhibiranjem imunskog odgovora indukovano kompletnim Frojndovim adjuvansom u miševa. Konačno, tolerogeno dejstvo EP-a pokazano je i na DĆ-ma diferenciranim iz monocita ljudi (*engl.* Monocyte derived Dendritic Cells - MoDĆ) dobrovoljnih davalaca krvi i pacijenata obolelih od MS-e.

Iz rezultata ove doktorske disertacije proizilazi da je EP efikasno imunomodulacijsko jedinjenje koje inhibira EAE, kao i da je efikasno tolerogeno jedinjenje koje usmerava DĆ ka imunosupresivnom fenotipu. Samim tim, zaključuje se da EP ima potencijal da bude primenjen u terapiji MS-e. Primena EP bi mogla biti direktna ili u pripremi tolerogenih DĆ za ćelijsku imunoterapiju. Buduće predkliničke i kliničke studije bi trebalo da budu usmerene na istraživanje mogućnosti primene EP u terapiji MS-e, ali i drugih autoimunskih i hroničnih inflamacijskih bolesti.

**Ključne reči:** eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, multipla skleroza, etil-piruvat, tolerogene dendritske ćelije

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunologija

**UDK broj:**

# Anti-encephalitogenic mechanisms of ethyl pyruvate in experimental autoimmune encephalomyelitis

## Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system (CNS) with proposed autoimmune pathogenesis. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS that is widely used to investigate pathogenetic mechanisms of the disease. Antigen presenting cells (APC) are major cells that are involved in the initiation of the autoimmune response against the CNS by activating CNS-specific naive CD4<sup>+</sup> T cells. Consequently, these CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into effector T helper cells 1 (Th1) that produce interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and Th17 cells that produce interleukin 17 (IL-17). Passing through the blood brain barrier, Th1 and Th17 cells arrive in the CNS where they become reactivated by the resident APC. Afterwards, other immune cells infiltrate the CNS, thus causing inflammation and tissue damage. The resident cells of the CNS, such as astrocytes and microglia, also contribute to the disease pathogenesis.

Ethyl pyruvate (EP) is a lipophilic ester of pyruvic acid that possesses anti-oxidative and anti-inflammatory properties. The anti-encephalitogenic effect of EP in EAE and on cells of the CNS involved in the disease pathogenesis, were investigated in this study. Also, its *in vitro* and *in vivo* tolerogenic effect on dendritic cells (DC) was studied. Results showed that EP had a therapeutic effect on EAE when applied to the rats once a day, starting from the first clinical symptoms until their initial recovery. EP prevented immune cells infiltration into the CNS and inhibited T cell production of IL-17 in the spinal cord. Thus, EP restrained the inflammatory reaction in the CNS and therefore exerted its anti-encephalitogenic effect. Furthermore, treatment with EP led to the reduction of macrophages and microglia cell number, inhibition of astrocyte activity, as well as neuron destruction. Inhibition of HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) molecule in activated macrophages/microglia was one of the mechanisms of the EP effects in the CNS. Moreover, *in vitro* treatment of stimulated macrophages with EP showed that EP had also an impact on APC. Treatment with EP led to reduced production of pro-inflammatory cytokines by macrophages as well as to down-regulation of the expression of molecules relevant for antigen presentation. Furthermore, EP had a tolerogenic effect on the major APC, *i.e.* DC. Mice bone marrow derived DC were investigated. *In vitro* treatment of DC with EP inhibited their ability to efficiently present



antigens, to activate T cells in allogeneic reaction, and to produce pro-inflammatory cytokines. Molecular mechanisms involved in the tolerogenic effects of EP on mice DC included stimulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling, increase of heme oxygenase-1 (HO1) and NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) expression, and inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) transcription factor activation. Also, EP-treated DC inhibited immune response *in vivo* induced with complete Freund's adjuvant in mice. Finally, the tolerogenic effects of EP were demonstrated in human monocyte derived DC (MoDC) obtained from healthy individuals and MS patients.

Results of this doctoral thesis show that EP ameliorates EAE and that is also an effective tolerogenic agent that shifts DC towards immune-suppressing phenotype. Thereby, EP has the potential to be applied in MS therapy. Its application could be direct or through generation of tolerogenic DC as a mean of cell-based immunotherapy. Future preclinical and clinical studies should be focused towards investigating the possible application of EP in MS therapy, as well as in other autoimmune and chronic inflammatory diseases.

**Key words:** experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, ethyl pyruvate, tolerogenic dendritic cells

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Immunobiology

**UDK number:**

## **Lista skraćenica:**

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

BMDM – makrofagi poreklom iz kostne srži (*engl.* Bone Marrow Derived Macrophages )

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

CD – *engl.* Cluster of Differentiation

CFA – kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's adjuvant)

CFSE – karboksifluorescein sukcinimidil estar (*engl.* Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)

CNS – centralni nervni sistem

Ctrl – kontrolna životinja

d.p.i. – dan posle imunizacije

DA - Dark Agouti

DAB – 3,3-diaminobenzidin

DC – dendritske ćelije

DLČ – drenirajući limfni čvorovi

EAE – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

EP – etil-piruvat

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

GFAP – glijalni fibrilarni protein astrocita (*engl.* Glial Fibrillary Acidic Protein)

GM-CSF – *engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HKM – homogenat kičmene moždine

HMGB1 – grupa proteina visoke mobilnosti 1 (*engl.* High-mobility group box 1)

HO-1 – hem oksigenaza

iDC – nezrele dendritske ćelije (*engl.* immature)

IFN – interferon

iNOS – inducibilna sintaza azot monoksida (eng. Inducible Nitric Oxide Synthase - iNOS)

IL – interleukin

KM – kičmena moždina

k.s. – klinički skor

LPS – lipopolisaharid

MBP – bazni protein mijelina (*engl.* Myelin Basic Protein)

mDĆ – zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature)

mfi – *engl.* mean fluorescence intensity

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

MOG – mijelin oligodendrocitni glikoprotein (*engl.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

MS – multipla skleroza

NDS – *engl.* Normal Donkey Serum

NF-κB – nuklearni faktor κB

NI – neimunizovane životinje

NO – azot-monoksid

NQO1 – *engl.* NADPH-quinone oxidoreductase 1

Nrf2 – nuklearni faktor povezan sa eritrocitima 2 (*engl.* Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2)

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

PBMC – Mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl.* Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS – fosfatni pufer (*engl.* Phosphate Buffer Saline)

PFA – paraformaldehid

PGE2 – prostaglandin E2

PM – peritonealni makrofagi

PMA – forbol miristat acetata (*engl.* Phorbol Miristate Acetate)

PLP – proteolipidni protein

PT – toksin pertuzisa (*engl.* Pertussis Toxin - PT)

RPMI – *engl.* Roswell Park Memorial Institute

tolEP-DC – tolerogene dendritske ćelije tretirane etil-piruvatom

Th – pomoćničke T-ćelije (*engl.* helper T cells)

TMB – tetrametilbenzidin

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

tolDC – tolerogene dendritske ćelije

Treg – regulatorne T-ćelije

## Sadržaj:

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. MULTIPLA SKLEROZA.....	2
1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS.....	4
1.3. ĆELIJE UKLJUČENE U PATOGENEZU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA I MULTIPLE SKLEROZE.....	7
1.3.1. Dendritske ćelije i CD4 <sup>+</sup> T limfociti.....	7
1.3.2. Druge imunske ćelije.....	9
1.3.3. Ćelije centralnog nervnog sistema.....	10
1.4. TERAPIJA MULTIPLE SKLEROZE.....	11
1.4.1. Konvencionalna terapija.....	11
1.4.2. Ćelijska imunoterapija.....	12
1.5. ETIL-PIRUVAT.....	15
<b>2. Ciljevi</b> .....	17
<b>3. Materijal i metode</b> .....	20
3.1. REAGENSI I MEDIJUMI.....	21
3.1.1. Reagensi i rastvori.....	21
3.1.2. Medijumi.....	22
3.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	23
3.3. METODE IZOLOVANJA ĆELIJA.....	23
3.3.1. Izolacija ćelija limfnih čvorova iz miša.....	23
3.3.2. Prečišćavanje CD4 <sup>+</sup> T-limfocita iz miševa magnetnom separacijom.....	23
3.3.3. Izolacija makrofaga iz pacova.....	24

3.3.4. Dobijanje dendritskih ćelija iz matičnih ćelija kostne srži miševa.....	25
3.3.5. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi ljudi.....	26
3.3.6. Dobijanje dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi ljudi.....	26
3.3.7. Određivanje vijabiliteta i broja ćelija.....	27
3.3.8. Određivanje vijabiliteta ćelija testom kristal violet.....	28
<b>3.4. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS.....</b>	<b>29</b>
3.4.1. Indukcija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa u pacova.....	29
3.4.2. Evaluacija kliničke slike.....	29
3.4.3. Primena etil-piruvata pacovima <i>in vivo</i> .....	29
3.4.4. Izolacija ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu.....	30
3.4.5. Histološke analize.....	30
3.4.5.1. Izolacija kičmene moždine iz pacova i priprema tkiva za histologiju.....	30
3.4.5.2. Bojenje tkivnih preseka kičmene moždine hematoksilinom.....	31
3.4.5.3. Imunohistohemija.....	31
<b>3.5. METODE ZA ISPITIVANJE FUNKCIJA ĆELIJA IMUNSKOG SISTEMA....</b>	<b>33</b>
3.5.1. Merenje produkcije citokina metodom ELISA.....	33
3.5.2. Metoda reakcije lančanog umnožavanja.....	34
3.5.2.1. Izolovanje ukupne RNK.....	34
3.5.2.2. Reakcija reverzne transkripcije.....	34
3.5.2.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	35
3.5.2.4. Prajmeri.....	36
3.5.3. Citofluorimetrija.....	36
3.5.3.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula.....	36
3.5.3.2. Detekcija fluorescencije.....	37

<b>3.5.4. Testovi proliferacije ćelija.....</b>	<b>37</b>
3.5.4.1. Određivanje proliferacije mišjih ćelija <i>in vitro</i> obeležavanjem CFSE-om.....	37
3.5.4.2. Određivanje proliferacije ljudskih ćelija <i>in vitro</i> ugradnjom [ <sup>3</sup> H] timidina.....	38
<b>3.5.5. Određivanje alogene proliferacije ćelija.....</b>	<b>38</b>
3.5.5.1. Ko-kultivacija mišjih dendritskih ćelija sa CD4 <sup>+</sup> T-limfocitima.....	38
3.5.5.2. Alogena ko-kultivacija ljudskih dendritskih ćelija sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi.....	38
<b>3.5.6. Imunocitohemija.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6. PRIMENA DENDRITSKIH ĆELIJA <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>40</b>
3.6.1. Tretman C57BL/6 miševa dendritskim ćelijama.....	40
3.6.2. Imunizacija C57BL/6 miševa.....	40
3.6.3. Ispitivanje migracije dendritskih ćelija <i>in vivo</i> .....	41
3.6.4. Unutarćelijsko bojenje ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova C57BL/6 miševa <i>ex vivo</i> .....	41
<b>3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....</b>	<b>42</b>
<b>4. Rezultati.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. UTICAJ <i>IN VIVO</i> TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS KOD DARK AGUTI PACOVA.....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Uticaj etil-piruvata na klinički tok eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa.....	44
4.1.2. Uticaj etil-piruvata na infiltraciju ćelija u kičmenu moždinu tokom eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa.....	45
4.1.3. Uticaj etil-piruvata na produkciju citokina u ćelijama koje infiltriraju kičmenu moždinu tokom eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa.....	47

4.1.4. Uticaj etil-piruvata na makrofage i mikrogliju u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	48
4.1.5. Uticaj etil-piruvata na aktivaciju mikroglije u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	49
4.1.6. Uticaj etil-piruvata na astrocite u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	50
4.1.7. Uticaj etil-piruvata na neurone u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	51
4.1.8. Uticaj etil-piruvata na nivo ekspresije proteina HMGB1 u centralnom nervnom sistemu u pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	52
4.1.9. Uticaj etil-piruvata na nivo ekspresije iRNK za <i>Hmgb1</i> u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	53
4.1.10. Uticaj etil-piruvata na lokalizaciju HMGB1 u ćelijama kičmene moždine pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	54
<b>4.2. UTICAJ <i>IN VITRO</i> TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA MAKROFAGE DARK AGUTI PACOVA.....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Imunomodulacijski uticaj etil-piruvata na makrofage diferencirane iz kostne srži i makrofage poreklom iz peritoneuma pacova <i>in vitro</i> .....	56
4.2.2. Uticaj etil-piruvata na ekspresiju površinskih molekula makrofaga diferenciranih iz kostne srži i makrofaga poreklom iz peritoneuma pacova <i>in vitro</i> .....	58
<b>4.3. UTICAJ <i>IN VITRO</i> TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA MIŠJE DENDRITSKE ĆELIJE.....</b>	<b>59</b>
4.3.1. Uticaj etil-piruvata na vijabilitet dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	59
4.3.2. Uticaj etil-piruvata na produkciju citokina dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	60
4.3.3. Uticaj etil-piruvata na ekspresiju površinskih molekula dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	61



4.3.4. Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom na aktivaciju CD4 <sup>+</sup> T-ćelija <i>in vitro</i> .....	64
4.3.5. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na veličinu i morfologiju dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	65
4.3.6. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju Nrf2 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	67
4.3.7. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju NQO1 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	69
4.3.8. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju HO-1 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	71
4.3.9. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju NF-κB u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa.....	73
4.3.10. Ispitivanje migracije mišjih dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom <i>in vivo</i> .....	75
4.3.11. Ispitivanje efekata dendritskih ćelija na imunski odgovor izazvan CFA-om kod C57BL/6 miševa <i>in vivo</i> .....	76
4.3.12. Ispitivanje efekta dendritskih ćelija na udeo CD4 <sup>+</sup> T-limfocita u poplitealnom limfnom čvoru koji proizvode IL-10, IL-17 i IFN-γ.....	77
<b>4.4. TOLEROGENI POTENCIJAL ETIL-PIRUVATA <i>IN VITRO</i> NA DENDRITSKE ĆELIJE LJUDI.....</b>	<b>79</b>
4.4.1. Uticaj etil-piruvata na vijabilitet dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze.....	79
4.4.2. Uporedna analiza efekata etil-piruvata i 1,25-dihidroksi vitamina D3 na ekspresiju površinskih molekula dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze.....	81
4.4.3. Uporedna analiza uticaja ljudskih dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom ili 1,25 dihidroksi vitaminom D3 na aktivaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi <i>in vitro</i> .....	82

4.4.4 Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze na produkciju citokina u alogenoj ko-kultivaciji.....83

**5. Diskusija.....85**

**6. Zaključci.....96**

**7. Literatura.....99**

# **1. Uvod**

## 1.1. MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza (MS) je hronična zapaljenska, demijelinizirajuća i neurodegenerativna, bolest centralnog nervnog sistema (CNS) od koje boluje oko 2,5 miliona ljudi u svetu (Lassmann *i sar.*, 2007). Ova bolest se uglavnom javlja kod ljudi starosti od 25. do 50. godine života, međutim prema najnovijim podacima prosečna starost ljudi, na svetskom nivou, koji se razboljevaju je u porastu (Vaughn *i sar.*, 2019). Pacijenti koji boluju od MS-e imaju skraćeni životni vek za 6-10 godina u odnosu na generalnu populaciju (Lunde *i sar.*, 2017). Češće se javlja kod žena nego kod muškaraca (odnos 3:1), iako je kod žena slabija progresija bolesti u odnosu na muškarce (Westerlind *i sar.*, 2014). Incidenca MS-e varira u zavisnosti od geografskog regiona, te uglavnom raste sa porastom nadmorske visine (Ahlgren *i sar.*, 2014). Kliničke manifestacije MS-e su senzorne i vizuelne smetnje, motorna disfunkcija koja podrazumeva trnjenje i slabost u jednom ili više udova, umor, bol i kognitivne defekte, disfunkciju bešike, creva, seksualnu disfunkciju, zamućenje vida, delimičan ili kompletan gubitak vida, vrtoglavicu, depresiju, disartriju, tremor i ataksiju (Dendrou *i sar.*, 2015). Lezije u CNS-u su odlika MS-e do kojih dolazi usled infiltracije imunskih ćelija u CNS. Imunske ćelije izazivaju inflamaciju i posledičnu demijelinizaciju, gliozu i degeneraciju neurona (Frischer *i sar.*, 2009; Vaughn *i sar.*, 2019). Inflamacija je prisutna u svim stadijumima bolesti, ali je izraženija u akutnoj fazi u odnosu na hroničnu. Demijelinizacija obuhvata regione bele i sive mase mozga i kičmene moždine koji se nazivaju plake. Plake, koje se nazivaju i sklere, ukazuju na gubitak mijelinskog omotača i oligodendrocita. Iako su aksoni i neuroni pretežno očuvani u početnom stadijumu MS-e, sa napretkom bolesti dolazi do njihovog postepenog gubitka što koreliše sa pogoršanjem simptoma kod pacijenata (Dendrou *i sar.*, 2015).

Postoji nekoliko kliničkih podtipova ove bolesti. Najčešći je relapsno remitentni oblik MS koji se javlja kod 85% pacijenata i karakterišu ga neurološki ispadi, praćeni periodima kliničkog oporavka (remisije). Međutim, vremenom većina pacijenata (oko 80%) uđe u sekundarno progresivnu formu MS-e, jednu do dve decenije nakon uspostavljanja dijagnoze (Fletcher *i sar.*, 2010). Relapsi se podudaraju sa inflamacijom u CNS-u, kao i demijelinizacijom koje su uočljive na magnetnoj rezonanci kao lezije u beloj masi. U sekundarno progresivnoj formi bolesti, inflamacijske lezije nisu više karakteristične i nastaje atrofija tkiva CNS-a koja podrazumeva smanjenje volumena mozga i gubitak aksona. Oko 10% pacijenata boluje od primarno progresivne forme MS-e koju karakteriše progresivni tok

od samog početka i odsustvo remisije (Dendrou *i sar.*, 2015). Takođe, postoji i progresivna forma kombinovana sa povremenim relapsima i remisijama. Neki pacijenti imaju vrlo retke napade i uvek se kompletno oporave i takav tok bolesti se naziva benigna MS. Konačno, postoje slučajevi klinički izolovanih sindroma koji podrazumevaju jednu epizodu neurološkog deficita koja ne vodi dalje u MS (Lassmann *i sar.*, 2001).

Tačan uzrok MS-e nije poznat i smatra se da ova bolest nastaje kao posledica kompleksnog spoja više faktora koji doprinose podložnosti pojedinca da razvije bolest. Ustaljeno je mišljenje da bolest nastaje kod genetički podložnih osoba uz uticaj sredinskih faktora koji doprinose nastanku bolesti (Dendrou *i sar.*, 2015). Naime, epidemiološki podaci ukazuju na blisku vezu genetičkih i sredinskih faktora u etiologiji MS-e (Handel *i sar.*, 2010). Genetičke varijacije čine oko 30% rizika za nastanak bolesti. Pomoću studije genoma identifikovano je više od 100 različitih regiona gena koji su povezani sa MS-om (Beecham *i sar.*, 2013). Većina gena povezana sa ovom bolesti kodira molekule od značaja za imunski sistem. Poznato je da neki haplotipovi glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex - MHC), kao i aleli citokina i njihovih receptora, povećavaju rizik od nastanka MS-e (Gourraud *i sar.*, 2012). Tipičan primer su HLA A\*0201 i HLA DRB1\*1501 varijante (Friese *i sar.*, 2008; Gregersen *i sar.*, 2006), kao i geni koji kodiraju  $\alpha$  lance receptora za interleukin 2 (IL-2) i IL-7 (Hartmann *i sar.*, 2014; Dendrou *i sar.*, 2015; Gregory *i sar.*, 2007; Lundström *i sar.*, 2013). Zanimljivo je da su različitim populacijama identifikovani i različiti genotipovi sklonosti ka oboljevanju od MS-e. Tako su DR15 i DQ6, odnosno njihovi aleli DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102 i DQB2\*0602 (Olerup i Hillert, 1991) identifikovani kao predisponirajući za nastanak MS-e kod ljudi iz severne Evrope, dok su DR4 i njegovi aleli DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302 identifikovani kod stanovnika Sardinije i još nekih mediteranskih grupa (Marrosu *i sar.*, 1992; Gregory *i sar.*, 2007; Dean *i sar.*, 2008). Sredinski faktori koji povećavaju mogućnost nastanka MS-e uključuju infekcije, neadekvatno izlaganje sunčevoj svetlosti i pušenje (Ascherio i Munger, 2008; Handel *i sar.*, 2010). Pokazano je da vitamin D3 direktno stimuliše ekspresiju HLA-DRB1\*15, alela MHC II molekula, koji je glavni genetički faktor rizika za ovu bolest (Čierny *i sar.*, 2019; Ramagopalan i Ebers, 2009). Smatra se da niske doze vitamina D3 u detinjstvu dovode do smanjenja ekspresije HLA-DRB1\*15 u timusu i samim tim do nepravilne prezentacije sopstvenih antigena i neefikasne centralne tolerance (Handunnetthi *i sar.*, 2010). Posledica toga je da se više autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T-ćelija pojavljuje u imunskom sistemu ljudi koji su nosioci HLA-DRB1\*15 i koji imaju hipovitaminozu vitamina D3 u ranom detinjstvu i

adolescenciji (Cortese *i sar.*, 2015; Gourraud *i sar.*, 2012). Dalje, jedan od mogućih uzroka za nastanak MS-e je molekulska mimikrija tj. aktivacija autoreaktivnih T-ćelija specifičnih za antigene CNS-a antigenima poreklom od bakterija ili virusa (Harkiolaki *i sar.*, 2009). Lang i kolege (2002) su opisali osnove molekulske mimikrije između Epštejn Bar virusa (EBV) i sopstvenih proteina. Naime, jedan isti T ćelijski receptor pacijenata obolelih od MS-e prepoznaje bazni protein mijelina (*engl.* Myelin basic protein-MBP) u sklopu DRB1\*1501 i EBV u sklopu DR5\*0101. Potom, nedavno je identifikovan peptid enzima sintaze GDP-L-fukoze kao novi sopstveni antigen koji može biti prepoznat od strane CD4<sup>+</sup> T-ćelija specifičnih za MBP. Ove ćelije se nalaze u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od MS-e (Planas *i sar.*, 2018). Zanimljivo je da se ovaj enzim eksprimira i u bakterijama prisutnim u mikrobioti creva, što ukazuje da bi inicijalna aktivacija T-ćelija reaktivnih na MBP mogla da se ostvari na antigene bakterija creva (Planas *i sar.*, 2018). Dakle, različiti sredinski faktori u kombinaciji sa genetičkom podložnošću doprinose nastanku MS-e.

Iz postojećih naučnih podataka se može zaključiti da je MS heterogena bolest čija patogeneza nije još uvek u potpunosti razjašnjena. Iako se zna da patogeneza MS-e uključuje aktivaciju autoreaktivnih T-limfocita i njihovu migraciju u CNS gde se ostvaruje destruktivno dejstvo imunskog odgovora na ćelije i strukture CNS-a brojni koraci u ovom procesu su i dalje nepoznati. Nepoznanice patogeneze MS-e uključuju inicijalno mesto aktivacije T-limfocita, antigensku specifičnost T-limfocita koji pokreću imunski odgovor, kao i antigensku specifičnost T-limfocita uključenih u progresiju bolesti (Compston i Coles, 2008; Lindner *i sar.*, 2018). Iz tog razloga neophodno je izučavanje njenog životinjskog modela, eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE-a) u različitim životinjskim vrstama da bi se pružio bolji uvid u mehanizme koji kontrolišu krucijalne korake u patogenezi ove teške i onesposobljavajuće bolesti ljudi.

## **1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS**

EAE je autoimunska bolest CNS-a koja se indukuje u podložnim životinjama (glodarima i primatima) i predstavlja najčešći životinjski model u istraživanju patogeneze MS-e, kao i za ispitivanje potencijalnih terapeutika (Denic *i sar.*, 2011). Prvobitno je opisan još daleke 1933. godine (Rivers *i sar.*, 1933). EAE se može izazvati aktivnim ili pasivnim putem (Constantinescu *i sar.*, 2011). Aktivni oblik EAE-a se indukuje imunizacijom antigenima

specifičnim za CNS, peptidima koji potiču iz ovih antigena, ili homogenatima tkiva CNS-a, zajedno sa adjuvansom. Na taj način se pokreće autoimunska reakcija usmerena protiv CNS-a. Pasivni tip EAE-a se izaziva adoptivnim transferom encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-ćelija, dobijenih iz limfnih organa aktivno imunizovanih singenih životinja. Kliničke manifestacije EAE su najčešće atonija repa, pareza i paraliza ekstremiteta, a u ekstremnim stanjima moribund i smrt eksperimentalnih životinja (Miljković i Mostarica Stojković, 2006).

EAE se može indukovati u raznim vrstama životinja (Baxter, 2007). U zavisnosti od toga u kojim vrstama životinja se indukuje EAE (miš, pacov, zec, zamorac i majmun), i u zavisnosti od toga koji tip mijelinskog antigena se koristi za indukciju bolesti, bolest varira od akutnog monofaznog EAE-a do relapsno remitentne ili hronične forme koja je slična MS-i (Hart i Massacesi, 2009). Kod Švajcarskog Džim Lambert (*engl.* Swiss Jim Lambert - SJL) soja miševa, EAE se aktivno indukuje imunizacijom homogenatom CNS-a, proteolipidnim proteinom (PLP), baznim proteinom mijelina (MBP) ili encefalitogenim epitopima PLP-a (PLP<sub>139-151</sub>, PLP<sub>178-191</sub>), mijelin oligodendrocitnim glikoproteinom (MOG<sub>92-106</sub>) ili MBP-a (MBP<sub>84-104</sub>) u emulziji sa kompletnim Frojndovim adjuvansom (*engl.* Complete Frojnd's adjuvant - CFA). Bolest razvija predvidiv klinički tok koga karakteriše induktivni period od 10-15 dana praćen paralizom. Paraliza počinje od repa i zadnjih ekstremiteta i napreduje ka prednjim ekstremitetima. Primetan je gubitak težine životinja. U ovom soju miševa bolest ima relapsno remitentni tok paralize (Robinson *i sar.*, 2014). C57BL/6 soj miševa karakteriše progresivni tok bolesti i EAE se indukuje MOG-om<sub>35-55</sub>, a takođe je neophodan i toksin pertuzisa (*engl.* pertussis toxin - PT). Naime, iako PT ne učestvuje u patogenezi bolesti, njegova primena tokom indukcije EAE-a dovodi do povećanja propustljivosti krvno-moždane barijere, kao i klonalne ekspanzije i diferencijacije T-ćelija (Hasselmann *i sar.*, 2017).

Iako je mišji model EAE-a najčešće korišćen, pacovski model pruža značajan uvid u patogenezu MS-e. Uglavnom se koriste Luis i Dark Aguti (DA) sojevi pacova kod kojih se bolest indukuje homogenatom kičmene moždine singene životinje, MOG-om ili MBP-om. Bolest karakterišu inflamacijski infiltrati mononuklearnih ćelija u CNS-u (kičmena moždina, cerebelum i moždano stablo, ali ne i korteks). EAE indukovan MBP-om kod Luis pacova podrazumeva akutnu paralizu koja nestaje nakon 5-7 dana (Swanborg, 2001). Za razliku od Luis pacova, DA pacovi mnogo lakše razvijaju bolest, moguća je imunizacija homogenatom kičmene moždine i bez prisustva ikakvog adjuvansa. Mogući razlozi za takvu podložnost indukovanju EAE-a ovog soja pacova su to da se autoreaktivni limfociti DA pacova relativno

lako aktiviraju i/ili diferencijaciju, kao i da je ravnoteža između inflamacijskih i regulatornih mehanizama kod ovog soja poremećena u korist proinflamacijskih (Stošić-Grujičić *i sar.*, 2004). Nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine i kompletnim Frojndovim adjuvansom DA pacovi mogu razviti relapsno-remitentnu formu bolesti.

Uprkos velikoj sličnosti u patogenezi EAE-a i MS-e, glavna razlika između ove dve bolesti je način započinjanja autoimunskog odgovora. Naime, inicijacija patogeneze EAE-a je direktna posledica imunizacije životinja encefalitogenom emulzijom u zadnje šape, dok je započinjanje MS-e još uvek nerazjašnjeno. Međutim, histopatološka sličnost između ove dve bolesti ukazuje da druga faza (efektorska faza) imunskog odgovora ima više zajedničkih karakteristika (Hart i Massacesi, 2009). Na primer, akutne lezije i u EAE-u i u MS-i karakterišu inflamacijski infiltrati koji se pretežno sastoje od limfocita i makrofaga, pozicioniranih oko postkapilarnih venula (Baxter, 2007). U skladu sa tim, EAE je široko rasprostranjen model za izučavanje efektorske faze patogeneze MS-e. Tri terapije za tretman pacijenata obolelih od MS-e razvijene su na saznanjima dobijenim iz proučavanja EAE-a i uključuju kopakson, mitoksantron i natalizumab (Yednock *i sar.*, 1992). Međutim, sa druge strane, veliki broj potencijalnih terapija koje su bile efikasne u mišjem modelu EAE-a, nisu pokazale kliničku efikasnost kod ljudi (Sriram i Steiner, 2005; Steinman i Zamvil, 2006). Verovatni uzrok toga je velika evolucionarna razlika između ljudi i glodara. Takođe, inbredni laboratorijski miševi imaju „naivan“ imunski sistem usled neizlaganja infekcijama, što je važna razlika u odnosu na ljude koji su tokom čitavog života izloženi različitim infekcijama (Lathrop *i sar.*, 2011; Maggi *i sar.*, 2017).

Imunski odgovor usmeren protiv sopstvenih antigena generalno, kao i protiv konkretnih antigena CNS-a je regulisan od strane više ćelijskih i molekularnih mehanizama (Goodnow *i sar.*, 2005). Oni uključuju antigen prezentujuće ćelije (APĆ) koje u inicijalnoj fazi imunskog odgovora preuzimaju sopstveni ili strani antigen, procesuiraju ga i prezentuju limfocitima. Takođe, APĆ imaju ulogu u produkciji citokina neophodnih za optimalnu aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za antigen (Bach *i sar.*, 2004). Postojanje autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita sposobnih da prepoznaju relevantni antigen je jedno od osnovnih uslova za postojanje autoimunskog odgovora. Nakon aktivacije, a potom proliferacije i diferencijacije, ovi limfociti odgovaraju na hemotaktične signale i migriraju u ciljno tkivo (Ransohoff *i sar.*, 2003) gde dolazi do procesa njihove reaktivacije (Kawakami *i sar.*, 2004) i ispoljavanja efektorskih funkcija pretežno produkcijom citokina (Wheeler i Owens, 2005). Ovo vodi dodatnoj infiltraciji imunskih ćelija u CNS i sledstvenoj indukciji



jake inflamacije. Rezidentne ćelije u ciljnom tkivu takođe doprinose autoimunskom odgovoru produkovanjem solubilnih medijatora koji dovode do oštećenja tkiva (Raivich i Banati, 2004).

### **1.3. ĆELIJE UKLJUČENE U PATOGENEZU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA I MULTIPLE SKLEROZE**

#### **1.3.1. Dendritske ćelije i CD4<sup>+</sup> T limfociti**

Osnovna pokretačka populacija patogeneze EAE-a i MS-e su APC, a pre svega dendritske ćelije (DC) koje aktiviraju naivne pomoćničke T ćelije (*engl.* T Helper cells – Th) specifične za antigene CNS-a. Ove ćelije se diferenciraju u Th1 ćelije koje proizvode interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i Th17 koje proizvode IL-17 (Petermann i Korn, 2011). Th1 i Th17 ćelije odlaze u CNS gde se reaktiviraju nakon prepoznavanja antigena na rezidentnim APC, čime je omogućena produkcija različitih inflamacijskih medijatora koji privlače dodatne imunske ćelije u CNS. Ovo dovodi do inflamacije koja je glavni razlog oštećenja tkiva CNS-a. Pored CD4<sup>+</sup> T-ćelija i CD8<sup>+</sup> T-ćelija i B-ćelija imaju značajnu ulogu u patogenezi EAE-a i MS-e (Fletcher *i sar.*, 2010; Goverman *i sar.*, 2005; Wekerle, 2017).

DC su heterogena grupa profesionalnih APC koje imaju ulogu u indukciji imunskog odgovora (Banchereau *i sar.*, 2000). Različiti podtipovi DC su raspoređeni svuda po telu, imaju ulogu stražara u perifernim tkivima ili limfoidnim organima gde se susreću sa potencijalnim antigenima. Kada dođe do infekcije organizma od strane nekog patogena, tkivne-rezidentne nezrele DC (*engl.* immature Dendritic Cells (DC) - iDC) fagocituju mikroorganizam (Mellman i Steinman, 2001) i taj događaj predstavlja okidač za njihovo sazrevanje. Proces sazrevanja DC se sastoji od fenotipskih i funkcionalnih modifikacija koje uključuju ekspresiju kompleksa molekula MHC i peptida, povećanu ekspresiju kostimulatornih molekula (CD40, CD80, CD86, CD40L ili inudcibilnog kostimulatornog liganda (ICOSL)), zajedno sa sekrecijom citokina (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10 i IL-12) (Banchereau *i sar.*, 2000; Mellman i Steinman, 2001). Ovaj proces sazrevanja je *in vivo* praćen i promenama u ekspresiji molekula zaduženih za migraciju ćelija, kao što je povećanje ekspresije CCR7 hemokinskog receptora koji omogućava migraciju DC u regionalni limfni čvor (Scandella *i sar.*, 2002). Na taj način, zrele DC (*engl.* mature DC - mDC) prezentuju peptide u sklopu MHC II molekula naivnim CD4<sup>+</sup> T-limfocitima koji prepoznaju kompleks

MHC II peptid pomoću svog T-ćelijskog receptora (*engl.* T cell receptor - TCR) (Banchereau *i sar.*, 2000); Banchereau i Steinman, 1998). Nakon ovog procesa koji je praćen dodatnim interakcijama posredovanim kostimulatornim molekulima, naivni T-limfociti postaju efektorski sa različitim pomoćničkim ili citotoksičnim aktivnostima. Iako i ostale APC (makrofagi i B limfociti) imaju sposobnost prezentacije antigena u sklopu molekula MHC II, DC su jedini tip ćelija koji mogu da aktiviraju naivne T-limfocite i indukuju antigen-specifični imunski odgovor u svim imunskim ćelijama stečenog imuniteta (Wilson *i sar.*, 2004).

DC nisu bitne samo za indukciju imunskog odgovora posredstvom T-limfocita već učestvuju u indukciji i održavanju periferne tolerance. U stanju mirovanja, DC mogu da prezentuju sopstvene antigene i da utišaju aktivnost T-ćelija (Steinman i Nussenzweig, 2002). Ove tolerogene DC (tolDC) koje su nastale prirodnim putem takođe održavaju i tolerancu na komensalne mikroorganizme u perifernim tkivima, antigene poreklom iz hrane i vazduha itd. TolDC ispoljavaju nezreli ili polu-zreli fenotip koga karakteriše niska ekspresija MHC II molekula i kostimulatornih molekula kao što su CD80 i CD86. Kod zdravih pojedinaca, održavanje autotolerance je osigurano konstantnim prilivom kratko živućih DC koje prezentuju sopstvene antigene u limfnom tkivu. To ukazuje da je indukcija tolerance visoko zavisna od aktivacionog stanja DC kao i od kombinacije citokina u okruženju i faktora rasta (Domogalla *i sar.*, 2017).

TolDC imaju više različitih mehanizama pomoću kojih indukuju toleranciju. Jedan od njih je indukcija anergije T-ćelija. Usled prezentacije niskog nivoa antigena bez kostimulacije, T-ćelije stupaju u anergiju (Steinbrink *i sar.*, 2002) i indukuje se diferencijacija regulatornih T-limfocita (Treg) (Kretschmer *i sar.*, 2005; Apostolou i von Boehmer, 2004; Hermann-Kleiter i Baier, 2010). Zatim, sekrecija antiinflamacijskih citokina kao što su IL-10 i TGFβ, kao i smanjenje sekrecije proinflamacijskih citokina od strane DC značajno doprinose indukciji tolerancije (Wakkach *i sar.*, 2003; Akbari *i sar.*, 2001; Hsu *i sar.*, 2015). TolDC mogu da eksprimiraju i različite inhibitorne receptore kao što je ligand programirane ćelijske smrti (*engl.* Programmed cell death ligand – PDL-1 i PDL-2) (Keir *i sar.*, 2007; Nguyen i Ohashi, 2015), inhibitorni Ig transkripti (*engl.* Immunoglobulin-Like Transcripts-ITL) (Wu i Horuzsko, 2009; Brown *i sar.*, 2004) i protein vezan za citotoksične T-limfocite-4 (*engl.* Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein-4 – CTLA4) (Laurent *i sar.*, 2010). Putem ovih receptora DC deluju na T-limfocite smanjujući njihovu funkcionalnost.

Dalje, to DĆ odlikuju specifične promene u metabolizmu koje podrazumevaju ekspresiju nuklearnog faktora povezanog sa eritrocitima 2 (*engl.* The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 -Nrf2) koji predstavlja ključni regulatorni protein transkripcije u antioksidativnim i zaštitnim signalim putevima (Wei *i sar.*, 2018). Nrf2 se translocira u nukleus u stanju ćelijskog stresa i vezuje za antioksidativne elemente odgovora (*engl.* Antioxidant response elements - ARE) čime se pokreće ekspresija ciljnih gena kao što su HO-1 (hem oksigenaza) i NQO1 (*engl.* NADPH-quinone oxidoreductase 1) (Nguyen *i sar.*, 2009). Aktivacija Nrf2 se dešava u odgovor na porast unutarćelijskog ROS-a nakon čega dolazi do aktivacije puteva koji kontrolišu ekspresiju kostimulatornih molekula DĆ (Aw Yeang *i sar.*, 2012; Wei *i sar.*, 2018). HO-1 inhibira sintezu hemoglobina i na taj način dolazi do produkcije ugljen monoksida i slabljenja aktivnosti DĆ što je jedan od mehanizama kako DĆ inhibiraju funkcije T-ćelija modulacijom metaboličkih parametara (Chora *i sar.*, 2007; Maldonado i von Andrian, 2010).

### 1.3.2. Druge imunske ćelije

Iako se pretežno ističe uloga CD4<sup>+</sup> T-ćelija, CD8<sup>+</sup> T-ćelije su takođe važne efektorske ćelije u patogenezi MS-e (Saxena *i sar.*, 2011). Broj CD8<sup>+</sup> T-ćelija je veći nego CD4<sup>+</sup> T-ćelija u zapaljenskim plakama. Takođe, i CD8<sup>+</sup> T-ćelije pokazuju oligoklonsku ekspanziju u plakama i u krvi, što ukazuje na njihovu patogenetsku ulogu u MS-i (Höftberger *i sar.*, 2004). Potom, studije na životinjskim modelima ukazuju na kompleksnu funkciju B ćelija u MS-i, gde ove ćelije pored produkcije antitela učestvuju i u stimulaciji T-ćelija putem prezentacije antigena (McLaughlin i Wucherpfennig, 2008). Zatim, makrofagi produkcijom proinflamacijskih medijatora i efektorskih molekula značajno doprinose inflamaciji u MS-i i sledstvenom oštećenju mijelina i neurona u MS-i (Bogie *i sar.*, 2014). Konačno, i druge ćelije urođene imunosti, kao što su neutrofil, mastociti i limfociti urođene imunosti imaju svoju ulogu u patogenezi MS-e (Brown i Weinberg, 2018; Woodberry *i sar.*, 2018).

### 1.3.3. Čelije centralnog nervnog sistema

CNS pacijenata obolelih od MS-e i CNS životinja kojima je indukovano EAE, karakteriše aktivacija rezidentne mikroglije kao i infiltracija makrofaga poreklom iz monocita (Lucchinetti *i sar.*, 2000; Ajami *i sar.*, 2011; Ponomarev *i sar.*, 2005). Makrofagi i mikroglija ispoljavaju svoja neuroprotektivna i antiinflamacijska svojstva kako u zdravom, tako i u oštećenom CNS-u (Miron *i sar.*, 2013; Shechter *i sar.*, 2013). Međutim, oni takođe doprinose neuroinflamaciji i dovode do sekundarnih neurodegenerativnih događaja (Ajami *i sar.*, 2011; Polfliet *i sar.*, 2002; Ponomarev *i sar.*, 2005). U odnosu na aktivaciono stanje, menja se i morfologija ćelija mikroglije. U stanju mirovanja ove ćelije imaju malo i okruglo telo sa kog polaze brojni tanki razgranati nastavci. Nakon oštećenja tkiva ili inflamacije, morfologija mikroglije se menja ka ameboidnom obliku i povlače se njeni nastavci (Goldmann i Prinz, 2013). Makrofagi i mikroglija u različitim fazama bolesti mogu da imaju različite uloge (Bhasin *i sar.*, 2007). Upotreba inhibitora makrofaga u cilju suprimiranja aktivacije makrofaga/mikroglije neposredno pre indukcije EAE-a, ispoljava slab efekat na tok EAE-a, dok njegova upotreba na početku bolesti značajno smanjuje simptome EAE-a (Bhasin *i sar.*, 2007). Snažna veza je takođe pokazana između infiltracije makrofaga i progresije paralize u EAE-u, što govori o bitnoj ulozi makrofaga/mikroglije u kasnijim stadijumima bolesti (Ajami *i sar.*, 2011).

Astrociti ispoljavaju razne funkcije u homeostazi CNS-a, kao što su održavanje krvno-moždane barijere i modulacija veza među neuronima (Duffy *i sar.*, 2014). Krvno-moždana barijera stvara jedinstvenu imuno privilegovanu okolinu u CNS-u i štiti ga od nepotrebne infiltracije imunskih ćelija (Lucin i Wyss-Coray, 2009). Astrociti su ključne ćelije u regrutovanju leukocita tokom inflamacije CNS-a izazvane autoimunskim odgovorom i samim tim su bitni za razvoj EAE-a (Kang *i sar.*, 2010). Tokom bolesti je upadljiva akumulacija glijskog fibrilarnog kiselog proteina (*engl.* Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP) u kičmenoj moždini (Voskuhl *i sar.*, 2009). Astrociti učestvuju u čišćenju od mrtvih ćelija i ćelijskog otpada (Tasdemir-Yilmaz i Freeman, 2014; Chung *i sar.*, 2013), popravci krvno-moždane barijere, zarastanju ožiljaka od lezija nakon infekcije ili oštećenja tkiva (Bush *i sar.*, 1999; Anderson *i sar.*, 2016). Inhibiranjem aktivacije astrocita u EAE-u smanjuje se infiltracija imunskih ćelija (pretežno makrofaga) i posledično dolazi do smanjenja jačine simptoma

bolesti (Toft-Hansen *i sar.*, 2011). Heterogenost astrocita je mnogo kompleksnija nego što se prvobitno mislilo i ne postoji konsenzus oko njihove kategorizacije. Međutim, klasična klasifikacija astrocita Ramona i Kahala (1909) na protoplazmatične i fibrozne koja je zasnovana na morfologiji, lokaciji i funkciji je još uvek validna i korisna. Protoplazmatični astrociti su lokalizovani u sivoj masi i obavijaju sinapse i krvne sudove. Fibrozni astrociti su lokalizovani u beloj masi i u kontaktu su sa Ranvijerovim čvorovima i krvnim sudovima (Barres, 2008; Sofroniew and Vinters, 2010). Takođe, astrociti mogu različito da odgovore na povrede nastale u CNS-u i prema tome se dele na neaktivne, aktivne i reaktivne. Neaktivni se nalaze u tkivu u stanju mirovanja, karakteriše ih malo ćelijsko telo sa kraćim nastavcima. Nakon povrede ili infekcije astrociti se aktiviraju različitim mehanizmima i kao rezultat nastaje blaga astrogliozna, što podrazumeva njihovu hipertrofiju, uočljivu razgranatost i povećani rast nastavaka koji se međusobno preklapaju (Anderson *i sar.*, 2014). Reaktivni astrociti se nalaze blizu mesta povrede i odgovorni su za formiranje ožiljačnog tkiva (Nash *i sar.*, 2011). Kako u MS-i, tako i u EAE-u reaktivacija astrocita otpočinje u ranom stadijumu formiranja lezija, pre pojave prvih kliničkih simptoma bolesti i opstaje kako bolest napreduje u hroničnu formu. Iz toga proizilazi da je reaktivacija astrocita jedan od inicijalnih događaja u patogenezi MS-e i EAE-a (Brambilla, 2019).

## **1.4. TERAPIJA MULTIPLE SKLEROZE**

### **1.4.1. Konvencionalna terapija**

Do kraja 20. veka terapija MS-e je podrazumevala uglavnom kortikosteroide i imunosupresore širokog spektra. Međutim, kako je neophodna njihova primena tokom celog života, javljaju se brojni neželjeni i toksični efekti. Jedan od glavnih je povećana osetljivost na sve tipove infekcije usled generalne i nespecifične supresije imunskog odgovora. Zatim, toksični efekti se manifestuju oštećenjem jetre i bubrega usled visokih i konstantnih doza lekova. Zabeležene su čak i maligne transformacije ćelija uzrokovane dugom primenom imunosupresiva (Domogalla *i sar.*, 2017; Miller *i sar.*, 2000). Prvi lek za lečenje RRMS-e, kao modifikator bolesti, odobren od strane Američke administracije za hranu i lekove (*engl.* American Food and Drug Administration - FDA), bio je IFN $\beta$ -1, Rebif® (IFN- $\beta$ 1a), Betaseron® (IFN- $\beta$ 1b), Extavia® (IFN- $\beta$ 1b) i Avonex® (IFN- $\beta$ 1a, smanjenje Th17 ćelija) (Taskapilioglu, 2018; Kappos *i sar.*, 2006; Kochi *sar.*, 2007). Potom, sledeći je bio kopakson

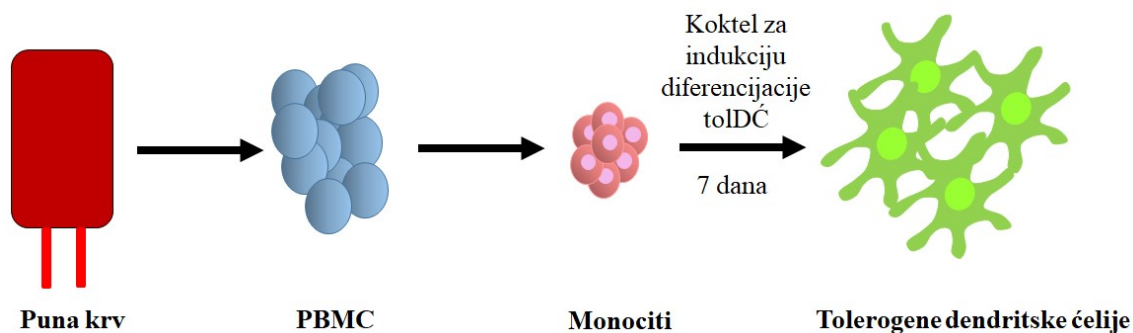
Copaxone® (glatiramer acetat). Ovi lekovi se primenjuju nedeljno, intramuskularno ili subkutano. Iako su i dalje u upotrebi, primećena su različita neželjena dejstva kod pacijenata (Taskapilioglu, 2018). Veliki napredak u terapiji MS-e nastao je uvođenjem lekova koji se primenjuju oralno (Gilenya® (fingolimod, modulacija preko receptora sfingozina) (Choi *i sar.*, 2011), Aubagio® (terifunomid, inhibicija aktivacije B-ćelija i T-ćelija) (Palmer, 2010), Plegridy® (pegIFN-β1a) (Hoy, 2015), Tecfidera® (dimetilfumarat, kombinacija imunosupresivne i imunomodulatorne aktivnosti) (Albrecht *i sar.*, 2012), Ampyra® (dalfampridin, inhibicija kalijumovih kanala) (Pikoulas i Fuller, 2012)). Takođe, odobreni su i novi lekovi koji se primenjuju subkutano u vremenskim razmacima od po nekoliko meseci ili i ređe (Tysabri® (natalizumab, inhibicija migracije limfocita) (Rice *i sar.*, 2005), Lemtrada® (alemtuzumab, deplecija Th17 limfocita) (Cohen *et al.*, 2012) i Zinbryta® (dakilzumab, blokada receptora za IL-2) (Bielekova, 2018)). Ovi lekovi ostvaruju manje neželjenih efekata nego lekovi starije generacije (Huang, 2015). Do danas, broj odobrenih lekova za terapiju RRMS-e se popeo na 17, dok postoje samo tri za tretman sekundarno progresivne forme i jedan za tretman primarno progresivne (Ginestal-López, 2018). Kod svih ovih lekova postoji problem prevencije dugoročnih štetnih efekata (Dargahi *i sar.*, 2017) kao i razvijanje sekundarnih autoimunskih bolesti (Wraith, 2017). Osim toga, ovi lekovi dovode do modifikovanja toka bolesti, ali ne i do izlečenja. Iz tog razloga potrebno je uvođenje novih terapija u lečenju MS-e.

#### 1.4.2. Ćelijska imunoterapija

Imunoterapija se primenjuje za one bolesti u kojima je potrebno modifikovati funkcije imunskog sistema. Ona može biti stimulatorna, npr., za tretman kancera ili supresorska, npr., za tretman autoimunskih bolesti, atopijskih bolesti i prevenciju odbacivanja presađenog kalema. Imunoterapije dizajnirane tako da modulišu imunski odgovor se nazivaju aktivne imunoterapije, dok se one kod kojih se primenjuju produkti imunskog sistema, kao što su antitela, nazivaju pasivne (Wraith, 2017). Primer imunoterapije koje se koriste u lečenju kancera predstavlja primena inhibitora kontrolnih mesta (*engl.* Check point inhibitors), kao što je receptor programirane ćelijske smrti i njegov ligand (*engl.* Programmed cell Death 1 receptor - PD-1; Programmed Death-Ligand 1-PD-L1). Na taj način dolazi do utišavanja jednog od glavnih mehanizama kojim tumorske ćelije zaobilaze T-ćelije i pospešuje se

antitumorski imunski odgovor (Gong et al., 2018). O značaju imunoterapije kao efikasnog pristupa u lečenju bolesti govori i podatak da je Nobelova nagrada za medicinu za 2018. godinu dodeljena naučnicima koji su otkrili mehanizme inhibitora kontrolnih mesta i doveli do imunoterapije kancera zasnovanoj na njihovoj primeni. Ipak, treba naglasiti da uspešnost imunoterapije zavisi od tipa bolesti i njene pridružene patologije (Wraith, 2017).

Ćelijska imunoterapija je obećavajući pristup u tretmanu MS-e. Ćelije koje se ispituju za primenu u imunoterapiji MS-e uključuju tolerogene dendritske ćelije (Flórez-Grau *i sar.*, 2018), T-limfocite (O'Brien *i sar.*, 2010) i B-limfocite (Greenfield i Hauser, 2018). Kao što je prethodno spomenuto, DC imaju važnu ulogu kako u inicijaciji imunskog odgovora tako i u održavanju imunske tolerance (Flórez-Grau *i sar.*, 2018). Nakon uočavanja tolerogene uloge DC, mnoge laboratorije su krenule da *in vitro* diferenciraju tolDC u velikom broju ne bi li iskoristili njihov potencijal za lečenje različitih autoimunskih bolesti (Saei i Hadjati, 2013). Razna biološka i farmakološka jedinjenja se koriste u pokušaju indukcije tolDC *in vitro* (Harry *i sar.*, 2010), kao što su: imunosupresivni lekovi (deksametazon, rapamicin, mikofenolatska kiselina, ciklosporin A), antiinflamacijski medijatori (TNF, GM-CSF u niskim dozama, prostaglandin E-2 (PGE2), IL-10, apoptotska tela), razna hemijska jedinjenja (1,25 dihidroksi vitamin D3, aspirin, ligand aril hidrokarbonatnog receptora) (Saei i Hadjati, 2013). 1,25 dihidroksi vitamin D3 je jedan od najčešće korišćenih jedinjenja za indukciju tolDC. Ovaj vitamin učestvuje u regulaciji maturacije DC (Ferreira *i sar.*, 2013) inhibirajući njihovu diferencijaciju i maturaciju, što sledstveno dovodi do slabljenja T-ćelija specifičnih za antigen, kao i povećanja broja Treg i produkcije IL-10 od strane ovih ćelija (Barragan *i sar.*, 2015). Terapeutska efikasnost *ex vivo* generisanih tolDC je potvrđena u nekoliko životinjskih modela autoimunskih bolesti, kao što su reumatoidni artritis (Popov *i sar.*, 2006; van Duivenvoorde *i sar.*, 2007; Ahmed i Bae, 2016), dijabetes tip I (Phillips *i sar.*, 2008; Tai *i sar.*, 2011) i EAE (Chorny *i sar.*, 2005).



**Slika 1. Proces nastajanja tolDC.** Od periferne krvi izoluju se mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl.* Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) i magnetnom separacijom ili sortiranjem prečiste do monocita. Od njih, nakon 7 dana pod uticajem koktela za pravljenje tolDC koji se sastoji od faktora stimulacije rasta granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), stimulusa za sazrevanje i nekog tolerogenog jedinjenja, nastanu tolDC.

Postoji nekoliko potencijalnih problema primene ćelijske imunoterapije za lečenje autoimunskih bolesti. Jedan od njih je diferencijacija velikog broja tolDC. Potrebna je optimizacija protokola za izolaciju DC, njihovo kultivisanje i usmeravanje ka tolDC, sa stabilnim fenotipom i funkcijama, kao i bolja identifikacija markera DC diferenciranih iz monocita ljudi (MoDC). Očuvanje stabilnosti tolDC nakon primene u pacijente je jedan veliki izazov kome se mora posvetiti dosta pažnje u budućnosti jer inflamacijska sredina u kojoj se one nađu nakon ulaska u organizam može doprineti promeni njihovog fenotipa i funkcije u imunogene DC (Obregon *i sar.*, 2017). Iz tog razloga stabilnost tolDC predviđenih za kliničku upotrebu se mora rigorozno testirati pre njihove primene kod ljudi. Na primer, stimulus za sazrevanje DC (LPS) koji se redovno koristi u životinjskim modelima ne bi smeo da se primeni na čovečijim DC, jer je toksičan. Rešenje se pronašlo u koktelu molekula za stimulaciju (TNF, IL-1 $\beta$  i prostaglandina E2-PGE2) koji na bezbedan način dovodi do sazrevanja DC. Uprkos izazovima sa kojima se suočava translacija imunoterapije sa životinjskih modela na klinička ispitivanja, noviteti kao što su razvoj zatvorenog sistema za uzgajanje ćelijskih kultura i reagensi koji su u skladu sa dobrom proizvođačkom praksom (*engl.* Good Manufacutre Production - GMP) protokolima su u velikoj meri doprineli napretku pravljenja tolDC za kliničke svrhe (Raïch-Regué *i sar.*, 2014). Zatim, vreme i doza primene tolDC u pacijente je sledeća nepoznanica koju treba detaljno ispitati.

Sa druge strane, već četiri kliničke studije su završile fazu I ispitivanja bezbednosti i izvodljivosti primene tolDC u imunoterapiji autoimunskih bolesti (Benham *i sar.*, 2015; Hilkens i Isaacs, 2013; (Giannoukakis *i sar.*, 2011; Bell *i sar.*, 2017; Jauregui-Amezaga *i sar.*, 2015). Pokazano je da je terapija tolDC-ama bezbedna i dobro podnošljiva. Nikakvi neželjeni efekti nisu primećeni kod pacijenata tretiranih tolDC-ama. Ovi rezultati su otvorili razne mogućnosti za dalje ispitivanje efikasnosti primene ovih ćelija u autoimunskim bolestima. Konkretno za MS, za sada se vode tri kliničke studije koje su u fazi I za procenu bezbednosti i podnošljivosti tolDC izloženih peptidima iz mijelina, a koje se primenjuju intradermalno, intranodalno ili intravenski (NCT02618902, NCT02903537 i NCT02283671)



(Willekens i Cools, 2018). Iz svega navedenog, imunoterapija tolDC<sup>+</sup>-ama predstavlja obećavajući novi pristup lečenja autoimunskih bolesti.

## 1.5. ETIL-PIRUVAT

Etil-piruvat (EP) je stabilan lipofilni estar pirogroždane kiseline (Sims *i sar.*, 2001) koji se pokazao kao efikasno antioksidativno i antiinflamacijsko jedinjenje (Fink, 2003; Riedemann *i sar.*, 2003). Antiinflamacijske i neuroprotektivne osobine EP-a su utvrđene u raznim životinjskim modelima, uključujući model sepse, uveitisa, astme (Fink, 2007; Kalariya *i sar.*, 2011), ishemije/reperfuzije (Kim *i sar.*, 2005), intracerebralnog krvarenja i teških trauma mozga (Su *i sar.*, 2013), a odnedavno i u EAE-u (Miljković *i sar.*, 2015).

Jedan od ključnih proinflamacijskih regulatornih proteina transkripcije na koje deluje EP je nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Yang *i sar.*, 2002; Yang *i sar.*, 2004; Kao i Fink, 2010). NF- $\kappa$ B se nalazi u neaktivnom obliku u citoplazmi mirujućih ćelija kao posledica veze koju uspostavlja sa inhibitornim proteinom I $\kappa$ B. Proinflamacijski citokini ili bakterijski produkti dovode do aktivacije I $\kappa$ B kinaze koja fosforiliše I $\kappa$ B što vodi ubikvitinaciji i posledičnoj degradaciji ovog inhibicijskog proteina. Ovo omogućava da NF- $\kappa$ B uđe u jedro, gde utiče na transkripciju odgovarajućih gena. EP ima sposobnost da kovalentno modifikuje subjedinicu p65 NF- $\kappa$ B i tako inhibira njegovo dejstvo (Kao i Fink, 2010). EP može delovati na NF- $\kappa$ B i putem inhibicije sekrecije grupe proteina visoke mobilnosti 1 (*engl.* High-mobility group box 1 - HMGB1). Inhibicija HMGB1 sprečava njegovo vezivanje za RAGE receptor (*engl.* Receptor for advanced glycation endproducts) i sledstveno aktiviranje NF- $\kappa$ B. Inhibicijom NF- $\kappa$ B, EP smanjuje LPS-om indukovanu produkciju NO i ekspresiju inducibilne sintaze azot monoksida (*engl.* Inducible NO synthase - iNOS) u makrofagima (Yang *i sar.*, 2012). Takođe, deplecijom glutationa EP može da ometa delovanje NF- $\kappa$ B na DNK (Song *i sar.*, 2004).

Jedan od mehanizama pomoću kojih EP ostvaruje svoju antioksidativnu i antiinflamacijsku ulogu je već pomenuta inhibicija HMGB1. Ovaj protein je široko eksprimiran i ima mnogobrojne uloge u različitim fiziološkim i patološkim procesima (Kang *i sar.*, 2014). U svim ćelijama HMGB1 može da se premešta između nukleusa i citoplazme, dok se normalno HMGB1 akumulira u nukleusu gde se vezuje za hromatin (Isackson *i sar.*, 1980). Nuklearna forma ovog proteina je angažovana u mnogim aktivnostima koji se odnose

na DNK kao što su replikacija, popravka oštećenja, rekombinacija, transkripcija i održavanje stabilnosti genoma. Vanćeljska forma HMGB1 funkcioniše kao adjuvans koji pokreće snažan imunski odgovor i tako aktivira T-ćelije, DĆ i endotelske ćelije. Aktivirane imunske ćelije i endotelske ćelije takođe sekretuju HMGB1 koji pozitivnom povratnom spregom izaziva oslobađanje dodatnih citokina i hemokina. Na taj način HMGB1 održava dugotrajno inflamacijsko stanje tokom oksidativnog ćelijskog stresa (Tang *i sar.*, 2012).

Do sada su pozitivna dejstva EP-a uočena u modelima hipoksije, ishemije, intracerebralnog krvarenja i povrede CNS-a. Naime, pokazano je da u ovim modelima EP značajno smanjuje gubitak oligodendrocita, neurodegeneraciju i hipomijelinizaciju, aktivaciju astrocita i mikroglije, kao i produkciju proinflamacijskih citokina (Wang *i sar.*, 2013a; Wang *i sar.*, 2013b; Su *i sar.*, 2013b; Yuan *i sar.*, 2012).

Na osnovu svega navedenog o antiinflamacijskim i neuroprotektivnim dejstvima EP-a u dosada ispitivanim modelima, korisno bi bilo utvrditi da li slične efekte ispoljava i u modelu EAE-a. Naime, EP predstavlja redoks analog dimetil-fumarata (Miljković *i sar.*, 2015), prethodno spomenutog leka za tretman RRMS-e (Albrecht et al., 2012), iz čega proizilazi interes za detaljnije ispitivanje njegovih efekata u EAE-u. Sa druge strane, imajući u vidu potrebu za specifičnijim i bezbednijim terapijama u lečenju autoimunskih bolesti, kao što je imunoterapija tolDĆ-ma, neophodno je konstantno ispitivati i proširivati saznanja o mogućim tolerogenim jedinjenjima, te je iz tog razloga interesantno proširiti i istraživanje o EP-u kao mogućem tolerogenom jedinjenju.

## **2. Ciljevi**

Na osnovu dosadašnjih podataka o antiinflamacijskim, antioksidativnim i neuroprotektivnim dejstvima EP-a, postavljena je hipoteza ove doktorske disertacije da EP ostvaruje antiencefalitogeno dejstvo u EAE-u, kao i da moduliše fenotipske i funkcijske karakteristike makrofaga i DC *in vitro* i *in vivo*. U skladu sa navedenim, postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Da se ispita *in vivo* uticaj tretmana EP-om na tok EAE-a kod DA pacova i ćelije u CNS-u koje su značajne za patogenezu ove bolesti:

- Praćenjem kliničkih simptoma EAE-a
- Određivanjem broja infiltrata u kičmenoj moždini i broja inflamacijskih ćelija u infiltratima, kao i produkcije IL-17 od strane ovih ćelija
- Određivanjem morfoloških karakteristika, veličine i broja reaktivnih makrofaga i ćelija mikroglije u kičmenoj moždini
- Utvrđivanjem reaktivnosti astrocita u kičmenoj moždini
- Procenjivanjem oštećenja aksona u u kičmenoj moždini
- Određivanjem ekspresije HMGB1 i iRNK za HMGB1 u kičmenoj moždini

2. Da se u *in vitro* uslovima ispita uticaj EP-a na makrofage diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži i makrofage poreklom iz peritoneuma neimunizovanih DA pacova:

- Određivanjem vijabiliteta makrofaga i produkcije citokina od strane makrofaga
- Fenotipskom karakterizacijom makrofaga

3. Da se u *in vitro* uslovima ispita uticaj EP-a na mišje DC diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži:

- Određivanjem vijabiliteta DC i produkcije citokina od strane DC-a
- Fenotipskom karakterizacijom DC-a
- Funkcijskom karakterizacijom DC-a određivanjem proliferacije i produkcije citokina u kulturi sa alogenim T-ćelijama
- Određivanjem ekspresije ciljnih molekula Nrf2 signalnog puta, kao što su HO-1 i NQO1 enzimi, u DC-ma
- Određivanjem ekspresije NF-κB transkripcionog faktora u DC-ma
- Analiziranjem migratorne sposobnosti DC *in vivo* ubrizgavanjem obeleženih ćelija u miševu

- Utvrđivanjem imunomodulacijskog uticaja DC-a na ćelije koje proizvode citokine u drenirajućem limfnom čvoru nakon imunizacije miševa CFA-om

4. Da se u *in vitro* uslovima ispita tolerogeni potencijal EP-a na MoDC diferencirane iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od MS-e, kao i da se efikasnost EP-a uporediti sa 1,25 dihidroksi vitaminom D3:

- Utvrđivanjem vijabiliteta MoDC
- Fenotipskom karakterizacijom MoDC
- Funkcijskom karakterizacijom MoDC određivanjem njihovog aloproliferativnog potencijala i produkcije citokina od strane alogenih PBMC

# **3. Materijal i metode**

### 3.1. REAGENSI I MEDIJUMI

#### 3.1.1. Reagensi i rastvori

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći reagensi i rastvori.

PBS (*engl.* Phosphate Buffered Saline rastvor) u vodi pravljjen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (LachNer, Neratovice, Češka), pH = 7,4); fiziološki rastvor (NaCl 0,9%, Hemofarm A.D. Beograd, Srbija).

Serum fetusa govečeta (*engl.* Fetal Calf Serum – FCS; PAA Laboratories, Pašing, Austrija) je inkubiran 30 min na 56°C kako bi se inaktivirale komponente komplemента; mišji serum; magareći serum (*engl.* Normal Donkey Serum – NDS; Santa Cruz Biotechnonology, Santa Kruz, SAD); goveđi albumin iz seruma (*engl.* Bovine Serum Albumine – BSA; Applichem, Barselona, Španija);

Pufer za magnetne kuglice koji se sastoji od 0,5% BSA (*engl.* Bovine Serum Albumin, frakcija V, Sigma Aldrich) i 2 mM EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina) PBS (Sigma Aldrich); Magnetne kuglice obeležene streptavidinom (ImagSAv kuglice, BD Biosciences, San Dijego, SAD);

Faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF; mišji dobavljen od Peprotech, Roki Hil, SAD; ljudski dobavljen od Peprotech, Frajburg, Nemačka);

Koktel citokina za sazrevanje ljudskih dendritskih ćelija koji se sastoji od 1000 U/ml TNF, 10 ng/ml IL-1β (oba dobavljena od Peprotech) i 1 μM PGE2 (Pfizer, Njujork, SAD);

Kuglice za određivanje broja ćelija (Perfect Count microspheres; Cytognos SL, Salamanka, Španija);

Kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's Adjuvant – CFA; Difco, Detroit, MI, USA); *M.tuberculosis* H37Ra (Difco);

Puferi za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija - Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience);

Koktel za stimulaciju ćelija koji sadrži i inhibitore transportnih proteina i sastoji se od forbol miristat acetata (*engl.* Phorbol Miristate Acetate - PMA), jonomicina, brefeldin A i monensina (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail).

Paraformaldehid (PFA); etanol; metanol; izopropil-alkohol; ksilol (svi dobavljeni od Zorka, Šabac, Srbija); hloroform (Sigma-Aldrich); parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska); DPX-a (Sigma-Aldrich); 3,3-diaminobenzidin (DAB; Dako, Glostrup, Danska); DAPI (Invitrogen); Triton X-100 (Sigma-Aldrich); moviol medijum (*engl.* Mowiol; Calbiochem, Millipore, Nemačka); lipopolisaharid (LPS, Sigma Aldrich); etil piruvat (EP; Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD); akutaza (*engl.* Accutase; Invitrogen); 1,25 dihidroksi vitamin D3 (Calcijex, Kern Pharma, Terasa, Španija); [<sup>3</sup>H] timidin (PerkinElmer, Voltam, SAD); karboksifluorescin sukcinimidil estar (*engl.* Carboxyfluorescein succinimidyl ester – CFSE; Invitrogen, Karlsbad, SAD); fikor (Lymphoprep, Axis Shield, Oslo, Norveška); perkol (Sigma-Aldrich); pufer za lizu eritrocita (eBioscience, San Dijego, SAD); kolagenaza tip V (Sigma-Aldrich); tripan plavo (BDSL, Velika Britanija); supstrat za peroksidazu 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB, eBioscience); hlorovodonična kiselina (HCl; Sigma Aldrich); Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); reagens za izolovanje RNK (TRIzol, Invitrogen); rastvor kristal violeta (*engl.* Crystal Violet -CV); sirćetna kiselina (CH<sub>3</sub>COOH, oba dobavljeni od Zorka, Šabac, Srbija);

### 3.1.2. Medijumi

RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute) sa 25 mM-HEPES i 2 mM-L glutaminom (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Izrael) sa dodatkom Pen/Strep koktela antibiotika (Biological Industries) i gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija);

Medijum za mišje dendritske ćelije pravljen od: RPMI-1640 (25 mM-HEPES i 2 mM-L glutaminom) sa dodatkom Pen/Strep koktela antibiotika i gentamicina i koji je dodatno suplementiran sa 1 mM natrijum piruvatom i 2 mM glutaminom (oba nabavljena od Sigma-Aldrich) i 20 % FCS;

Medijum za ljudske dendritske ćelije pravljen od: X-VIVO 15 (BioWhittaker®, Lonca, Belgija) koji je obogaćen sa 2% (vol/vol) AB ljudskim serumom koji je prethodno toplotno inaktiviran, zatim sa 2 mM L-glutaminom, 100 UI/ml penicilina (Cepa S.L, Madrid, Španija) i 100 µg/ml streptomocina (Laboratorios Normon S.A, Madrid, Španija);



### **3.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE**

Za izradu ove doktorske disertacije korišćene su ženke starosti 2-3 meseca sledećih visokosrodnih sojeva: pacova Dark Aguti (DA), i miševa C57BL/6 i BALB/c starosti 2-3 meseca. Sve životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti u kojima su korišćene eksperimentalne životinje, njihove ćelije ili organi su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (br.01-09/16, br. 02-09-16 i br. 03-01-17), u skladu sa direktivom 2010/63/EU.

### **3.3. METODE IZOLOVANJA ĆELIJA**

#### **3.3.1. Izolacija ćelija limfnih čvorova iz miša**

Iz miševa soja BALB/c su izolovani cervikalni, ingvinalni i mezenterični limfni čvorovi. Posle izolacije, svi limfni čvorovi su mehanički homogenizovani u rastvoru PBS 3 % FCS protiskivanjem kroz sterilnu najlonsku filter mrežicu promera 70  $\mu\text{m}$ . Nakon toga su ćelije filtrirane kroz sterilnu najlonsku filter mrežicu promera 40  $\mu\text{m}$ . Izolovane ćelije su centrifugirane na 500 g 5 min, zatim resuspendovane u PBS 3% FCS i prebrojane. Ćelije dobijene iz limfnih čvorova su dalje korišćene za prečišćavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita magnetnom separacijom.

#### **3.3.2. Prečišćavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita iz miševa magnetnom separacijom**

Za alogenu kokultivaciju korišćene su dendritske ćelije propagirane iz C57BL/6 miševa i CD4<sup>+</sup> T-limfociti prečišćeni iz limfnih čvorova BALB/c miševa. Nakon izolovanja cervikalnih limfnih čvorova i njihove mehaničke obrade, dobijene su ćelije koje su resuspendovane u 800  $\mu\text{l}$  hladnog pufera za obeležavanje ćelija antitelima (PBS 3% FCS) i dodavano im je 10  $\mu\text{l}$  anti-CD4 antitela obeleženog biotinom (eBioscience, San Dijego, SAD). Ćelije su inkubirane 1h na ledu uz povremeno mućkanje, a zatim oprane dva puta sa 1 ml PBS i jednom sa 1 ml hladnog pufera za magnetne kuglice u kom su i finalno resuspendovane u zapremini od 800  $\mu\text{l}$ . U ovu ćelijsku suspenziju je dodavano 40  $\mu\text{l}$  magnetnih kuglica

obeležanih streptavidinom i suspenzija je ostavljena 1h na +4°C uz povremeno mućkanje. Nakon toga, ćelije su izlagane magnetnom polju (BD Biosciences Imagnet Cell Separation Magnet) u trajanju od 8 minuta. Magnetne kuglice su se pod uticajem magnetnog polja lepile za zidove epruvete povlaćeci sa sobom CD4<sup>+</sup> T-ćelije koje su bile vezane za magnetne kuglice interakcijom streptavidin-biotin. Rastvor iz epruveta je pažljivo odstranjivan dok se još uvek nalazio u magnetnom polju, a ćelije zalepljene za zidove epruvete su ponovo resuspendovane u 800 µl rastvora za vezivanje magnetnih kuglica. Postupak izlaganja magnetnom polju je ponavljan još 2 puta u trajanju od 4 min da bi se dobili visoko prečišćeni CD4<sup>+</sup> T-limfociti. Na kraju, ćelije su resuspendovane u RPMI 5% FCS i prebrojane. CD4<sup>+</sup> T-limfociti su dalje iskorišćeni za ko-kultivaciju sa DĆ. Procedura je rađena u plastičnim sterilnim epruvetama od 2 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka).

### 3.3.3. Izolacija makrofaga iz pacova

Ćelije peritonealnog ispirka su izolovane ubrizgavanjem po 10 ml sterilnog hladnog PBS u peritonealnu šupljinu pacova i sakupljanjem peritonealne tečnosti u sterilne epruvete. Peritonealni ispirak je centrifugiran na 500 g 5 min, ćelije su resuspendovane u RPMI 5 % FCS, brojane i postavljane u koncentraciji 2 x 10<sup>6</sup> ćelija po bunaru u ploču od 24 bunara. Sve ćelijske kulture su gajene u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5 % i na temperaturi od 37° C (u daljem tekstu inkubacija). Nakon 2h inkubacije, ćelije su ispirane PBS-om da bi se otklonile one koje se nisu zalepile. Dobijene ćelije peritonealnog ispirka su iskorišćene za dobijanje populacije peritonealnih makrofaga (PM). Ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i tretirane EP-om poslednja 24h kulture.

Makrofagi poreklom iz kostne srži (*engl.* Bone Marrow Derived Macrophages - BMDM) pacova su dobijeni izolovanjem femura, i ispiranjem ćelija kostne srži u petri šolju sa 10 ml RPMI 10% FCS. Svi rastvori i materijal koji su korišćeni bili su sterilni. Krvave trake su razbijene pipetiranjem. Isprane ćelije kostne srži su prebaćene u epruvetu od 50 ml i centrifugirane na 500 g 5 min. Nakon toga, talog je resuspendovan sa 1 ml pufera za lizu eritrocita i držan 5 min na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta sa 9 ml RPMI 10 % FCS i ćelije su profiltrirane kroz konusne najlonske mrežice promera 70 µm i centrifugirane na 500 g 5 min. Ćelije su postavljane u ploču sa 24 bunara u koncentraciji od 1 x 10<sup>6</sup> /1 ml gde su tokom 7 dana kultivisane u prisustvu 10 % supernatanata kultura L929 ćelija prethodno

gajenih u medijumu za kultivaciju ćelija (5% FCS). Ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i tretirane EP-om poslednja 24h kulture. Na kraju tog perioda su pokupljene adherirane ćelije koje predstavljaju populaciju makrofaga.

Čistoća makrofaga poreklom iz peritoneuma i makrofaga poreklom iz kostne srži je određena analizom na protočnoj citofluorimetriji, pri čemu je bilo < 5 % CD3<sup>+</sup> i CD45R<sup>+</sup> ćelija u prečišćenoj populaciji. Makrofagi su dalje korišćeni za analize vijabiliteta kristal violet metodom, produkciju citokina ELISA metodom i ekspresiju površinskih molekula metodom protočne citofluorimetrije.

#### **3.3.4. Dobijanje dendritskih ćelija iz matičnih ćelija kostne srži miševa**

U svrhu dobijanja DC iz matičnih ćelija kostne srži korišćeni su miševi C57BL/6 soja. Nakon vađenja femura, kost je sečena na oba kraja i ispirana sa 10 ml RPMI 10% FCS direktno u petru šolju. Svi rastvori i materijal koji su korišćeni su bili sterilni. Krvave trake su razbijane pipetiranjem. Isprane ćelije kostne srži su prebacivane u epruvetu od 50ml i centrifugirane na 500 g 5 min. Nakon toga, talog je resuspendovan sa 1 ml pufera za lizu eritrocita i držan 5 min na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta sa 9 ml RPMI 10 % FCS i ćelije su profiltrirane kroz konusne najlonske mrežice promera 70 µm i centrifugirane na 500 g 5 min. Talog ćelija je resuspendovan u medijumu za mišje DC. Nakon brojanja, ćelije (1x10<sup>6</sup> ćelija/ml) su postavljene u ploču sa 24 bunara (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka).

Propagacija ćelija kostne srži ka DC trajala je 8 dana u konstantnom prisustvu 20 ng/ml GM-CSF. Polovina medijuma je menjana na svaka dva dana tokom 6 dana, dakle 500 µl starog medijuma se odstranjivalo i dodavalo se 500 µl novog svežeg medijuma zajedno sa GM-CSF. Međutim, nakon 4 dana ćelije su bivale prenamnožene i morale su biti razdvojene, što je postignuto blagim pipetiranjem i prebacivanjem polovine (500 µl) u novi bunar dok se ostatak medijuma do 1 ml nadoknađivao svežim medijumom i odgovarajućom količinom GM-CSF. Za propagaciju DC ka zrelim dendritskim ćelijama (*engl.* Mature dendritic cells - mDC), 7. dana je dodavan stimulus za sazrevanje ćelija, 100 ng/ml LPS u trajanju od 24 h. U cilju propagacije ka tolerogenim dendritskim ćelijama tretiranim EP-om (tolEP-DC), 3. i 6. dana je dodavan EP u koncentraciji od 3,1 mM, dok se takođe 7. dana dodavao LPS. S druge strane, za dobijanje DC tretiranih EP-om tokom maturacije (matEP-DC) EP je dodavan 7. dana zajedno sa LPS. Suprotno, za nastajanje nezrelih DC (*engl.* Immature DC - iDC) bilo je

potrebno samo da rastu u prisustvu GM-CSF uz adekvatnu promenu medijuma, bez ikakvih tretmana i stimulusa za sazrevanje. Nakon završetka propagacije i diferencijacije ćelija, one su 8. dana odlepljivane iz ploče pomoću enzima akutaze, koji dovodi do odlepljivanja ćelija sa plastične podloge bez njihovog oštećenja. Za potrebe eksperimenata određivanja produkcije citokina metodom ELISA, pre odlepljivanja ćelija su skupljani njihovi supernatanti. Ćelije su dalje brojane i korišćene za analize fenotipa, funkcije i *in vivo* primene.

### **3.3.5. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi ljudi**

Mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl.* Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) su izolovane na gustinskom gradijentu fikola. U heparisanu epruvetu u kojoj se nalazila krv dodavan je PBS uz mešanje, potom je tako razblažena krv prenetu u epruvetu od 50 ml u kojoj se već nalazio fikol. Razblažena krv je sipana pažljivo, niz zid epruvete da ne bi došlo do mešanja faza a potom centrifugirana na 400 g 30 min. Po završetku centrifugiranja, PBMC su uočavane u vidu prstena ćelija koji naleže na fikol. Prsten je nežno skupljan i opran u PBS-u dva puta. Oprane ćelije su resuspendovane u PBS-u i brojane. Dobijene ćelije su zatim korišćene za prečišćavanje do monocita i dobijanje DĆ poreklom iz monocita ili za kultivaciju sa DĆ.

### **3.3.6. Dobijanje dendritskih ćelija iz monocita periferne krvi ljudi**

Za eksperimente koji se tiču dobijanja ljudskih DĆ iz monocita periferne krvi (*engl.* Monocyte derived Dendritic Cells- MoDĆ) korišćeni su uzorci prečišćenih i koncentrisanih leukocita (*engl.* Buffy coat - BC) dobrovoljnih davalaca krvi koji su nabavljeni u banci krvi Banc de Sang i Teixits (Barselona, Španija), prateći sve institucionalne standardne operativne procedure vezane za donaciju i obradu krvi. Uzorci krvi pacijenata obolelih od MS nabavljeni su iz Germans Trias i Pujol bolnice (Barselona, Španija). Etički komitet Germans Trias i Pujol bolnice je odobrio ovo istraživanje, svi pacijenti su informisani o studiji i dali svoj pristanak u skladu sa deklaracijom iz Helsinkija (BMJ 1991; 302: 1994). Svi uzorci MS pacijenata su nabavljeni od žena koje boluju od relapsno-remitentnog oblika MS i koje nisu bile pod uticajem bilo koje terapije namenjene tretmanu MS.

PBMC su izolovane kao što je već opisano. CD3<sup>+</sup> T-ćelije su odstranjene iz PBMC zdravih pojedinaca pomoću RossetSep™ (StemCell Technologies, Sijetl, SAD) ljudskog koktela za prečišćavanje, dok ćelije izolovane iz pacijenata nisu podvrgnute ovom koraku. Nakon toga, da bi se dobila frakcija monocita, urađena je pozitivna selekcija pomoću EasySep® (StemCell Technologies) ljudskog CD14 pozitivnog selekcionog kita. Za sve uzorke, čistoća monocita je bila preko 95 % a vijabilitet preko 90 %.

Dobijeni monociti su postavljeni u koncentraciji od  $1 \times 10^6/1$  ml u ploču sa 24 bunara u trajanju od 6 dana u medijumu za ljudske DC. Ćelije su kultivisane u konstantom prisustvu 1000 U/ml GM-CSF i 1000 U/ml IL-4 (PeproTech). Ćelijama je 4. dana medijum zamenjen svežim zajedno sa GM-CSF i IL-4. Da bi se indukovale mDC, tog istog dana su ćelije tretirane koktelom citokina za sazrevanje. Tolerogene DC nastale pod uticajem 1,25 dihidroksi vitamina D3 (vitDC) su tretirane 1,25 dihidroksi vitaminom D3 (1 nM) 0. i 4. dana. Za potrebe dobijanja tolEP-DC, ćelije su tretirane EP-om (3,1- 12,5 mM) 2. i 4. dana. Ove ćelije su takođe bile pod uticajem koktela za sazrevanje 4. dana, dok iDC nisu bile ni pod uticajem tretmana ni stimulusa za sazrevanje. Sve ćelije su 6. dana pokupljene, prebrojane i dalje korišćene u eksperimentima analize vijabiliteta, fenotipa i funkcija.

### 3.3.7. Određivanje vijabiliteta i broja ćelija

Određivanje broja ćelija iz eksperimenata u kojima su izolovane pacovske ćelije je vršeno pomoću boje tripan plavo i brojanjem živih ćelija pod mikroskopom. Ćelije su nakon izolovanja resuspendovane u PBS sa 0,1 % tripan plavog u odnosu 1:10, nanošene u Bürker-Türk komoru i brojane pod mikroskopom. Tripan plavo prodire u ćelije čija je membrana narušena i samim tim boji mrtve ćelije, dok su žive ćelije nebojene. Pod mikroskopom su brojane samo žive ćelije i broj ćelija je izračunat po formuli broj ćelija/broj polja x 2,5 i izražen kao broj ćelija u milionima/ml. Procenat živih ćelija je određen po formuli broj živih ćelija/ukupan broj ćelija x 100.

Određivanje vijabiliteta i broja ćelija iz eksperimenata u kojima su izolovane mišje ćelije je vršeno pretežno brojanjem tripan plavim pod mikroskopom, kao što je prethodno opisano, međutim u nekim eksperimentima je korišćen i automatski brojač za ćelije Luna-II™ (Logos Biosystems, Gyeonggi-do, Južna Koreja). Ćelije su nakon izolacije resuspendovane u

PBS sa 0,1 % tripan plavog u odnosu 1:1 i nanete u pločicu za brojanje (Luna™ Cell Counting Slides, Logos Biosystems, Inc, Južna Koreja) koja je potom ubačena u aparat Luna-II™. Aparat automatski izračunava broj živih ćelija, broj mrtvih ćelija, njihov vijabilitet, kao i veličinu.

Određivanje broja ljudskih ćelija je vršeno pomoću kuglica za određivanje broja ćelija na protočnoj citofluorimetriji. Nakon pranja ćelija u PBS-u, pomešano je 20 µl ćelijske suspenzije sa 20 µl kuglica za brojanje i dodato 100 µl PBS. Formula po kojoj je preračunat broj ćelija je:

$$\frac{\text{br.događaja} \times \text{br.kuglica}/\mu\text{l} (1013/\mu\text{l}) \times 1000 \mu\text{l}}{2000 \text{ kuglica}}$$

Vijabilitet ljudskih ćelija je određivan obeležavanjem ćelija Aneksin-om V i 7-aminonaktinomicinom D (7AAD; BD, Bioscience, San Dijego, SAD) i analiziran na protočnoj citofluorimetriji.

### **3.3.8. Određivanje vijabiliteta ćelija testom kristal violet**

Za određivanje broja živih, adherentnih ćelija korišćen je test kristal violet. Test je rađen u ploči u kojoj su ćelije gajene. Nakon odlivanja supernatanta u bunare je dodato po 300 µl 100% metanola kako bi se ćelije fiksirale za dno bunara. Nakon 10 min, metanol je odlivan, a ploča je ostavljena da se suši na sobnoj temperaturi. Zatim je u svaki bunar dodavano po 300 µl 0.1% rastvora kristal violeta i ostavljeno 10 min na sobnoj temperaturi. Ploča je dobro isprana u hladnoj vodi i sušena na sobnoj temperaturi. Posle sušenja u bunare je dodato po 300 µl 33% rastvora sirćetne kiseline. Iz svakog bunara je razliveno tri puta po 50 µl u mikrotitar ploču i apsorbancija rastvora merena je pomoću spektrofotometra (Titertek) na 540 nm. Izmerene apsorbance odgovarale su intenzitetu boje, pa samim tim i vijabilnosti ćelijskih kultura, odnosno relativnom broju živih, adherentnih ćelija u kulturama.

### **3.4. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS**

#### **3.4.1. Indukcija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa u pacova**

Za indukciju EAE-a u DA pacova korišćen je homogenat kičmene moždine pacova dobijen homogenizovanjem kičmene moždine u PBS-u (1 g kičmene moždine na 1ml PBS). Homogenat je pomešan identičnom zapreminom CFA-a koji je sadržao 5 mg/ml toplotom ubijenih i liofilizovanih bakterija *M.tuberculosis* H37 Ra. EAE je indukovao intradermalnom injekcijom 100 µl encefalitogene emulzije u zadnju šapicu pacova.

#### **3.4.2. Evaluacija kliničke slike**

Nakon imunizacije životinje su svakodnevno posmatrane radi praćenja pojave i razvoja kliničkih simptoma bolesti. Ocene su davane prema sledećoj skali: 0 - bez kliničkih simptoma; 1 - gubitak tonusa u repu, 2 - pareza zadnjih ekstremiteta, 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta, 4 - moribundno stanje ili 5 - smrt. Razlikovale su se sledeće faze EAE: početak bolesti, 8.-10. dan posle imunizacije (d.p.i.) (klinički skor 1); vrhunac bolesti, 12.-14. d.p.i. (klinički skor 2-4) i oporavak, 18-20 d.p.i. (klinički skor 1 ili manje). Ubrzo nakon oporavka, oko 21. d.p.i. dolazi do ponovnog pogoršanja (relapsa) bolesti. Kumulativni klinički skor (k.s.) je izračunavan kao suma dnevnih k.s. Trajanje bolesti označava broj dana tokom kojih su uočeni klinički simptomi kod svakog pacova. Srednji k.s. je izračunavan kao kumulativni k.s. podeljen sa trajanjem bolesti.

#### **3.4.3. Primena etil-piruvata pacovima *in vivo***

Pacovi su tretirani EP-om u koncentraciji od 300 mg/kg (rastvor u PBS) intraperitonealno jednom dnevno, od 8. do 12. d.p.i ili od 8. do 17. d.p.i. Kontrolni pacovi su primali PBS. Kontrolne životinje i pacovi tretirani EP-om su bili iz istog legla.

### **3.4.4. Izolacija ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu**

Infiltrati kičmene moždine izolovani su iz životinja imunizovanih homogenatom kičmene moždine (HKM) + CFA-om. Na piku bolesti životinje su žrtvovane i izvađene su im kičmene moždine. U cilju eliminisanja ćelija prisutnih u krvnim sudovima kičmene moždine, životinje su najpre perfundovane sterilnim fiziološkim rastvorom. Kičmene moždine su izolovane iz perfundovanih životinja i držane na ledu do narednog koraka. Kičmene moždine su homogenizovane u rastvoru PBS protiskivanjem kroz metalne mrežice. Dobijena ćelijska suspenzija je centrifugirana na 800 g 3 min, a talog je resuspendovan u 3 ml 30 % Perkola i nanošen na 2,5 ml 70 % Perkola pri čemu se formirao koncentracijski gradijent Perkola. Izotonične koncentracije Perkola su pripremane od koncentrisanog rastvora koji je pravljen mešanjem 9 zapremina Perkola i 1 zapremine 10 x koncentrovanog PBS. Nakon centrifugiranja u trajanju od 50 min na 870 g u plastičnim epruvetama mogao se uočiti beli prsten infiltriranih ćelija kičmenih moždina koji se nalazio na granici dva sloja. Interfazni prsten je pažljivo sakupljan i pran od ostataka Perkola u PBS. Ćelijska suspenzija je centrifugirana na 900 g 10 min, a ćelije resuspendovane u RPMI 5% FCS, brojane i dalje postavljane u ploču sa 24 bunara u koncentraciji  $2,5 \times 10^6$  ćelija/ml. Nakon 48h pokupljeni su ćelijski supernatanti i merena je produkcija citokina ELISA metodom.

### **3.4.5. Histološke analize**

#### **3.4.5.1. Izolacija kičmene moždine iz pacova i priprema tkiva za histologiju**

Pacovi su žrtvovani 12 d.p.i. u piku bolesti i vađena im je kičmena moždina. Odmah nakon toga isecan je lumbalni deo i potapan u hladan 4% PFA rastvoren u PBS-u. U cilju fiksacije, tkivo je u stajalo u 4% PFA-u 24h na +4°C. Sledećeg dana počinjala je dehidracija tkiva njegovim serijskim potapanjem u različite koncentracije alkohola. Uzorci su držani dva puta po 30 min u 30 % etanolu, zatim dva puta po 30 minuta u 50 % etanolu i na kraju su potapani u 70 % etanol. Nastavak pripreme tkiva za kalupljenje podrazumevao je njegovo potapanje dva puta po 1h u 96 % i 100 % etanol, a zatim 2 puta po 5 min u ksilol. Tkivo je potom kalupljeno u otopljenom parafinu i kalupi su čuvani na sobnoj temperaturi. Isečki transverzalnog lumbosakralnog dela (L1-L5) debljine 5  $\mu$ m su sečeni pomoću mikrotoma



RM2265 (Leica, Veclar, Nemačka) i ređani u nizu na mikroskopske pločice SuperFrost (ThermoScientific, Voltman, Minesota, SAD).

#### 3.4.5.2. Bojenje tkivnih preseka kičmene moždine hematoksilinom

Vršena je deparafinizacija tkivnih isečaka držanjem dva puta po pet minuta u ksilolu, da bi bili dostupni za bojenje. Nakon toga su preseci dehidratirani u rastvorima opadajuće koncentracije etanola (od 100 % preko 90 % do 70 %), i na kraju u destilovanoj vodi. Preseci su zatim izlagani bojenju hematoksilinom u trajanju od 10 min kako bi se obojila ćelijska jedra. Uzorci su sprovedeni sukcesivno kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70 %, 90 %, 100 %) i ksilola u trajanju od po pet minuta. Nakon ksilola, preseci kičmenih moždina su pokriveni pokrovnim staklom korišćenjem DPX-a. Preseci su posmatrani i fotografisani na mikroskopu Leica (Leica Microsystems GmbH), korišćenjem softvera ACDSee 6. Obojene ćelije su brojane iz četiri životinja po grupi. Broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu je izbrojan iz histoloških podataka dobijenih od 8 preseka po pacovu.

#### 3.4.5.3. Imunohistohemija

Nakon deparafinizacije i dehidratacije preseka kičmene moždine, sprovedeno je imunohistohemijsko bojenje. U cilju blokiranja endogene peroksidaze preseci su stavljeni 20 min u metanol sa 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da bi se blokirala nespecifična imunoreakcija antitela sa okolnim tkivom, na preseke je prvo nanošeno 10 % NDS razblaženog u PBS-u u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Za jednostruko peroksidazno bojenje korišćena su sledeća primarna antitela: anti-HMGB1 napravljeno u zecu (1:500; Abcam, Kembridž, SAD), anti-GFAP napravljeno u zecu (1:500; klon 73-240, NIH NeuroMab, Dejvis, SAD), anti-Iba1 napravljeno u kozi (1:200; *engl.* Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1; Abcam), anti-ED1 (CD68) napravljeno u mišu (1:200; Abcam) i anti-SMI-32 napravljeno u mišu (1:1000; *engl.* Anti-Neurofilament H Non Phosphorylated; Sigma-Aldrich). Preseci su stajali preko noći na +4°C u primarnom antitelu, da bi sutradan bili oprani PBS-om nekoliko puta i stavljeni u odgovarajuća sekundarna antitela obeležena peroksidazom rena (*engl.* horseradish peroxidase, HRP) u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi, redom: anti-zečje IgG napravljeno u

magarcu (1:200); anti-kozje IgG napravljeno u magarcu (1:200) i anti-mišje IgG napravljeno u magarcu (1:200) (svi dobavljeni od Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, SAD). Preseci su potom ispirani u PBS dok je vizuelizacija omogućena primenom hromogenog supstrata za peroksidazu, tečnog rastvora DAB. Na kraju, preseci su montirani DPX medijumom za montiranje histoloških preparata. Negativna kontrola nije sadržala primarno antitelo i na taj način je potvrđena specifičnost bojenja. Sve mikrofografije su slikane na DM RB Photomicroscope (Leica, Germany) opremljenim s Leica DFC 320 CCD kamerom.

Za duplo imunofluorescentno bojenje, nakon deparafinizacije i dehidratacije preseka kičmene moždine su blokirane 10 % NDS-om razblaženim u PBS-u u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, preseci su obeležavani anti-HMGB1 antitelom napravljenim u zecu (1:500) koje je stajalo preko noći na +4°C. Potom, preseci su ispirani PBS-om nekoliko puta da bi bili obeleženi odgovarajućim sekundarnim anti-zečjim antitelom napravljenim u magarcu i konjugovanim Alexa Flour 555 fluorescentnom bojom (1:250; Invitrogen, Karlsbad, SAD), u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi u mraku. Posle isteka vremena, preseci su isprani PBS-om dva puta, ponovo blokirani 10 % NDS-om razblaženim u PBS-u u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi, da bi potom bili obeležavani sledećim antitelima za specifične markere: anti-GFAP napravljeno u mišu (1:500; klon: 73-240), anti-ED1 napravljeno u mišu (1:200), anti-SMI-32 napravljeno u mišu (1:200) i anti-Iba1 napravljeno u kozi (1:200). Preseci su stajali preko noći na +4°C. Sutradan su uzorci ispirani u PBS nekoliko puta i primenjivana su odgovarajuća sekundarna antitela u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi, redom: anti-zečje antitelo napravljeno u magarcu konjugovano sa Alexa Flour 555 fluorescentnom bojom (1:250), anti-mišje IgG antitelo napravljeno u magarcu konjugovano Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (1:250) i anti-kozje antitelo napravljeno u magarcu konjugovano Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (1:250) (sva dobavljena od Invitrogen, Karlsbad, SAD). Po isteku vremena preseci su isprani nekoliko puta u PBS-u a onda potapani 5 min u rastvor fluorescentne boje DAPI da bi se vizuelizovala jedra. Nakon ponovnog pranja, uzorci su montirani moviol medijumom i slikani na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat-om uz korišćenje Apotome sistema. U cilju utvrđivanja ispravnosti reakcije detektovane na tkivu korišćena je negativna kontrola koja podrazumeva preparat napravljen i obrađivan pod istim uslovima kao i tkivo koje se testira, ali je u postupku izostavljeno primarno antitelo. Utvrđeno je da sekundarna antitela ne daju signal na preparatima, čime je potvrđena ispravnost bojenja.

### 3.5. METODE ZA ISPITIVANJE FUNKCIJA ČELIJA IMUNSKOG SISTEMA

#### 3.5.1. Merenje produkcije citokina metodom ELISA

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura je određivana primenom testa ELISA. U tu svrhu korišćene su mikrotitar ploče MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska) sa 96 bunarića i komercijalni parovi antitela za merenje koncentracija odgovarajućih citokina: IL-6, TNF (oba dobavljena od R&D Systems, Minneapolis, SAD), IL-1 $\beta$ , IL-12 IL-17 (dobavljeni od eBioscience), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i IL-10 (R&D Systems). Prvi korak je podrazumevao oblaganje bunarića ploča odgovarajućim primarnim antitelom (50  $\mu$ l po bunariću) u razblaženju preporučenom od strane proizvođača, u rastvoru PBS preko noći. Nakon inkubacije, ploče su ispirane  $3 \times 0.05$  % rastvorom Tween 20 u PBS (tPBS). Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela za ploču rađeno je rastvorom PBS 10% FCS (za citokine IL-17 IL-6, TNF, IL-12 ), odnosno PBS 1% BSA (za citokine IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ ). Nakon ponovnog ispiranja, uzorci i standardi su nanošeni (50  $\mu$ l u bunariće) i ploče su inkubirane 2h na sobnoj temperaturi. Sledilo je ponovno ispiranje rastvorom tPBS-a i dodavanje sekundarnog antitela obeleženog biotinom odgovarajućeg razblaženja u odgovarajućem rastvoru za blokiranje. Nakon 1h inkubiranja u rastvoru sekundarnog antitela, ploče su ispirane i dodavan je rastvor avidina konjugovanog HRP, 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su ponovo ispirane ( $3 \times$  tPBS) i dodavano je po 50  $\mu$ l supstrata za peroksidazu. Po razvijanju boje reakcija je prekidana 50  $\mu$ l 1M HCl-om a apsorbancija merena pomoću spektrofotometra (Titertek) na 450 nm i korigovana za apsorbancu na talasnoj dužini od 670 nm. Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Koncentracija citokina (ng/ml) određivana je korišćenjem standardne prave dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za rekombinantni citokin koji je prethodno serijski razblažen. Donji limit detekcije je bio 30 pg/ml, dok je gornji bio 10 ng/ml.

### 3.5.2. Metoda reakcije lančanog umnožavanja

#### 3.5.2.1. Izolovanje ukupne RNK

Svi uzorci za izolovanje RNK su bili resuspendovani u 500  $\mu$ l reagensa za izolovanje RNK i čuvani u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nakon odmrzavanja, uzorci su dopunjavani sa po 100  $\mu$ L hladnog hloroforma, blago vorteksirani, a zatim centrifugirani (12000 g, 20 min,  $+4^{\circ}\text{C}$ ). Od ovog koraka uzorci su sve vreme držani na ledu. Nakon centrifugiranja uzoraka dolazilo je do razdvajanja tečnosti na donji organski sloj u kome su zaostali proteini i gornji vodeni sloj u kome se nalazila RNK, dok se između ovih slojeva formirao prsten koji je sadržao DNK.

Vodena faza je prebacivana u plastične epruvete od 1,5 ml u koje je već odmereno 250  $\mu$ l izopropil-alkohola, a ostatak je odbacivan. Nakon izlaganja temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 30 min sledilo je ponovno centrifugiranje (12000 g, 20 min,  $+4^{\circ}\text{C}$ ). RNK je precipitirala na dnu, a supernatanti su odlivani. Talog je ispiran dodavanjem 500  $\mu$ l 70% etanola, i centrifugiran (12000 g, 10 min,  $+4^{\circ}\text{C}$ ). Etanol je odlivan, a talog RNK je sušen i finalno rastvaran u 13  $\mu$ l vode bez nukleaza (*engl.* RNase Free Water).

U oba slučaja, po 3  $\mu$ l uzorka je uzimano za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije RNK. Pravljeni su dva razblaženja svakog uzorka: 1  $\mu$ l + 49  $\mu$ l vode i 2  $\mu$ l + 48  $\mu$ l vode. Koncentracija RNK ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) je merena u uzorcima zadavanjem programa za određivanje koncentracije RNK na spektrofotometru. Finalna koncentracija je računata kao srednja vrednost iz dva merenja različitog razblaženja. Na osnovu dobijene koncentracije RNK izračunata je količina ( $\mu\text{g}$ ) RNK u uzorcima. Takođe, meren je i odnos apsorbancija A260/A280 koji je govorio o čistoći uzoraka.

#### 3.5.2.2. Reakcija reverzne transkripcije

Reakcija Reakcija reverzne transkripcije se koristi da bi se izolovana RNK prevela u cDNK. Za reakciju RT su korišćene jednake količine (1 - 3  $\mu\text{g}$ ) RNK svakog uzorka. U 11.5  $\mu$ l svakog uzorka je dodavano po 1  $\mu$ l nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Villjus, Litvanija). Uzorci su inkubirani 5 min na  $70^{\circ}\text{C}$ , a potom prebacivani na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 7.5  $\mu$ l rastvora koji je po uzorku sadržao: 4  $\mu$ l koncentrovanog pufera

za reverznu transkripciju, 0.5  $\mu$ l inhibitora RNaze, 2  $\mu$ l smeše dNTP (10 mM) i 1  $\mu$ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (svi dobavljeni od Fermentas). Finalna zapremina reakcione smeše je bila 20  $\mu$ l. Reakcija je nastavljena inkubacijom 10 min na 25°C, a potom 60 min na 42°C. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70°C tokom 10 min i na 95°C tokom 3 min. Uzorci cDNK su čuvani na +4°C do dalje upotrebe.

### 3.5.2.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-time qPCR, *engl.* Real-Time Polymerase Chain Reaction) korišćena je za analizu relativne promene transkripcije iRNK gena od interesa. U eksperimentima su korišćene ploče sa 96 bunarčića za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, SAD) i u bunariće je dodavano po 8  $\mu$ l reakcione smeše za PCR. Korišćene su po dve reakcione smeše u duplikatu za svaki uzorak, jedna za gen od interesa, a druga za referentni gen (Gapdh za uzorke iz kičmene moždine,  $\beta$ -aktin za uzorke iz MLC). Reakcione smeše za kvantitativni PCR su sadržale po uzorku: 5  $\mu$ L Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 1  $\mu$ l specifičnih prajmera za gen od interesa ili za referentni gen prajmera (Forward i Reverse, Metabion, Štajnkirhen, Nemačka) i 2  $\mu$ l dejonizovane vode. Nakon nalivanja ploče reakcionim smešama, u bunariće je dodavano po 2  $\mu$ l odgovarajućeg uzorka cDNK prethodno razblaženog 5 puta u dejonizovanoj vodi. Ploča je pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, SAD), centrifugirana kratko i prenošena u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 10 min na 95°C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali korake od 15 sekundi na 95°C i 60 sekundi na 60°C. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Vrednosti relativnih promena gena određivane su u odnosu na referentni gen Gapdh i iskazane kao  $2^{-\Delta C_t}$  gde je  $\Delta C_t$  razlika između  $C_t$  vrednosti gena od interesa i referentnog gena.

#### 3.5.2.4. Prajmeri

GAPDH:

5'-ACA GCC TTG GCA GCA CCA GT-3';

5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3';

HMGB1:

5'-TAA GAA GCC GAG AGG CAA AA-3';

5'-GCA GAC ATG GTC TTC CAC CT-3';

### 3.5.3. Citofluorimetrija

#### 3.5.3.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula

Iz DĆ dobijenih iz miševa ispitivana je ekspresija površinskih molekula od interesa. Nakon završetka diferencijacije,  $5 \times 10^5$  ćelija je prebacivano u epruvete za protočnu citofluorimetriju i resuspendovano u 50  $\mu$ l PBS 2 % mišjeg seruma. Dodavana su sledeća mišja monoklonska antitela: CD11c i CD86 konjugovano PE-cijaninom 5 (PE-Cy5) i CD40 konjugovano FITC-om (sva dobavljena od eBioscience). Ćelije su inkubirane sa antitelima 30 min na +4°C, nakon toga su prane PBS-om dva puta, centrifugirane na 800 g 3 min, finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

Nakon diferencijacije DĆ dobijenih iz ljudi,  $1 \times 10^6$  ćelija je prebacivano u epruvete za protočnu citofluorimetriju i resuspendovano u 50  $\mu$ l PBS. Ekspresija površinskih molekula od interesa je ispitivana obeležavanjem ćelija na sledeća ljudska monoklonska antitela: CD86 konjugovano sa FITC (BD Bioscience), CD14 (ImmunoTools GmbH, Nemačka) i CD40 (BD Bioscience) konjugovano PE-om, CD14 i CD11c konjugovano PE cijaninom 7 (PE-Cy7) (oba dobavljena od BD Biosciences), CD83 konjugovano alofikocijaninom (*engl.* Allophycocyanin - APC) i HLA-DR konjugovano alofikocijaninom H7 (APC-H7) (oba dobavljena od BD

Biosciences). Uzorci su inkubirani sa antitelima 20 min u mraku na sobnoj temperaturi da bi potom bili analizirani na protočnom citofluorimetru.

### 3.5.3.2. Detekcija fluorescencije

Intenzitet fluorescence obeleženih uzoraka dobijenih iz pacovskih i mišjih ćelija je detektovan na CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analiziran je korišćenjem softverskog programa FlowMax (Partec, GmbH, Münster, Nemačka). Intenzitet fluorescence obeleženih uzoraka dobijenih iz ljudskih ćelija je detektovan na FACSCanto II protočnom citofluorimetru i analiziran pomoću FACSDiva softvera (BD Biosciences, CA, SAD), dok su neke dodatne analize su izvedene na FlowJo softveru (Tree Star, Inc, OR, SAD).

Odgovarajuće izotipske kontrole su korišćene za određivanje granica za pozitivnost ćelijskih markera. Korišćena je i negativna kontrola u kojoj su ćelije inkubirane bez dodatog antitela (nebojane ćelije). Proporcija ćelija obojenih antitelima izotipske kontrole je bila <1 %. Uzorci su ograničavani koristeći forward scatter – FSC i side scatter - SSC da bi se izbegle mrtve ćelije i njihovi ostaci.

Rezultati citofluorimetrije su prikazani kao procenat ćelija koji je vezao odgovarajuće antitelo. Takođe, određivana je i jačina fluorescencije, mfi (*engl.*, mean fluorescence intensity).

### 3.5.4. Testovi proliferacije ćelija

#### 3.5.4.1. Određivanje proliferacije mišjih ćelija *in vitro* obeležavanjem CFSE-om

U cilju *in vitro* ispitivanja proliferacije, CD4<sup>+</sup> T-limfociti izolovani iz BALB/c miševa su obeleženi CFSE-om neposredno pre njihove ko-kultivacije sa DĆ dobijenim iz C57BL/6 miševa. CD4<sup>+</sup> T-limfociti su resuspendovani u PBS-u, u koncentraciji 1x10<sup>6</sup>/1 ml i obeleženi CFSE-om (2 µM) u trajanju od 20 min na na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Nakon isteka ovog vremena, reakcija je prekidana dodavanjem 5 puta veće zapremine RPMI 5 % FCS i ćelije su stavljanje 5 min u inkubator. Zatim, ćelije su prane 2 puta u PBS-u,

resuspendovane u medijumu za DĆ i ko-kultivisane sa DĆ. Proliferacija ćelija određivana je sekvencijalnim gubitkom fluorescence CFSE-a što je detektovano protočnom citofluorimetrijom.

#### 3.5.4.2. Određivanje proliferacije ljudskih ćelija *in vitro* ugradnjom [<sup>3</sup>H] timidina

Da bi se izmerila proliferacija PBMC indukovana od strane DĆ dodavan je [<sup>3</sup>H] timidin u ćelijsku kulturu 96 h nakon ko-kultivisanja. Intenzitet proliferacije je određivan na osnovu ugradnje 1 μCi timidina u ćelije tokom 18 h, kao broj otkucaja po minuti (*engl.*, cpm – counts per minute) (Harvester96 2M; Tomatec Inc. Hamden, SAD).

### 3.5.5. Određivanje alogene proliferacije ćelija

#### 3.5.5.1. Ko-kultivacija mišjih dendritskih ćelija sa CD4<sup>+</sup> T-limfocitima

DĆ dobijene iz kostne srži C57BL/6 miševa su nakon završetka diferencijacije i sazrevanja 8. dana prebrojane i ko-kultivisane sa CD4<sup>+</sup> T-limfocitima BALB/c miševa. Da bi se dobili CD4<sup>+</sup> T-limfociti, cervikalni limfni čvorovi su izolovani iz BALB/c miševa i ćelije su prečišćene magnetnom separacijom, kako je prethodno opisano, da bi nakon toga CD4<sup>+</sup> T-limfociti bili obeleženi CFSE-om. DĆ i CD4<sup>+</sup> T-limfociti (1x10<sup>5</sup>) su pomešani u odnosu 1:20 (DĆ: CD4<sup>+</sup> T-limfociti) u ploči sa 96 bunarića U dna (Sarstedt) u ukupnoj zapremini od 200 μl u medijumu za mišje DĆ. Ćelije su inkubirane narednih 120h, nakon čega su pokupljeni supernatanti za određivanje produkcije citokina ELISA metodom, dok je proliferacija ćelija određena sekvencijalnim gubitkom fluorescence CFSE.

#### 3.5.5.2. Alogena ko-kultivacija ljudskih dendritskih ćelija sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Nakon završetka diferencijacije, DĆ su odlepljene iz ploče, prebrojane i ko-kultivisane sa (1x10<sup>5</sup> ćelija/ bunaru) alogenim PBMC u odnosu 1:20 (DĆ: PBMC) u ploči sa 96 bunarića



U dna u medijumu za ljudske dendritske ćelije. Pozitivna kontrola je stimulisana sa 50 ng/ml PMA i 500 ng/ml jonomicina, dok je negativna kontrola sadržala samo medijum. Ćelije su inkubirane narednih 96h, nakon čega su pokupljeni supernatanti za određivanje produkcije citokina ELISA metodom, dok je proliferacija ćelija određena ugradnjom [<sup>3</sup>H] timidina.

### 3.5.6. Imunocitohemija

Obeležavanje molekula od interesa metodom imunocitohemije je sprovedeno na DĆ diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa. Napravljene su četiri grupe ćelija: iDĆ, mDĆ, tolEP-DĆ i DĆ tretirane EP-om u odsustvu LPS-a (EP-DĆ). Neposredno pre tretmana ćelija LPS-om, one su odlepljene iz ploče u kojoj su kultivisane, brojane i sađeno je  $4 \times 10^5$  ćelija/100  $\mu$ l medijuma za DĆ na mikroskopske pločice sa 8 bunara (Millicell® EZ slide, Millipore). Zatim je usledio tretman LPS-om (100 ng/ml) odgovarajućih grupa ćelija u trajanju od 15 min do 4h, u zavisnosti od primenjenih antitela. Nakon isteka vremena, ćelije su ispirane jednom PBS-om i fiksirane sa 4 % PFA u trajanju od 20 min na +4°C. Posle ponovnog pranja (PBS-om dva puta) inkubirane su u 0,25 % rastvoru Triton X-100 u PBS-u 10 min i zatim ponovo prane PBS-om, da bi potom usledilo blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela 3 % rastvorom BSA u PBS-u u trajanju od 30 min. Ćelije su obeležene sledećim antitelima: anti-NQO1 (1:250) i anti-HO-1 (1:250) (oba napravljena u kozi), anti-Nrf2 (1:500) i anti-NFκB (1:250) (oba napravljena u zecu) (sva dobavljena od Santa Cruz Biotechnology). Sva antitela su razblažena u PBS-u i ćelije su u njima držane preko noći na +4°C. Sutradan, ćelije su ispirane tri puta PBS-om da bi zatim bile obeležene odgovarajućim sekundarnim antitelom: anti-zečje antitelo napravljeno u magarcu konjugovano Alexa Flour 555 fluorescentnom bojom (1:250), zatim anti-mišje IgG antitelo napravljeno u magarcu konjugovano Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (1:250) i anti-kozije antitelo napravljeno u magarcu konjugovano Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom (1:250), sva razblažena u PBS-u, u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi u mraku. Posle isteka vremena, uzorci su oprani 5 puta u PBS, a potom tri puta u destilovanoj vodi i potopljeni 5 minuta u DAPI u cilju vizuelizacije jedra da bi se nakon toga ponovo oprali pet puta u destilovanoj vodi. Kao kontrola bojenja korišćene su ćelije koje nisu inkubirane sa primarnim antitelom, iako su prošle kroz celu proceduru bojenja. Uzorci su montirani moviol medijumom i slikani na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu opremljnim sa kamerom i EC Plan-Apochromat uz

korišćenje Apotome sistema. Kvantifikacija je rađena u Image J programu u kojem je određivan relativni intenzitet fluorescence u jedrima DC-a.

U cilju obeležavanja i vizuelizacije F-aktinskih filamenata ćelija, nakon fiksiranja ćelije su prane PBS-om tri puta i tretirane faloidinom konjugovanim Alexa Fluor 647 fluorescentnom bojom (Thermo Fisher) u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Potom su uzorci prani PBS-om nekoliko puta i destilovanom vodom da bi bili potopljeni 5 min u DAPI. Nakon višestrukog pranja destilovanom vodom, uzorci su montirani moviol medijumom i slikani na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu opremljenim kamerom i EC Plan-Apochromat uz korišćenje Apotome sistema. Kvantifikacija je rađena u AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 programu u kojem je određivana površina ćelija.

### **3.6. PRIMENA DENDRITSKIH ĆELIJA *IN VIVO***

#### **3.6.1. Tretman C57BL/6 miševa dendritskim ćelijama**

Miševi C57BL/6 soja su podeljeni u 3 grupe. Prva grupa je primala mDC (1x10<sup>6</sup>/80 µl po mišu), druga grupa toIEP-DC (1x10<sup>6</sup>/80 µl po mišu), dok je treća, kontrolna grupa, primala 80 µl fiziološkog rastvora po mišu. Životinje su tretirane subkutano u zadnju šapu.

#### **3.6.2. Imunizacija C57BL/6 miševa**

U cilju indukovanja imunskog odgovora kod miševa, 24h nakon tretmana DC-ama životinje su imunizovane CFA-om suplementiranim sa *M. tuberculosis* (do 5mg/ml) i pomešanim u jednakoj zapremini sa PBS. Imunizacija je izvođena subkutanom ubrizgavanjem 50 µl emulzije u zadnju šapu, istu onu koja je prethodnog dana tretirana ćelijama.

### 3.6.3. Ispitivanje migracije dendritskih ćelija *in vivo*

U cilju *in vivo* praćenja DĆ ubrizganih u zadnje šape miševa, neposredno pre tretmana obe vrste DĆ (mDĆ i tolEP-DĆ) su obeležene CFSE-om (2  $\mu$ M), kao što je prethodno opisano. Određivanje broja CFSE<sup>+</sup> ćelija je izvedeno na CyFlow protočnom citofluorimetru nakon izolacije ćelija limfnog čvora.

### 3.6.4. Unutarćelijsko bojenje ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova C57BL/6 miševa *ex vivo*

Tri dana nakon što su C57BL/6 miševi imunizovani, izolovani su poplitealni limfni čvorovi (PLČ) koji dreniraju mesto imunizacije. Tkivo je zatim nežno iseckano makazama nekoliko puta, a onda stavljano u 1 mg/ml kolagenaze tip V rastvorene u RPMI medijumu. Ovaj tretman dovodi do prekidanja međućelijskih veza a da pritom ne dođe do oštećenja samih ćelija. Nakon 20 min inkubacije na 37°C uz lagano mešanje, reakcija je prekidana dodavanjem FCS-a tako da je njegova finalna koncentracija u rastvoru bila 10 %. Suspenzija ćelja je zatim filtrirana kroz sterilnu najlonsku filter mrežicu promera 40  $\mu$ m, a potom centrifugirana na 500 g 5 min.

Nakon izolacije,  $5 \times 10^5$  ćelija je stimulirano 4h koktelom za stimulaciju ćelija. Nakon toga, ćelije su oprane u PBS-u, resuspendovane sa po 50  $\mu$ l PBS-a suplementiranog 2% mišjim serumom u epruvetama za protočnu citometriju, gde im je dodavano anti-CD4 antitelo konjugovano PerCP-Cy5.5-om (*engl.* Peridinin-chlorophyll-protein Complex: CY5.5 Conjugate; eBioscience). Nakon 30 min na +4°C, ćelije su prane dva puta u PBS-u i otpočet je proces fiksacije ćelija i permeabilizacije membrane pomoću Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set. Ćelije su bile pod uticajem 100  $\mu$ l/uzorku fiksacionog pufera, kako bi se zadržala struktura ćelija, u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi u mraku, da bi nakon toga bile oprane u PBS-u i ostavljene u 1 ml PBS preko noći. Sledećeg dana su prane u puferu za permeabilizaciju, kako bi kroz nastale pore u ćelijskoj membrani molekuli unutar ćelije postali dostupni i obojene sledećim mišjim antitelima: IL-17, IFN- $\gamma$  ili IL-10 konjugovana sa FITC ili PE (sva dobavljena od eBioscience) u trajanju od 1 h na +4°C.

Nakon isteka vremena, uzorci su oprani dva puta u PBS-u, resuspendovani u 2 ml PBS i analizirani na protočnom citofluorimetru.

### **3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

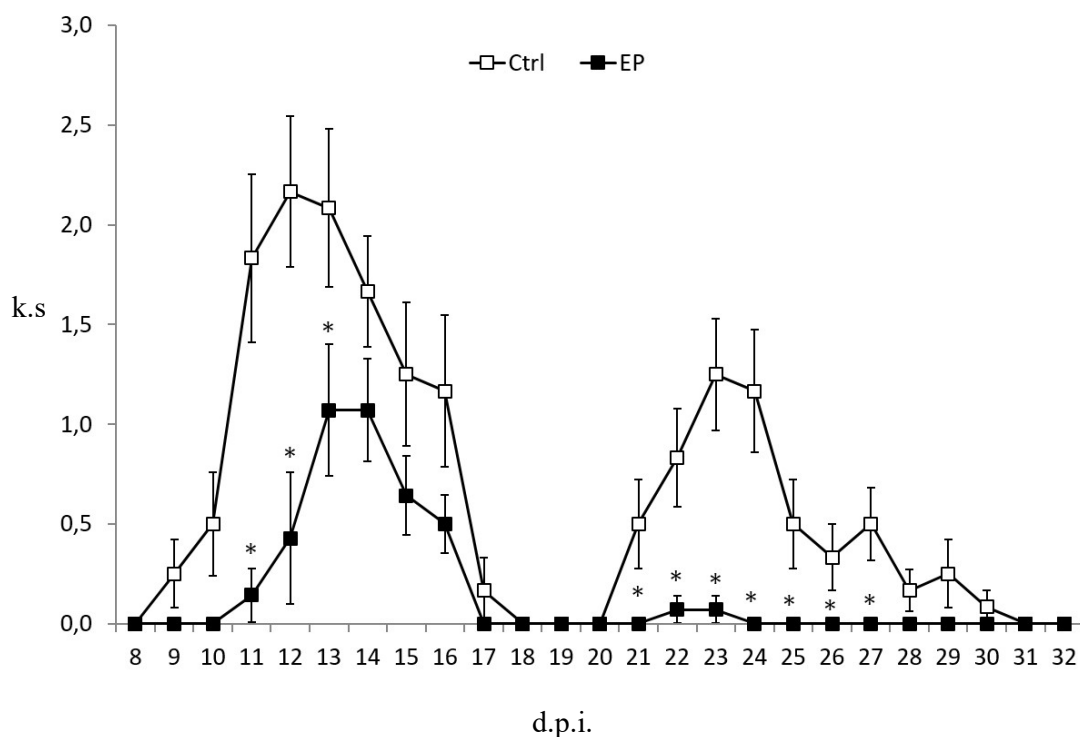
Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti su korišćeni Studentov t-test ili one-way ANOVA sa Tukey testom višestrukog poređenja. Svi testovi su urađeni pomoću softverskog paketa Graphpad Prism 7 (Graphpad, San Diego, SAD). Vrednost parametara  $p$  manja od 0.05 je smatrana statistički značajnom.

# 4. Rezultati

## 4.1. UTICAJ *IN VIVO* TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS KOD DARK AGUTI PACOVA

### 4.1.1. Uticaj etil-piruvata na klinički tok eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

U cilju ispitivanja efekta EP-a na razvoj i tok EAE-a, bolest je indukovana ubrizgavanjem encefalitogene emulzije (HKM+CFA) u ženke DA pacova. Intraperitonealni tretman životinja EP-om (300 mg/kg) započet je 8. d.p.i., jednom dnevno i trajao je sve do kraja prvog relapsa (17. d.p.i.). Kontrolne životinje su u istom periodu tretirane PBS-om. Praćen je klinički tok bolesti naredna 24 dana. Utvrđeno je da EP ublažava simptome bolesti. Kontrolne životinje su razvile snažan prvi napad i potom relaps (Grafik 1). Životinje tretirane EP-om su imale slab prvi napad i nije došlo do razvoja relapsa. Takođe, EP je doprineo odlaganju početka bolesti koja je pritom i kraće trajala (Tabela 1).



**Grafik 1. Uticaj EP-a na tok EAE-a.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 17.

d.p.i. Klinička slika bolesti praćena je do 32. d.p.i. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8). \*p < 0,05 vs. Ctrl, odrećeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku znaćajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

**Tabela 1. Efekat EP-a na kliničke parametre EAE-a**

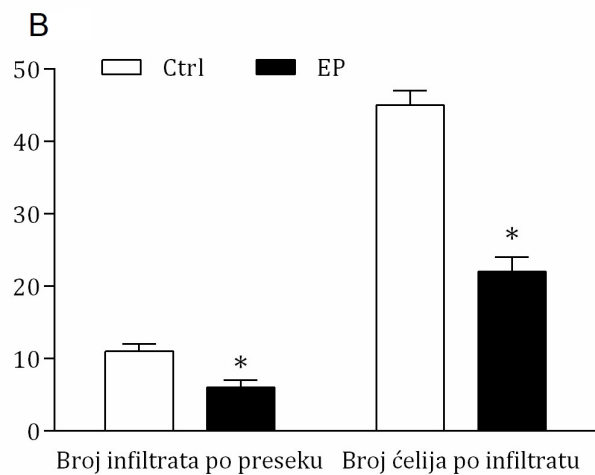
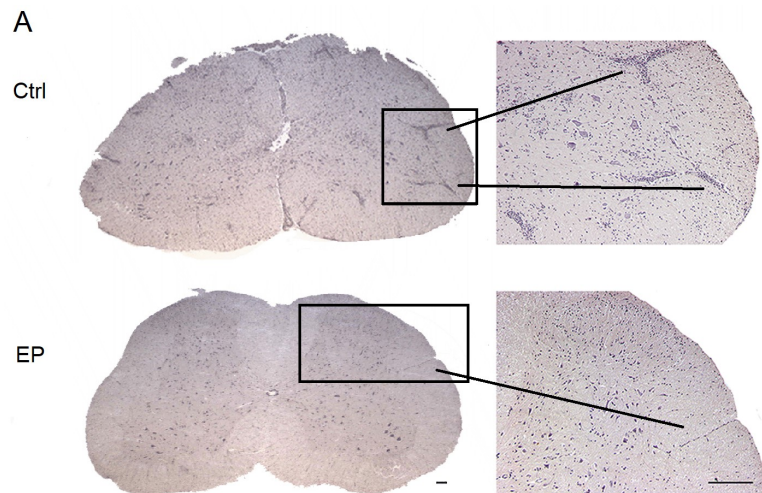
	Tretman	Incidenca (%)	Početak (dan)	Trajanje bolesti (dani)	Kumulativni k.s.	Prosećni k.s.	Maksimalni k.s.
<b>Prvo kliničko ispoljavanje</b>	<b>Ctrl</b>	100,0	10,2 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 1,0	11,1 $\pm$ 3,3	2,3 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,7
	<b>EP</b>	87,5	12,7 $\pm$ 1,0*	2,0 $\pm$ 1,3*	3,9 $\pm$ 3,2*	1,5 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,9*
<b>Relaps</b>	<b>Ctrl</b>	100,0	21,7 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 3,4	5,6 $\pm$ 4,2	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,7
	<b>EP</b>	12,5	22,3 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,8*	0,1 $\pm$ 0,4*	0,1 $\pm$ 0,2*	0,1 $\pm$ 0,2*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=8). \*p < 0,05 vs. Ctrl odrećeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku znaćajnost. Kontrola (Ctrl), klinički skor (k.s.), etil-piruvat (EP).

Rezultati jasno pokazuju da EP primenjen na ovaj naćin ostvaruje terapijski efekat u EAE-u.

#### **4.1.2. Uticaj etil-piruvata na infiltraciju ćelija u kićmenu moćdinu tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**

U cilju ispitivanja efekta koji EP ostvaruje na infiltraciju imunskih ćelija u kićmenu moćdinu posmatrani su histološki preseći kićmenih moćdina. Imunizovani pacovi su tretirani EP-om ili PBS-om od početka bolesti do 12. d.p.i, da bi im se u piku bolesti izolovao lumbosakralni region kićmene moćdine. Bojenje preseka kićmene moćdine hematoksilinom je pokazalo da tretman EP-om, u porećenju sa tretmanom PBS-om, dovodi do znaćajnog smanjenja broja infiltrata po preseku (Slika 2A), kao i broja ćelija po infiltratu (Slika 2B).



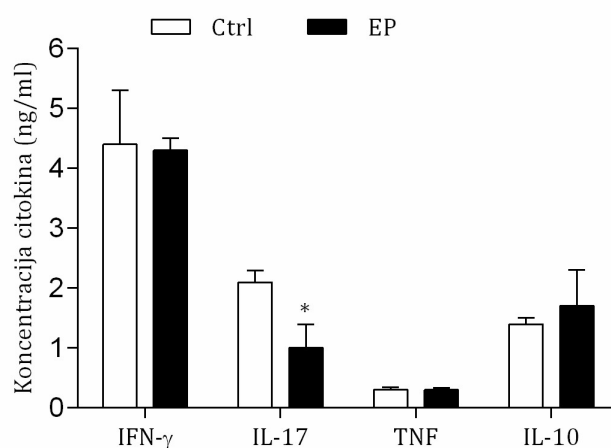
**Slika 2. Uticaj EP-a na infiltraciju ćelija u kičmenu moždinu pacova kojima je indukovano EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. (pik bolesti). Kičmene moždine su izolovane u pik bolesti i preseci lumbosakralnog regiona su bojeni hematoksilinom. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m (A). Broj infiltrata po preseku i broj ćelija po infiltratu su prikazani kao srednje vrednosti + SE (n=8). Rezultati su dobijeni iz ukupno 32 histološka preseka (B) \* $p < 0,05$  vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Ovaj rezultat pokazuje da tretman pacova EP-om smanjuje broj inflamacijskih ćelija koje se infiltriraju u kičmenu moždinu tokom EAE.



#### 4.1.3. Uticaj etil-piruvata na produkciju citokina u ćelijama koje infiltriraju kičmenu moždinu tokom eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

Usledilo je ispitivanje efekta EP-a na produkciju citokina u ćelijama koje su infiltrirale kičmenu moždinu imunizovanih pacova. Infiltrati imunskih ćelija su izolovani na gradijentu Perkola i postavljeni u ćelijsku kulturu. Nakon 48h inkubacije skupljani su supernatanti ćelijskih kultura i određivana je produkcija citokina metodom ELISA. Rezultati pokazuju da tretman EP-om smanjuje produkciju IL-17 od strane imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine, dok je produkcija IFN- $\gamma$ , TNF-a i IL-10 nepromenjena u poređenju sa nivoom kontrolnih (Grafik 2).

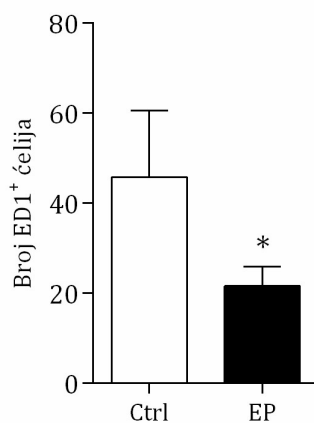
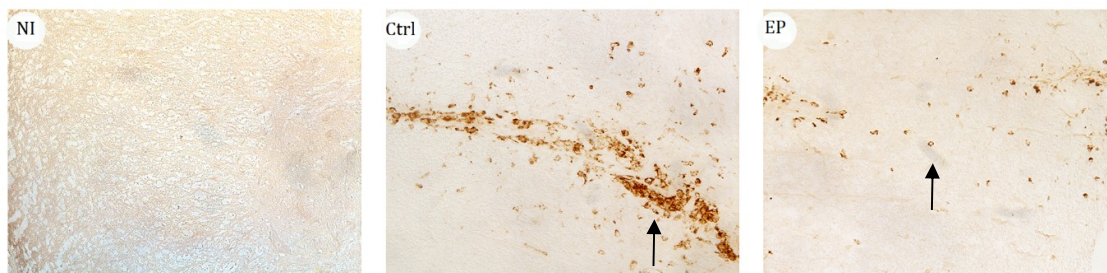


**Grafik 2. Uticaj EP-a na produkciju citokina od strane imunskih ćelija kičmene moždine pacova kojima je indukovao EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Imunske ćelije kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i produkcija citokina određivana je nakon 48h kultivacije ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD (n=6). \*p < 0,05 vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Ovi rezultati jasno pokazuju da EP moduliše produkciju IL-17 u imunskim ćelijama kičmene moždine pacova kojima je indukovao EAE.

#### 4.1.4. Uticaj etil-piruvata na makrofage i mikrogliju u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

U nastavku istraživanja ispitan je efekat EP-a na aktivirane makrofage/mikrogliju CNS-a. Imunohistohemijska analiza je sprovedena na lumbosakralnom regionu kičmene moždine, izolovane na piku bolesti pacova tretiranih EP-om od 8. do 12. d.p.i. ED1 antitelo korišćeno je za detekciju aktiviranih makrofaga i mikroglije na presecima kičmene moždine, (mirujuća mikroglija ne eksprimira ED1). Kod neimunizovanih životinja nisu zapažene ED1<sup>+</sup> ćelije u kičmenoj moždini, dok su kod imunizovanih bili prisutni masivni inflamacijski infiltrati u kojima su bile uočljive brojne ED1<sup>+</sup> ćelije. Kod pacova tretiranih EP-om, zapažena je značajna redukcija broja ED1<sup>+</sup> ćelija (Slika 3). U beloj masi kičmene moždine imunizovanih pacova, ED1<sup>+</sup> ćelije bile su guste, fokalne i plejomorfne, a u grupi koja je tretirana EP-om okrugle i retke (Slika 3).



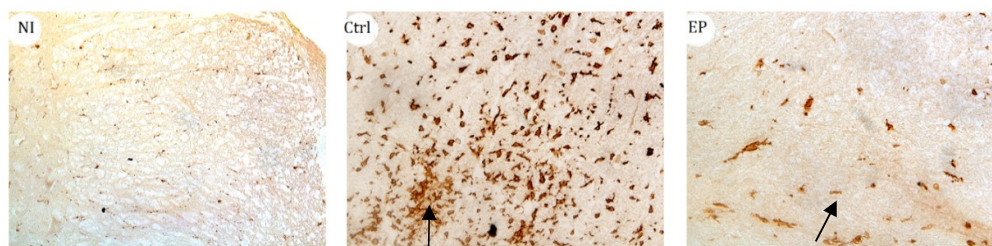
**Slika 3. Uticaj EP-a na prisustvo makrofaga u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE. DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Neimunizovane životinje (NI) su korišćene kao fiziološka kontrola. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseci**

lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za ED1. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu\text{m}$ . Kvantifikacija je izvršena na 5 preseka po grupi i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SD. \* $p < 0,05$  vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati ukazuju da EP redukuje infiltraciju reaktivnih makrofaga/mikroglije u kičmenu moždinu tokom EAE-a, kao i da EP utiče na njihovu morfologiju.

#### 4.1.5. Uticaj etil-piruvata na aktivaciju mikroglije u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

U istoj eksperimentalnoj postavci ispitan je i uticaj EP-a u piku bolesti na aktiviranu mikrogliju. Imunohistohemijskim metodama su lumbosakralni regioni kičmene moždine neimunizovanih, imunizovanih i EP-om tretiranih životinja obeležavani Iba1 antitelom, specifičnim za makrofage i mirujuću mikrogliju, kao i aktiviranu mikrogliju u inflamacijskim uslovima. Preseci kičmenih moždina neimunizovanih životinja su imali mali broj Iba1<sup>+</sup> ćelija, dok je nakon imunizacije taj broj povećan. Takođe, pored toga što su bile brojnije, Iba1<sup>+</sup> ćelije su bile veće i razgranatije. Nakon tretmana EP-om, broj razgranatih Iba<sup>+</sup> ćelija u kičmenoj moždini bio je značajno smanjen (Slika 4).

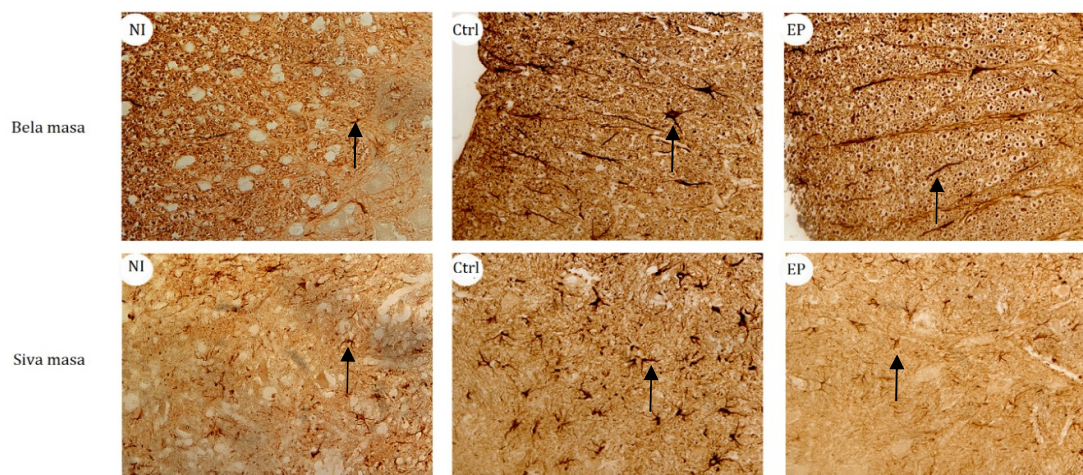


**Slika 4. Uticaj EP-a na aktiviranu mikrogliju u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Neimunizovane životinje (NI) su korišćene kao fiziološka kontrola. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseci lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za Iba1. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu\text{m}$ . Kvantifikacija je izvršena na 5 preseka po grupi i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SD. \* $p < 0,05$ , vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati ukazuju da tretman EP-om dovodi do smanjenja broja ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini imunizovanih pacova.

#### 4.1.6. Uticaj etil-piruvata na astrocite u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Usledilo je ispitivanje dejstva EP-a na astrocite. Imunohistohemijskim metodama su lumbosakralni regioni kičmene moždine obeležavani antitelom specifičnim za marker astrocita GFAP. Korišćeni su isti uzorci kao i u prethodnom eksperimentu. U kičmenoj moždini neimunizovanih pacova zapaženo je prisustvo nereaktivnih astrocita, koje karakteriše malo ćelijsko telo sa kraćim nastavcima, u beloj i u sivoj masi. Imunizacija je dovela do prisustva velikog broja fibroznih, reaktivnih ćelija, sa visokim sadržajem GFAP i u beloj i u sivoj masi. Prisustvo velikog broja GFAP<sup>+</sup> protoplazmatičnih astrocita sa kratkim telom i debelim, kratkim nastavcima je primećeno u sivoj masi (Slika 5). Nakon tretmana EP-om su se u beloj masi uočavali fibrozni astrociti u kojima je povećana ekspresija GFAP-a. Međutim, u sivoj masi nastavci protoplazmatičnih astrocita se nisu preklapali, pri čemu su nalikovali na astrocite u fazi mirovanja (nereaktivne) (Slika 5).



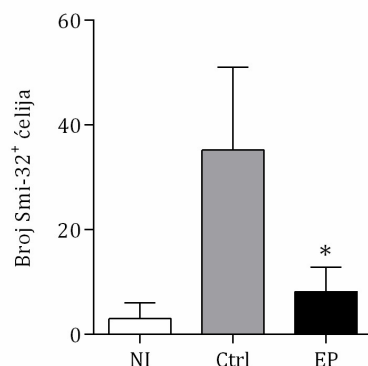
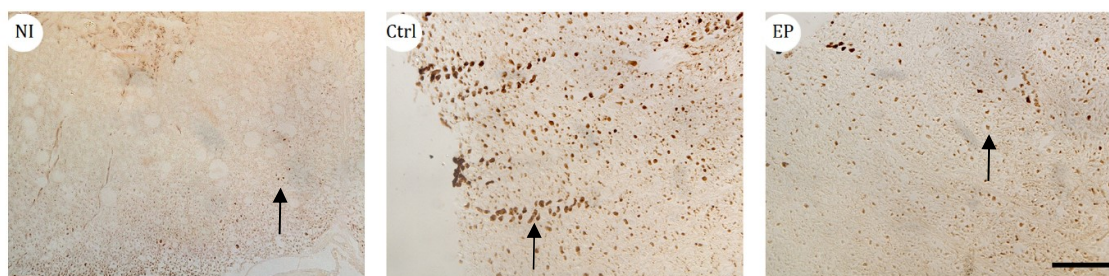
**Slika 5. Uticaj EP-a na broj i tip astrocita u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Neimunizovane životinje (NI) su korišćene kao fiziološka kontrola. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseći

lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za GFAP. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati pokazuju da EP sprečava pojavu reaktivnih astrocita, posebno u sivoj masi kičmene moždine pacova kojima je indukovano EAE.

#### 4.1.7. Uticaj etil-piruvata na neurone u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

U svrhu ispitivanja kako EP deluje na neurone u kičmenoj moždini urađeno je imunohistohemijsko obeležavanje lumbosakralnog regiona kičmene moždine antitelom specifičnim za SMI-32, nefosforilisani neurofilament, koje boji dendrite i tela neurona, kao i tanke aksone. Na taj način je omogućena vizuelizacija neurofilamenta i oštećenja askona. Neimunizovani pacovi nisu imali oštećene aksone. Nakon imunizacije došlo je do degeneracije i uvećanja aksona u piku bolesti na šta ukazuje intenzivno bojenje antitelom specifičnim za SMI-32 (Slika 6). Tretman EP-om dovodio je do smanjenja broja oštećenih aksona, što je pokazano i kvantifikacijom ćelija (Slika 6).



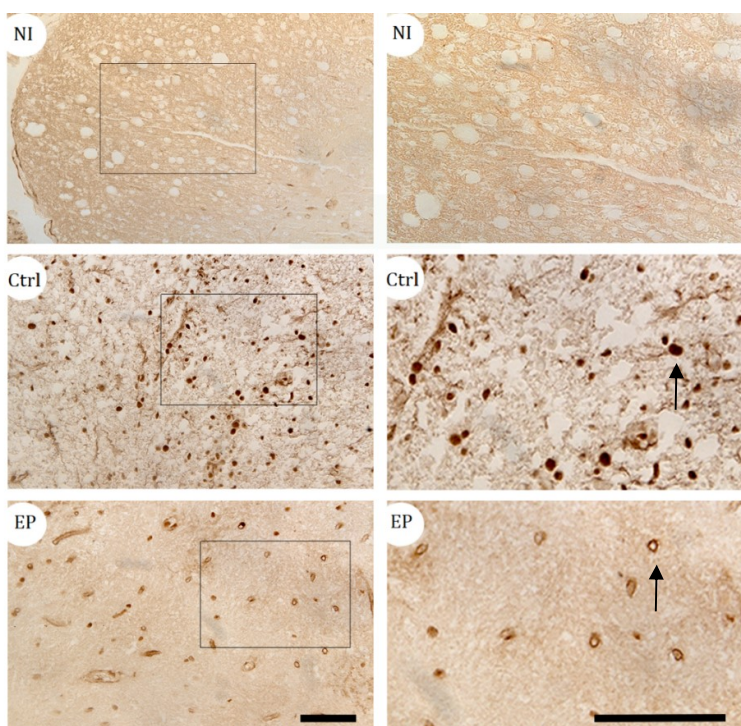
**Slika 6. Uticaj EP-a na neurone u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE. DA** pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Neimunizovane životinje (NI) su

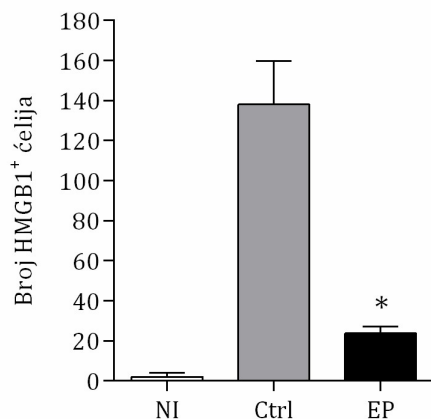
korišćene kao fiziološka kontrola. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseći lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za SMI-32. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kvantifikacija je izvršena na 5 preseka po grupi i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SD. \* $p < 0,05$  vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati jasno pokazuju da tretman EP-om sprečava oštećenja aksona u EAE-u.

#### 4.1.8. Uticaj etil-piruvata na nivo ekspresije proteina HMGB1 u centralnom nervnom sistemu u pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Da bi se ispitalo da li EP utiče na HMGB1 u EAE-u, pacovi su tretirani EP-om kao što je prethodno opisano. Ispitivan je prvo uticaj EP-a na brojnost i morfologiju ćelija koje ekspiriraju HMGB1. Histološki preseći lumbosakralnog regiona kičmene moždine su obeležavani antitelom specifičnim za HMGB1, metodom imunohistohemije. U neimunizovanoj grupi ekspresija HMGB1 nije uočena. U kičmenoj moždini imunizovanih pacova uočena je intenzivna ekspresija HMGB1, međutim kod pacova tretiranih EP-om bilo je primetno značajno smanjenje ekspresije HMGB1 po ćeliji, kao i smanjene broja HMGB1<sup>+</sup> ćelija. Ovo je potvrđeno i kvantifikacijom (Slika 7).



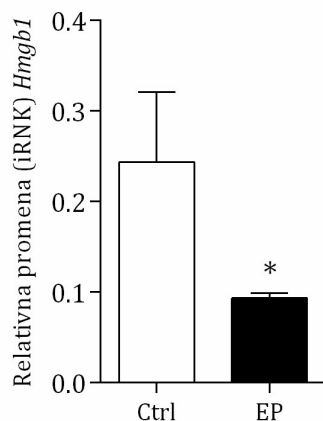


**Slika 7. Uticaj EP-a na HMGB1 u kičmenoj moždini pacova kojima je indukovano EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Neimunizovane životinje (NI) su korišćene kao fiziološka kontrola. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseki lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za HMGB1. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kvantifikacija je izvršena na 5 preseka po grupi i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SD. \* $p < 0,05$  vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati ukazuju da tretman EP-om dovodi do smanjenja ekspresije proteina HMGB1 u ćelijama kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a.

#### **4.1.9. Uticaj etil-piruvata na nivo ekspresije iRNK za *Hmgb1* u centralnom nervnom sistemu pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu**

Potom je određivan relativni nivo ekspresije iRNK za *Hmgb1* u homogenatima kičmenih moždina izolovanih iz pacova tretiranih kao što je prethodno opisano. Uočeno je značajno smanjenje ekspresije iRNK za *Hmgb1* u grupi tretiranoj EP-om u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 3).



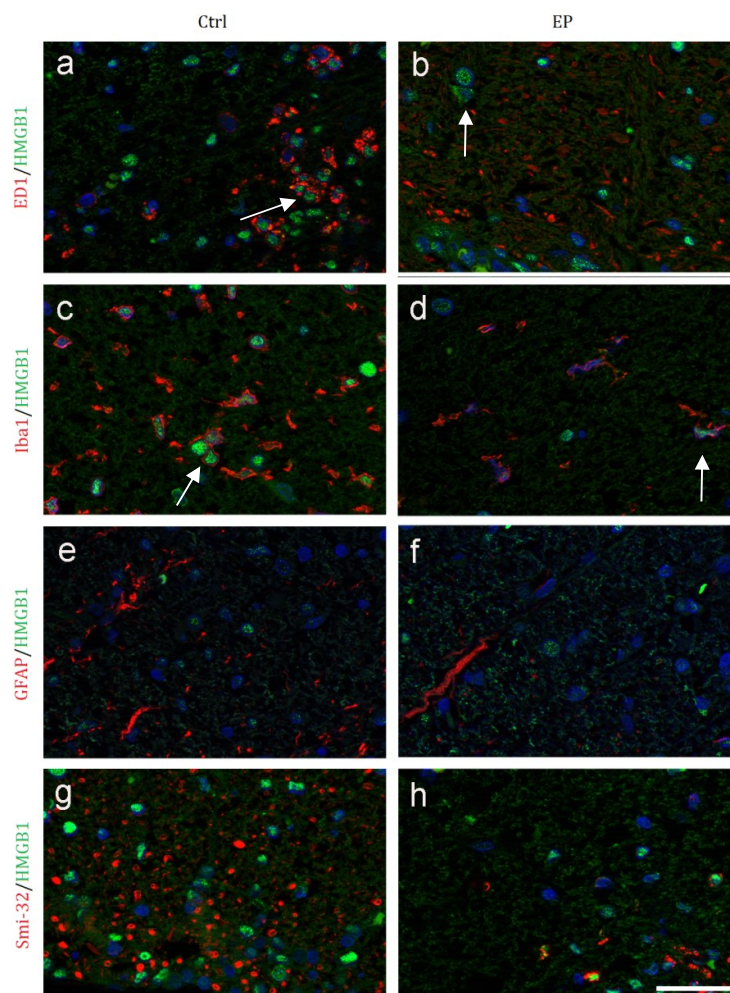
**Grafik 3. Uticaj EP-a na relativni nivo ekspresije iRNA za *Hmgb1*.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl), intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Kičmene moždine su izolovane 12. d.p.i., na piku bolesti. Relativni nivo ekspresije iRNA za *Hmgb1* je određena metodom RT-PCR u homogenatima kičmene moždine i prikazana kao srednja vrednost + SD (n=6). \*p < 0,05 vs. Ctrl, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP).

Rezultati pokazuju da tretman EP-om inhibira ekspresiju iRNA za *Hmgb1* u homogenatima kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a.

#### 4.1.10. Uticaj etil-piruvata na lokalizaciju HMGB1 u ćelijama kičmene moždine pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Usledilo je ispitivanje lokalizacije proteina HMGB1 u ćelijama kičmene moždine. Da bi se utvrdilo koje ćelije ekspimiraju HMGB1 u kičmenim moždinama imunizovanih pacova urađeno je duplo fluorescentno imunohistohemijsko bojenje za ED1/HMGB1, Iba1/HMGB1, GFAP/HMGB1 i SMI-32/HMGB1 (Slika 8A-H). Ekspresija HMGB1 je uočena u ED1<sup>+</sup> i Iba1<sup>+</sup> ćelijama, tj. u makrofagima i aktiviranoj mikrogliji (Slika 8A-D). Bitno je napomenuti da je tretman EP-om doveo do smanjenja intenziteta HMGB1 bojenja u tim ćelijama. Takođe, primećena je promena lokalizacije ekspresije HMGB1 molekula kod tretiranih životinja. (Slika 8). Ekspresija HMGB1 kod EP-om tretiranih životinja je uočljiva i van jedra, dok je kod netretiranih životinja lokalizovana skoro isključivo u jedru (Slika 8).





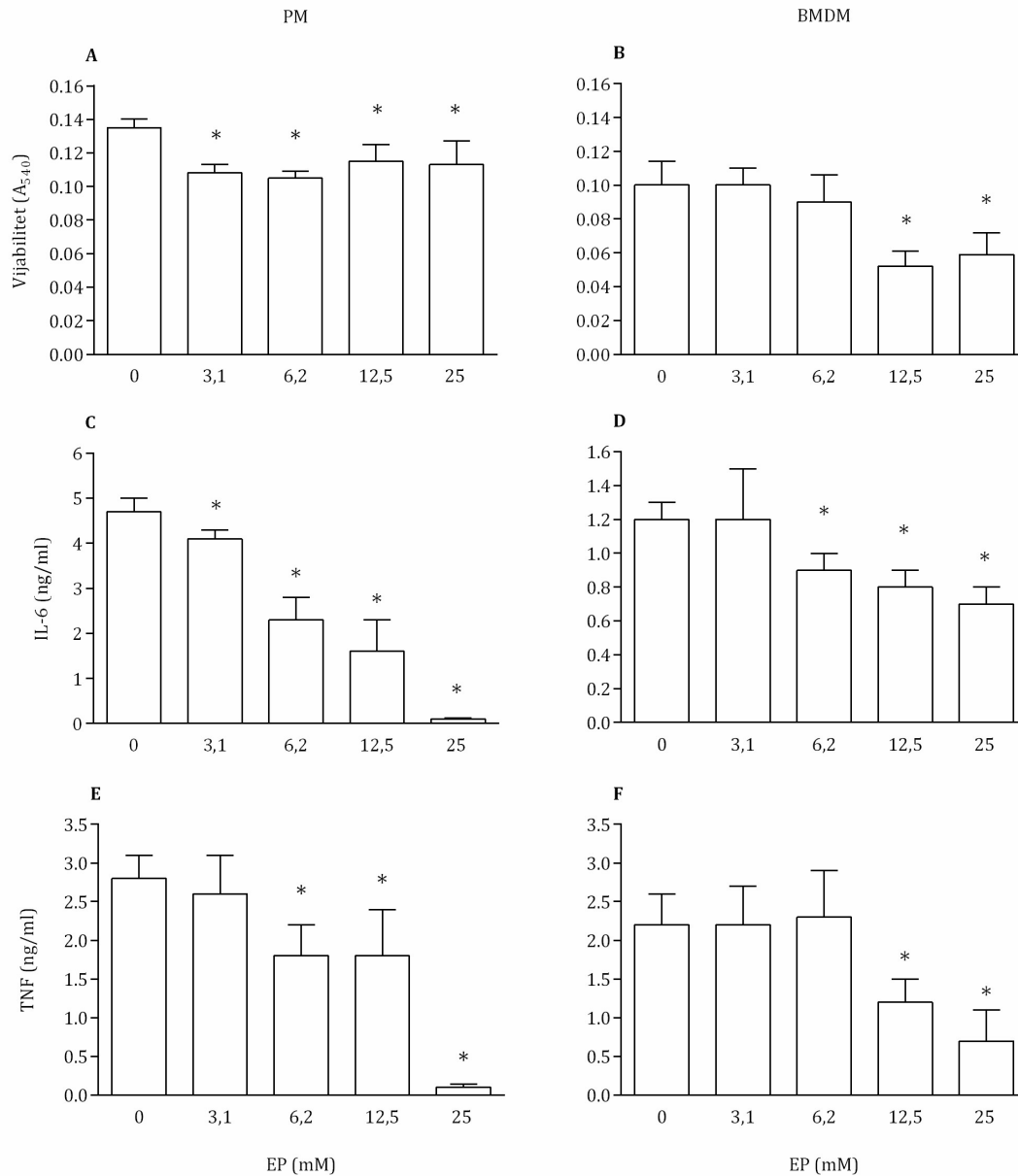
**Slika 8. Efekti EP-a na lokalizaciju HMGB1 u aktiviranim makrofagima, aktiviranoj mikrogliji, astrocitima i neurofilamentima pacova kojima je indukovan EAE.** DA pacovi su imunizovani HKM+CFA-om, 8. d.p.i. otpočet je tretman EP-om (300 mg/kg) ili PBS-om (Ctrl) intraperitonealno jednom dnevno koji je trajao do 12. d.p.i. Kičmene moždine su izolovane na piku bolesti i preseci lumbosakralnog regiona su metodom imunohistohemije obeleženi antitelom specifičnim za HMGB1 (zeleno), kao i za ED1, Iba1 ili GFAP (crveno). (A-H) Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP),

Rezultati su pokazali da tretman EP-om dovodi do inhibicije ekspresije HMGB1 u kičmenoj moždini, kao i da su efekti EP-a, bar delimično, posredovani inhibicijom ekspresije HMGB1 u reaktivnim makrofagima i mikrogliji. Takođe, EP dovodi do promene u ćelijskoj lokalizaciji HMGB1 u ćelijama kičmene moždine.

## **4.2. UTICAJ IN *VITRO* TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA MAKROFAGE DARK AGUTI PACOVA**

### **4.2.1. Imunomodulacijski uticaj etil-piruvata na makrofage diferencirane iz kostne srži i makrofage poreklom iz peritoneuma pacova *in vitro***

U cilju ispitivanja uticaja EP na makrofage *in vitro*, izolovani su makrofagi iz peritoneuma i makrofagi poreklom iz kostne srži zdravih pacova. Ove ćelije su stimulisane LPS-om i tretirane različitim koncentracijama EP-a. Nakon 24h određivan je vijabilitet ćelija metodom kristal violet i produkcija citokina metodom ELISA. Primena EP-a ostvarila je značajni, ali ograničeni negativni efekat na vijabilitet PM-a u svim primenjenim koncentracijama (Grafik 4A). EP je ostvario značajno smanjenje vijabiliteta BMDM samo kad je primenjen u koncentraciji od 12,5 mM i 25 mM (Grafik 4B). EP je takođe ostvario inhibitorski efekat na produkciju proinflamacijskih citokina IL-6 i TNF u PM i BMDM (Grafik 4C-F).



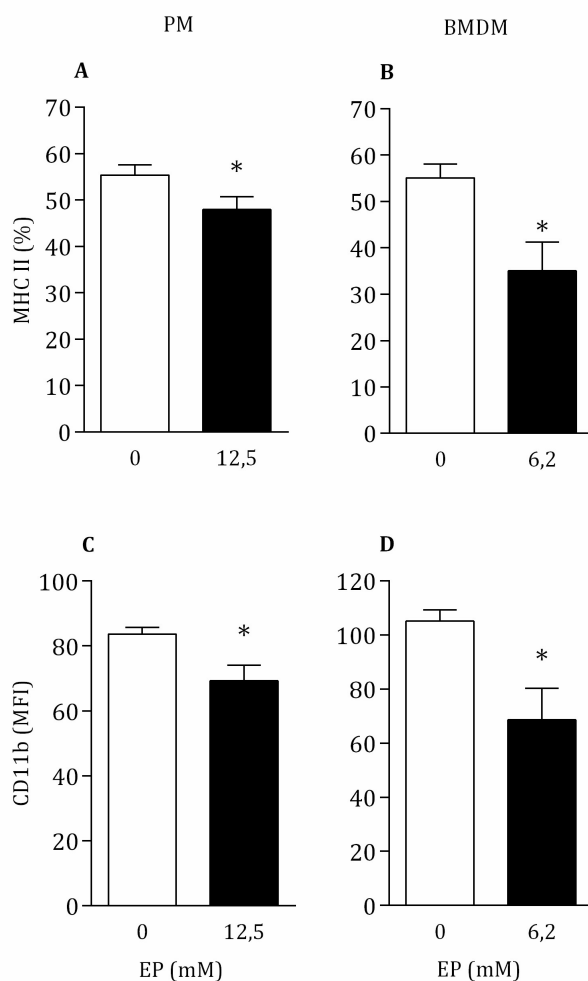
**Grafik 4. Uticaj EP-a na vijabilitet i produkciju citokina u stimulisanim makrofagima pacova.**

PM i BMDM iz zdravih DA pacova su stimulisani LPS-om (100 ng/ml) 24h i tretirani različitim koncentracijama EP-a. Vijabilitet je određivan metodom kristal violet (A-B). Nivo citokina je određivan u supernatantima ćelijskih kultura metodom ELISA (C-F). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  vs. 0, određenu one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), etil-piruvat (EP), peritonealni makrofagi (PM), makrofagi poreklom iz kostne srži (*engl.* Bone Marrow Derived Macrophages - BMDM).

Dakle, EP ostvaruje značajan immunosupresivni efekat na aktivirane makrofage, inhibirajući produkciju proinflamacijskih citokina.

#### 4.2.2. Uticaj etil-piruvata na ekspresiju površinskih molekula makrofaga diferenciranih iz kostne srži i makrofaga poreklom iz peritoneuma pacova *in vitro*

Ispitivan je i uticaj EP-a na ekspresiju površinskih molekula, kao što su marker makrofaga (CD11b) i glavni molekul odgovoran za prezentaciju antigena CD4<sup>+</sup> T-ćelijama (MHC II) u prisustvu LPS-a. EP je značajno smanjio udeo ćelija koje iskazuju MHC II i nivo ekspresije CD11b u PM pri koncentraciji od 12,5 mM (Grafik 5A, C), kao i u BMDM pri koncentraciji od 6,25 mM (Grafik 5B, D).



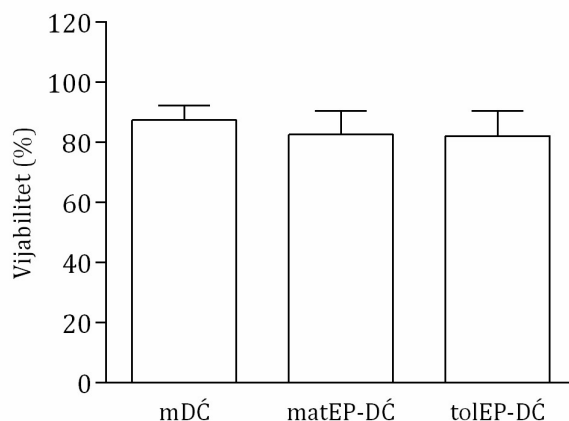
**Grafik 5. Uticaj EP na ekspresiju MHC II i CD11b u stimulisanim makrofagima pacova.** PM (A, C) i BMDM (C, D) iz zdravih DA pacova su stimulisani LPS-om (100 ng/ml) 24h i tretirani različitim koncentracijama EP-a. Procenat ćelija koje ekspimiraju MHC II (A, B) i nivo ekspresije CD11b (C, D) određivani su metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  vs. 0, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Etil-piruvat (EP), peritonealni makrofagi (PM), makrofagi poreklom iz kostne srži (*engl.* Bone Marrow Derived Macrophages - BMDM).

EP smanjuje broj ćelija koje ekspimiraju molekule MHCII, kao i ekspresiju CD11b po ćeliji, što ukazuje da bi mogao uticati na sposobnost makrofaga da izvrše prezentaciju antigena.

### **4.3. UTICAJ IN VITRO TRETMANA ETIL-PIRUVATOM NA MIŠJE DENDRITSKE ĆELIJE**

#### **4.3.1. Uticaj etil-piruvata na vijabilitet dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa**

U sledećim eksperimentima ispitivan je uticaj EP-a na mišje DĆ. DĆ su dobijane iz prekursora prisutnih među ćelijama kostne srži. Ispitivan je uticaj EP-a tokom diferencijacije ćelija (toLEP-DĆ), kao i tokom maturacije ćelija, kada je EP primenjivan simultano sa LPS-om (matEP-DĆ). Vijabilitet ćelija je odredivan bojenjem tripan plavim. Pri koncentraciji od 3.1 mM EP nije uticao na vijabilitet DĆ, bez obzira da li je primenjivan tokom diferencijacije ili tokom maturacije (Grafik 6). Ta koncentracija EP-a je korišćena u narednim eksperimentima.

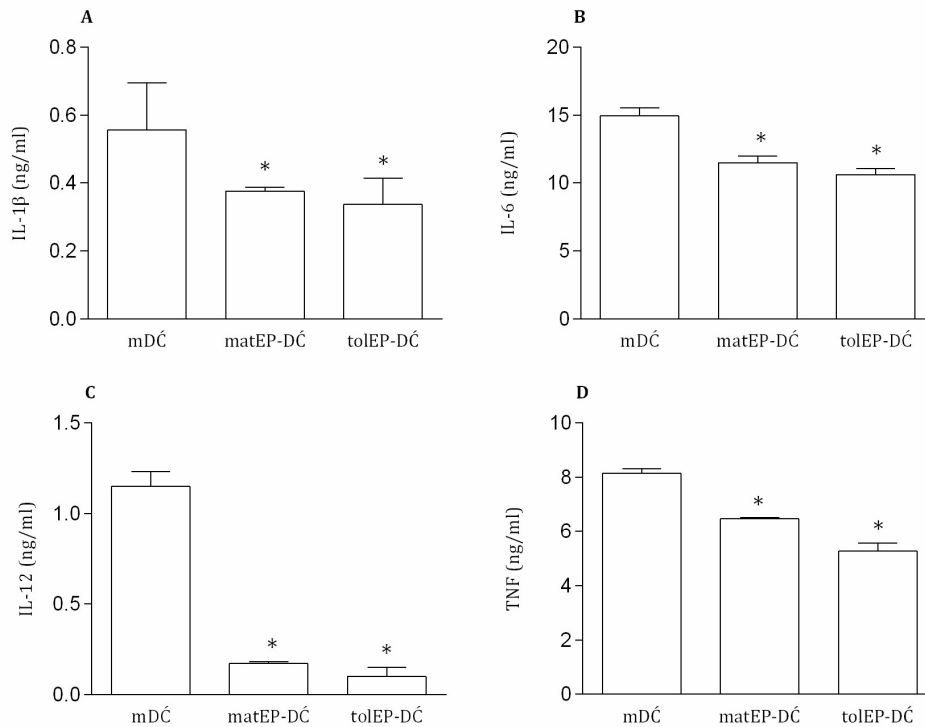


**Grafik 6. Uticaj EP-a na vijabilitet mišjih DC.** DC su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Tretirane su EP-om (3,1 mM) 24h simultano sa LPS-om (100 ng/ml) (matEP-DC), ili 3. i 6. dana tokom diferencijacije (tolEP-DC) ili su bile bez tretmana EP-om (mDC). Vijabilitet je određen bojenjem tripan plavim. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC), DC tretiranih EP-om tokom maturacije (matEP-DC), tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Rezultati pokazuju da EP primenjen u koncentraciji od 3,1 mM ne narušava vijabilitet DC.

#### **4.3.2. Uticaj etil-piruvata na produkciju citokina dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa**

Potom je ispitivan uticaj EP-a na produkciju citokina od strane DC da bi se utvrdio funkcionalni efekat koji EP ostvaruje na DC. Nakon propagacije DC i tretmana EP-om koji je opisan u prethodnom poglavlju, sakupljeni su ćelijski supernatanti i merena je produkcija citokina metodom ELISA. Bez obzira da li je EP primenjivan tokom diferencijacije ili maturacije, ostvarivao je inhibiciju produkcije proinflamacijskih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF i IL-12 (Grafik 7).



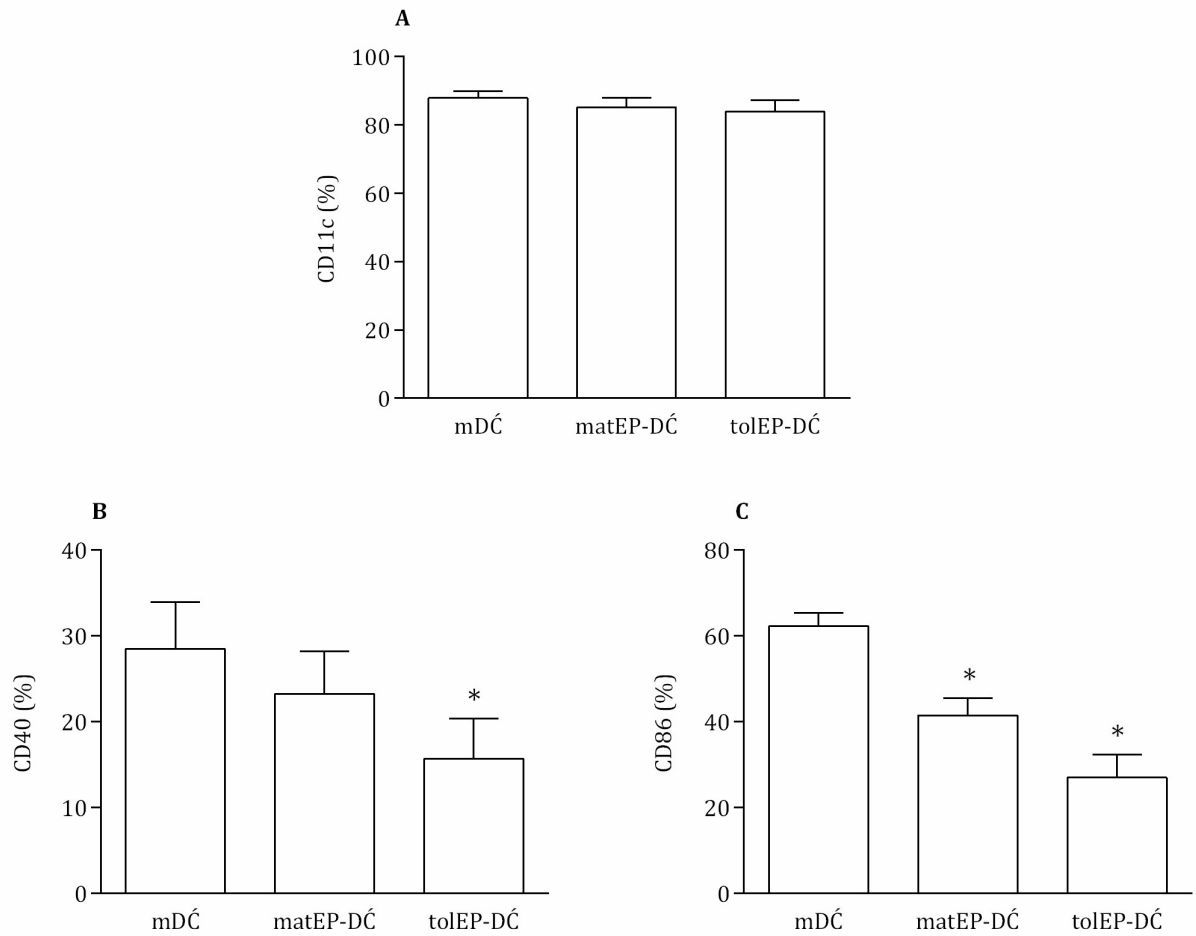
**Grafik 7. Uticaj EP na produkciju citokina od strane mišjih DC.** DC su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Tretirane su EP-om (3.1 mM) 24h simultano sa LPS-om (100 ng/ml) (matEP-DC), ili 3. i 6. dana tokom diferencijacije (tolEP-DC) ili su bile bez tretmana EP-om (mDC). Koncentracija citokina je određivana u supernatantima ćelijskih kultura metodom ELISA (A-D). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  vs. mDC određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Zrele dendritske ćelije (engl. Mature Dendritic Cells - mDC), DC tretiranih EP-om tokom maturacije (matEP-DC), tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Rezultati pokazuju inhibitorski uticaj EP-a na produkciju proinflamacijskih citokina od strane DC.

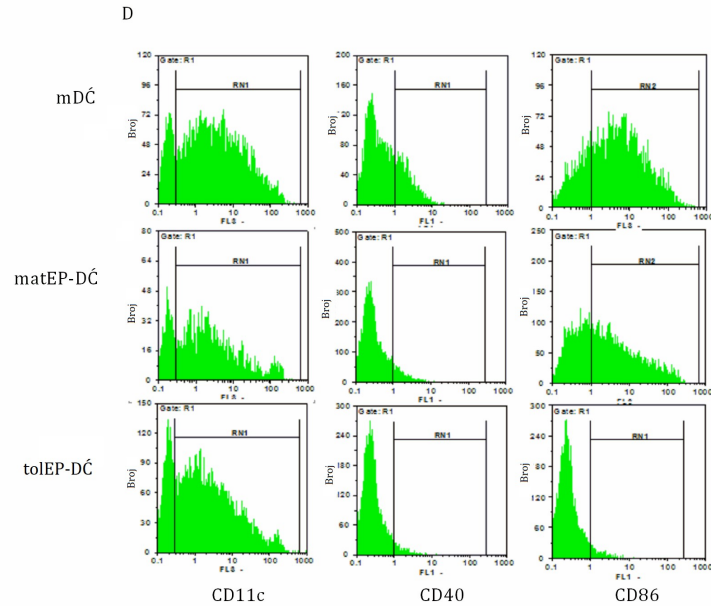
#### 4.3.3. Uticaj etil-piruvata na ekspresiju površinskih molekula dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa

Usledilo je ispitavanje uticaja EP-a na fenotip DC. Nakon propagacije DC i tretmana EP-om i LPS-om, kao što je već prethodno opisano, ispitivana je ekspresija sledećih

površinskih molekula na DĆ: CD11c (marker DĆ), CD40 i CD86 (kostimulatorni molekuli) metodom protočne citofluorimetrije. EP primenjen na bilo koji od dva načina nije uticao na procenat ćelija koje eksprimiraju CD11c (Slika 9A), dok je procenat ćelija koje eksprimiraju kostimulatorne molekule bio značajno snižen u odnosu na mDĆ (Slika 9B, C).





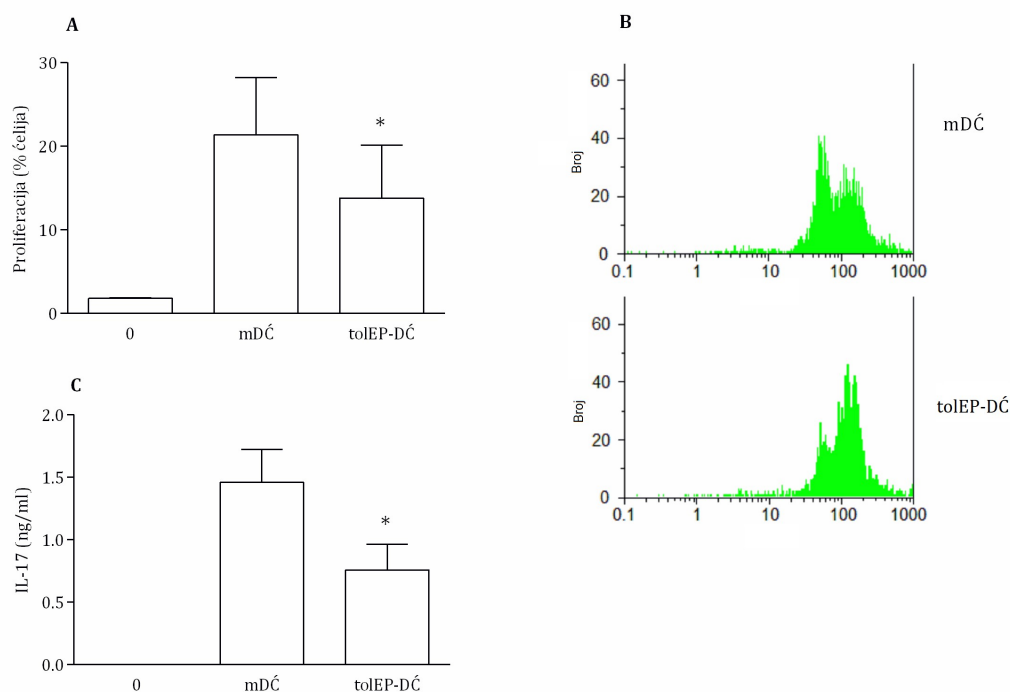


**Slika 9. Uticaj EP na ekspresiju površinskih molekula mišjih DĆ.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Tretirane su EP-om (3.1 mM) 24h simultano sa LPS-om (100 ng/ml) (matEP-DĆ), ili 3. i 6. dana tokom diferencijacije (tolEP-DĆ) ili su bile bez tretmana EP-om (mDĆ). Procenat ćelija koje ekspiriraju površinske molekule od interesa određivan je metodom protočne citofluorimetrije (A-C). Prikazani su reprezentativni histogram plotovi (D). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  vs. mDĆ određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ), DĆ tretiranih EP-om tokom maturacije (matEP-DĆ), tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

Rezultati pokazuju da primena EP-a ne utiče na ekspresiju CD11c na DĆ, a da snižava procenat ćelija koje iskazuju kostimulatorne molekule, što ukazuje da EP na taj način smanjuje mogućnost DĆ da prezentuju antigene.

#### 4.3.4. Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom na aktivaciju CD4<sup>+</sup> T-ćelija *in vitro*

Radi ispitivanja funkcionalnih karakteristika tolEP-DĆ određivana je njihova sposobnost da aktiviraju alogene CD4<sup>+</sup> T-limfocite. Vršena je ko-kultivacija DĆ diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa sa CD4<sup>+</sup> T-limfocitima prečišćenim iz limfnih čvorova BALB/c miševa i obeleženim CFSE-om. Nakon 120h ko-kultivacije metodom protočne citofluorimetrije određivan je nivo proliferacije CD4<sup>+</sup> T-ćelija, dok je njihova sposobnost da produkujaju IL-17 određivana testom ELISA. Nivo proliferacije CD4<sup>+</sup> T-ćelija (Slika 10A, B), kao i produkcija IL-17 (Slika 10C) su bili značajno sniženi kada su one ko-kultivisane sa tolEP-DĆ u odnosu na ko-kultivaciju sa mDĆ.



**Slika 10. Efekat EP-a na aloreaktivni potencijal mišjih DĆ.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Njihovo sazrevanje je indukovano LPS-om (100 ng/ml) u odsustvu (mDĆ) ili prisustvu 3.1 mM EP-a (tolEP-DĆ). Ko-kultivisane su sa CD4<sup>+</sup> T-ćelijama prečišćenim iz limfnih čvorova BALB/c miševa i obeleženim CFSE-om (2 μM). Udeo ćelija koje proliferišu je određivana na osnovu sekvencijalnog gubitka fluorescence CFSE, što je detektovano metodom protočne citofluorimetrije (A). Prikazani su reprezentativni histogram plotovi (B). Nivo IL-17 je određivan u supernatantima ko-kultivisanih ćelija i njegova koncentracija je merena metodom ELISA (C). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD iz tri nezavisna eksperimenta. \*p < 0,05 vs.

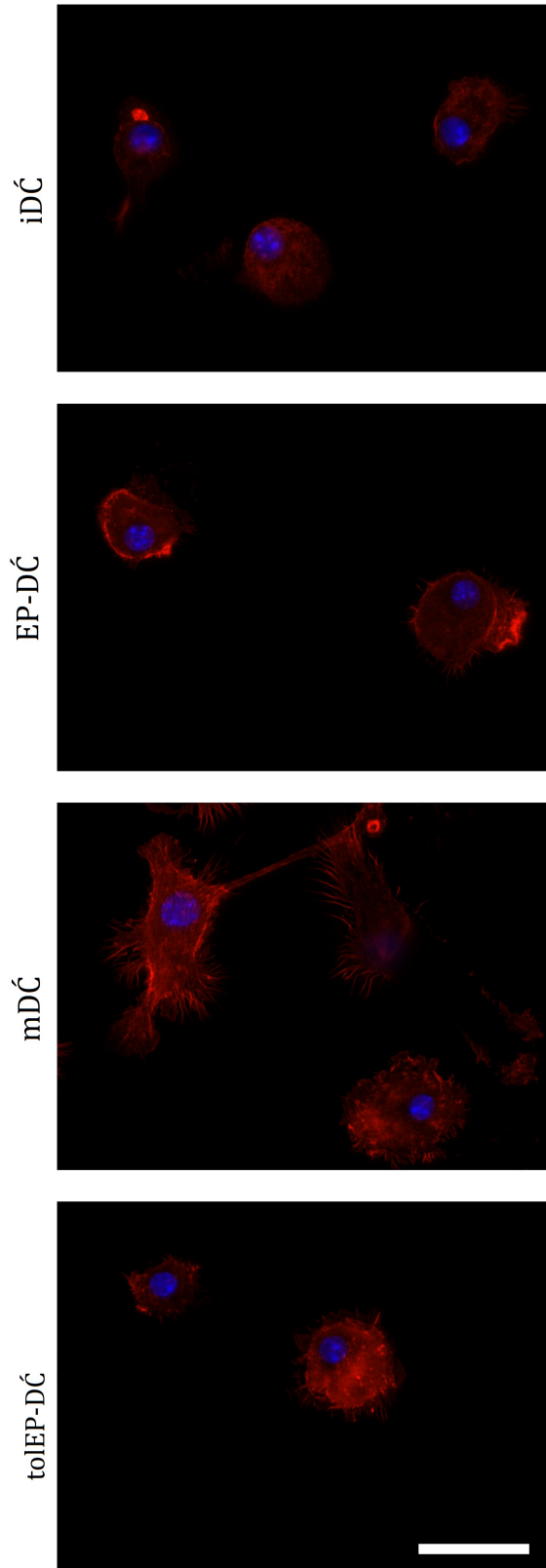
mDC i tolEP-DC određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Zrele dendritske ćelije (engl. Mature Dendritic Cells - mDC) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

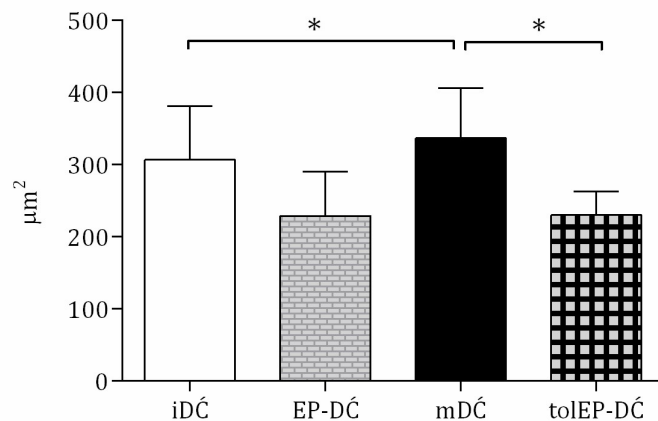
Rezultati ukazuju da su tolEP-DC neefikasni alogeni stimulatori T-limfocita *in vitro*.

#### **4.3.5. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na veličinu i morfologiju dendritskih ćelija diferenciranih iz kostne srži C57BL/6 miševa**

U cilju ispitivanja uticaja EP-a na morfologiju i veličinu DC-a, one su obeležavane faloidinom, peptidom koji specifično boji aktinske filamente i metodom imunocitohemije u iDC, mDC, tolEP-DC i DC-ama tretiranim EP-om u odsustvu LPS-a (označene kao EP-DC) određivana je ekspresija faloidina. Tretman LPS-om trajao je 4h. iDC su se odlikovale malim ćelijskim telom bez nastavaka, dok se nakon stimulacije LPS-om mDC odlikuju zvezdastom strukturom sa izraženim nastavcima. DC tretirane EP-om, bilo EP-DC ili tolEP-DC su imale morfološki slične karakteristike kao iDC (Slika 11). Razlika u veličini ćelija je određena kvantifikacijom (Slika 11).

Aktin



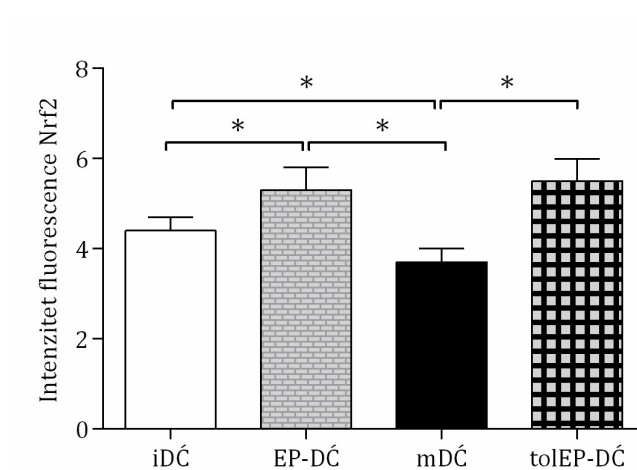
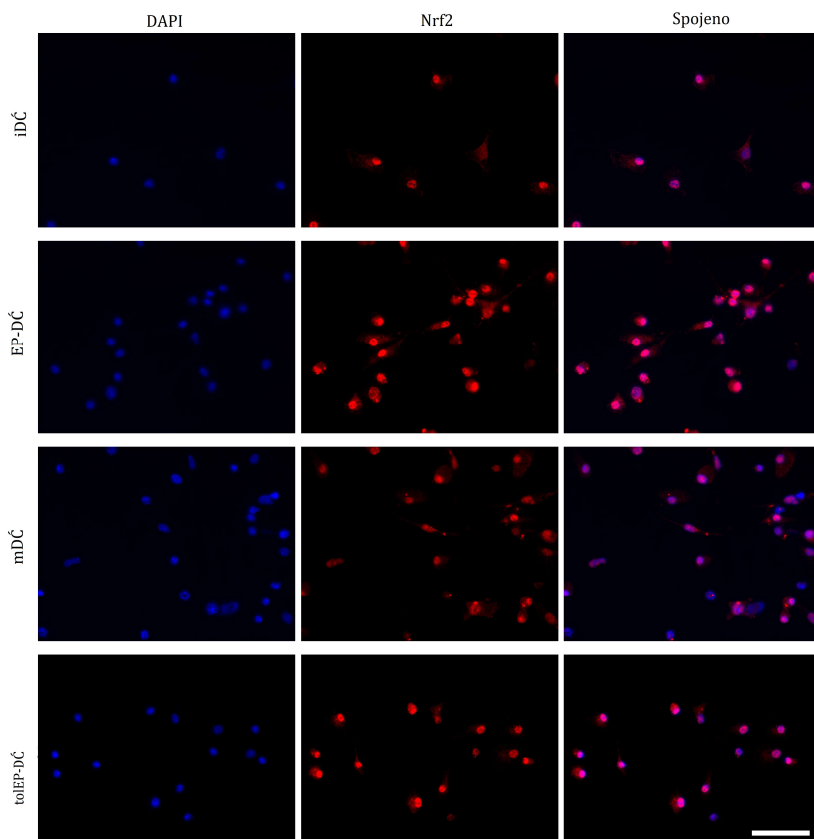


**Slika 11. Efekat EP-a na morfološke karakteristike DĆ-a.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Inkubirane su tokom 4h u prisustvu samog LPS-a (100 ng/ml) (mDĆ), ili u prisustvu 3.1 mM EP-a i LPS-a (tolEP-DĆ), ili samog EP-a (EP-DĆ), ili u odsustvu LPS-a i EP-a (iDĆ). Ćelije su metodom imunocitohemije obeležene antitelom specifičnim za aktinske filamente (crveno) i DAPI bojom za vizuelizaciju jedra (plavo). Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50 µm. Kvantifikacija je izvršena na najmanje 12 ćelija i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SE. \* $p < 0,05$ , određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDĆ), etil-piruvatom tretirane dendritske ćelije u odsustvu LPS-a (EP-DĆ), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

Rezultati ukazuju da su EP-DĆ i tolEP-DĆ značajno manje veličine u odnosu na mDĆ i da su po svojim morfološkim karakteristikama sličnije iDĆ.

#### 4.3.6. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju Nrf2 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa

U cilju ispitivanja mehanizama dejstva EP-a na DĆ-e određivana je ekspresija regulatornog proteina transkripcije Nrf2 metodom imunocitohemije. Odgovarajuće grupe ćelija su tretirane LPS-om tokom 2h. Nivo ekspresije Nrf2 meren u jedrima ćelija je bio niži u mDĆ u odnosu na iDĆ. Primena samog EP-a dovela je do značajnog povećanja ekspresije Nrf2 i u prisustvu i u odsustvu LPS-a. Ovo je potvrđeno i kvantifikacijom (Slika 12).



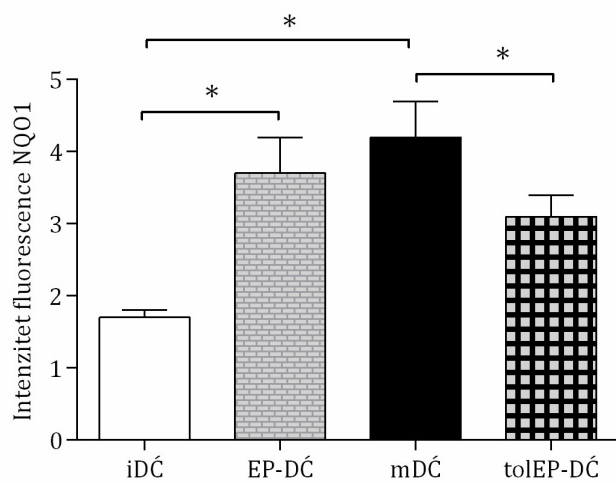
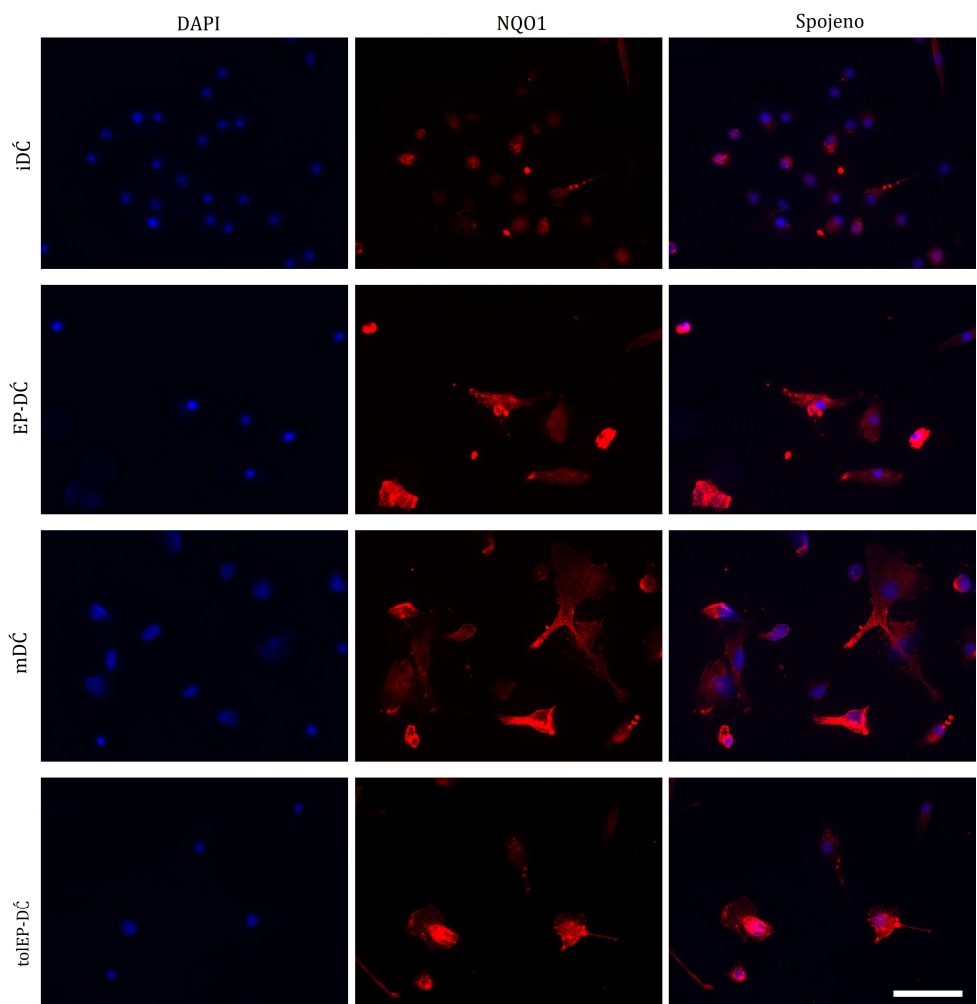
**Slika 12. Efekat EP-a na nivo ekspresije Nrf2 u DC-ma.** DC su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Inkubirane su tokom 2h u prisustvu samog LPS-a (100 ng/ml) (mDC), ili u prisustvu 3.1 mM EP-a i LPS-a (tolEP-DC), ili samog EP-a (EP-DC), ili u odsustvu LPS-a i EP-a (iDC). Ćelije su metodom imunocitohemije obeležene antelom specifičnim za Nrf2 (crveno) i DAPI bojom za vizuelizaciju jedra (plavo). Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kvantifikacija je izvršena na najmanje 103 ćelije i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SE. \* $p < 0,05$  određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDC), etil-piruvatom tretirane

dendritske ćelije u odsustvu LPS-a (EP-DĆ), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

Rezultati ukazuju da tretman EP-om povećava ekspresiju Nrf2 u DĆ-ma, kao i da ima sposobnost održavanja visokog nivoa Nrf2 u DĆ i nakon tretmana LPS-om.

#### **4.3.7. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju NQO1 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa**

Ispitivanje mehanizma dejstva EP-a je nastavljeno određivanjem nivoa ekspresije enzima NQO1 u jedrima DĆ-a metodom imunocitohemije u istim grupama ćelija. Odgovarajuće ćelije su tretirane LPS-om tokom 4h. Tretman samim EP-om ili samim LPS-om dovodi do povećanja ekspresije NQO1 u jedrima DĆ-a u odnosu na iDĆ. Takođe, zapaženo je i značajno smanjenje nivoa ekspresije NQO1 u tolEP-DĆ u odnosu na mDĆ. Istovremeno, nema značajnog smanjenja ekspresije u tolEP-DĆ u odnosu na EP-DĆ. Ovo je potvrđeno i kvantifikacijom (Slika 13).



**Slika 13. Efekat EP-a na nivo ekspresije NQO1 u DC-ma.** DC su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Inkubirane su tokom 4h u prisustvu samog LPS-a (100 ng/ml) (mDC), ili u prisustvu 3.1 mM EP-a i LPS-a (toIEP-DC), ili samog EP-a (EP-DC), ili u odsustvu LPS-a i EP-a (iDC). Ćelije su metodom imunocitohemije obeležene antitelom specifičnim za NQO1

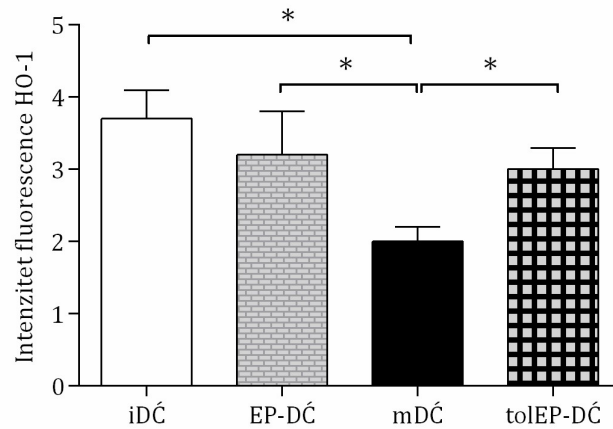
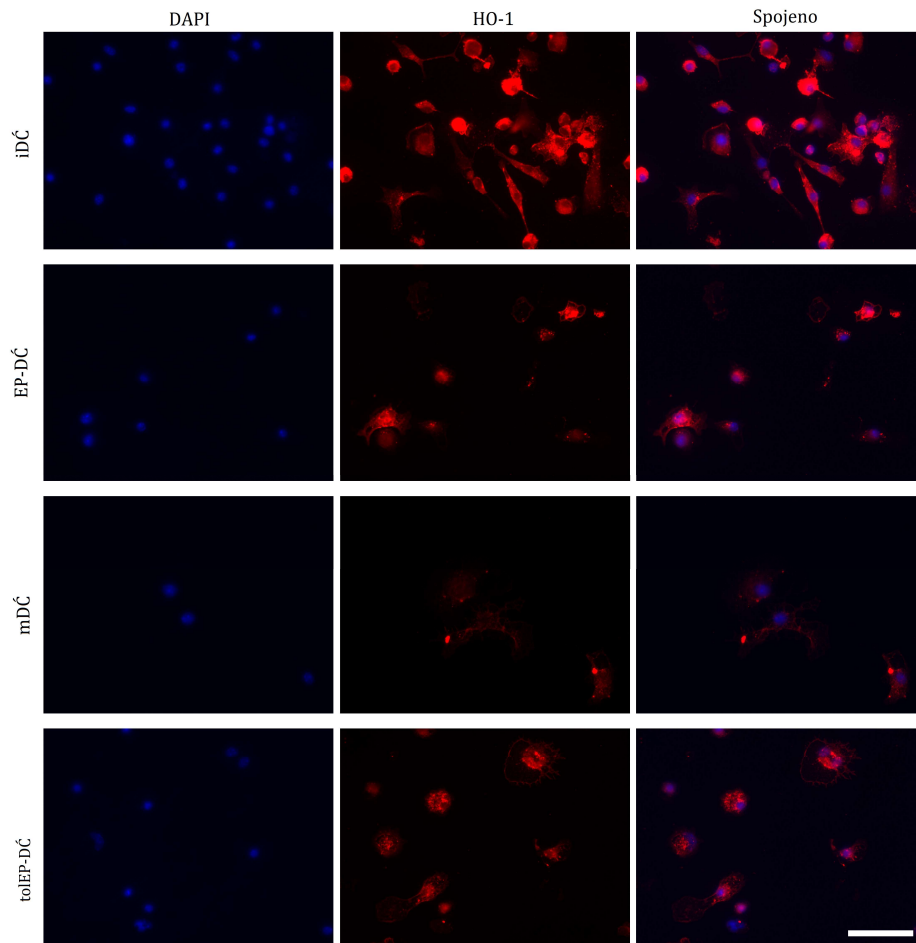


(crveno) i DAPI bojom za vizuelizaciju jedra (plavo). Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu\text{m}$ . Kvantifikacija je izvršena na najmanje 48 ćelija i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SE. \* $p < 0,05$ , određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDĆ), etil-piruvatom tretirane dendritske ćelije u odsustvu LPS-a (EP-DĆ), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

Rezultati ukazuju da prisustvo samog EP-a povećava ekspresiju NQO1 u DĆ-ama koja opada u tolEP-DĆ u odnosu na mDĆ, ali i dalje ostaje na visokom nivou u odnosu na iDĆ.

#### **4.3.8. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju HO-1 u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa**

Potom je određivan efekat EP-a na ekspresiju enzima HO-1 u jedrima DĆ-a metodom imunocitohemije, gde su iste grupe ćelija kao i u prethodnim eksperimentima tretirane LPS-om 4h. Nivo ekspresije HO-1 nije bio značajno različit u iDĆ i EP-DĆ. Sam LPS doveo je do izrazitog, statistički značajnog smanjenja ekspresije u jedrima mDĆ, dok su tolEP-DĆ imale očuvan nivo ekspresije ovog enzima u jedru. Ovo je potvrđeno i kvantifikacijom (Slika 14).



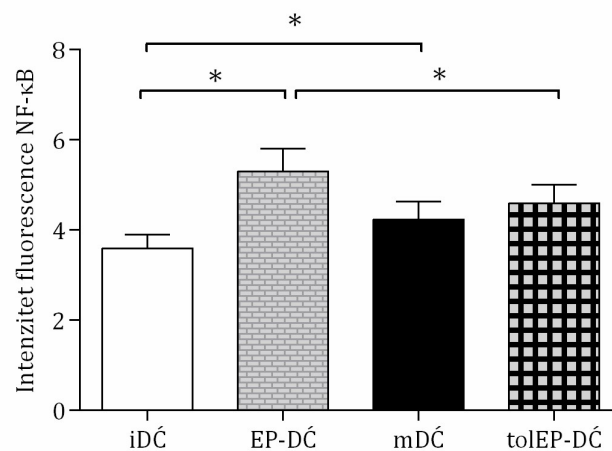
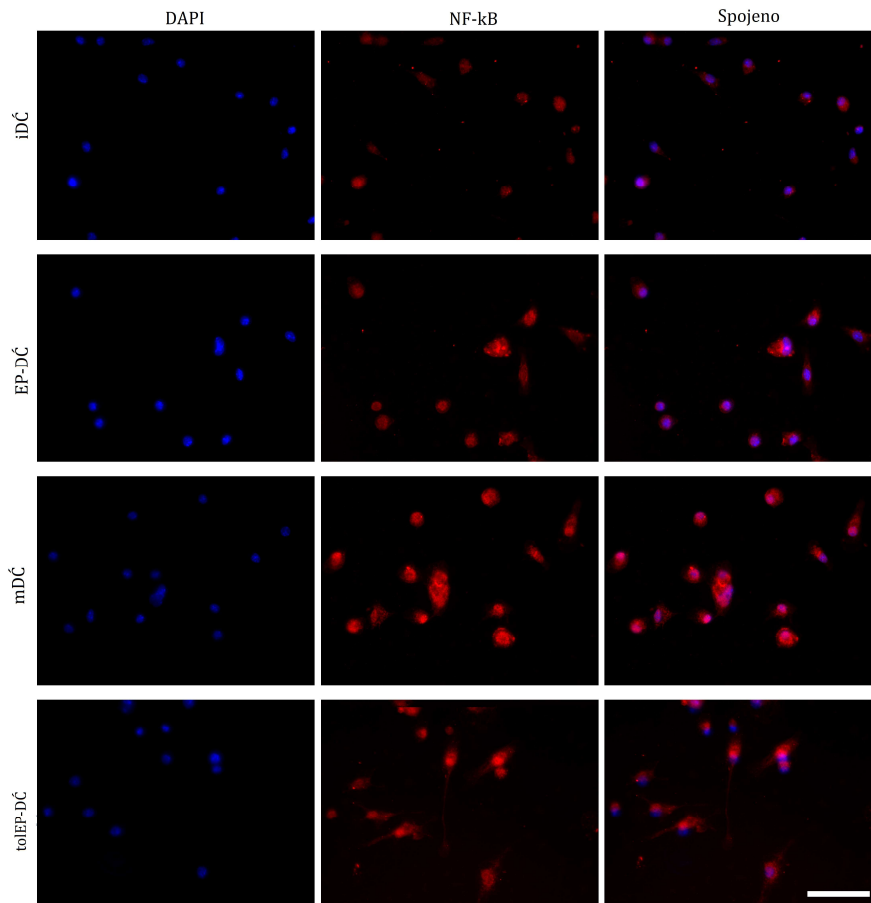
**Slika 14. Efekat EP-a na nivo ekspresije HO-1 u DĀ-ma.** DĀ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Inkubirane su tokom 4h u prisustvu samog LPS-a (100 ng/ml) (mDĀ), ili u prisustvu 3.1 mM EP-a i LPS-a (toEP-DĀ), ili samog EP-a (EP-DĀ), ili u odsustvu LPS-a i EP-a (iDĀ). Āelije su metodom imunocitohemije obeležene antitelom specifiĀnim za HO-1

(crveno) i DAPI bojom za vizuelizaciju jedra (plavo). Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu\text{m}$ . Kvantifikacija je izvršena na najmanje 29 ćelija i rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SE. \* $p < 0,05$ , određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDC), etil-piruvatom tretirane dendritske ćelije u odsustvu LPS-a (EP-DC), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Ovi rezultati jasno ukazuju da DC tretirane EP-om imaju visok nivo ekspresije enzima HO-1 koji se održava uprkos primeni jakog inflamacijskog stimulusa, kakav je LPS.

#### **4.3.9. Ispitivanje uticaja etil-piruvata na ekspresiju NF- $\kappa$ B u dendritskim ćelijama diferenciranim iz kostne srži C57BL/6 miševa**

U istoj eksperimentalnoj postavci ispitivan je nivo ekspresije regulatornog proteina transkripcije NF $\kappa$ B u jedrima DC-a. Tretman odgovarajućih grupa ćelija LPS-om je trajao 15 min. Ekspresija NF $\kappa$ B je značajno rasla u mDC u odnosu na iDC. Tretman nezrelih ćelija EP-om dovodio je do izrazitog povećanja ekspresije NF- $\kappa$ B. Međutim, kada su EP-om tretirane DC izložene LPS-u, dolazilo je do značajnog smanjenja prisustva NF- $\kappa$ B u jedrima tolEP-DC. Takođe, kod tolEP-DC je bila uočljiva translokacija NF- $\kappa$ B iz jedra u citoplazmu. Ovo je potvrđeno i kvantifikacijom (Slika 15).



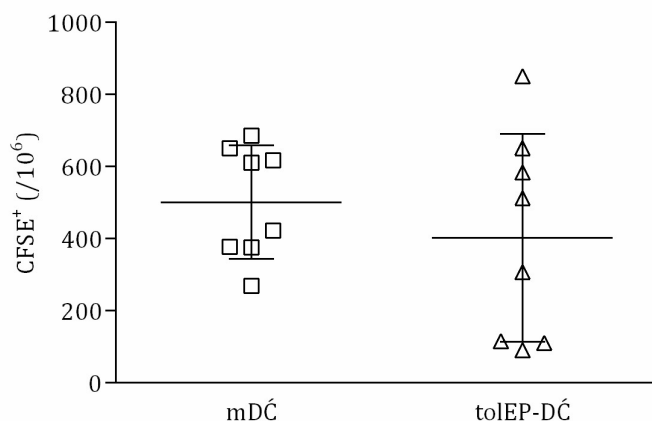
**Slika 15. Efekat EP-a na nivo ekspresije NF- $\kappa$ B u DĆ-ma.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Inkubirane su tokom 15 min u prisustvu samog LPS-a (100 ng/ml) (mDĆ), ili u prisustvu 3,1 mM EP-a i LPS-a (toEP-DĆ), ili samog EP-a (EP-DĆ), ili u odsustvu LPS-a i EP-a (iDĆ). Ćelije su metodom imunocitohemije obeležene antitelom specifičnim za NF- $\kappa$ B (crveno) i DAPI bojom za vizuelizaciju jedra (plavo). Prikazane su reprezentativne mikrografije. Dužina skale je 50  $\mu$ m. Kvantifikacija je izvršena na najmanje 110 ćelija i rezultati su prikazani kao

srednja vrednost + SE. \* $p < 0,05$ , određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDĆ), etil-piruvatom tretirane dendritske ćelije u odsustvu LPS-a (EP-DĆ), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (toIEP-DĆ).

Rezultati ukazuju da ćelije tretirane EP-om imaju bazično relativno visok nivo ekspresije regulatornog proteina NF- $\kappa$ B u jedrima, ali da ta ekspresija opada nakon tretmana LPS-om. Takođe, za ćelije tretirane EP-om karakteristično je povećano prisustvo NF- $\kappa$ B u citoplazmi.

#### 4.3.10. Ispitivanje migracije mišjih dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom *in vivo*

U svrhu praćenja migracije DĆ *in vivo*, mDĆ i toIEP-DĆ su obeležene CFSE-om i ubrizgane u zadnju šapu miševa. Narednog dana vršena je imunizacija CFA-om u istu šapu. Nakon tri dana su izolovani drenirajući (poplitealni) limfni čvorovi. Metodom protočne citofluorimetrije detektovane su CFSE<sup>+</sup> ćelije među ćelijama poplitealnog limfnog čvora. Analiza ćelija poplitealnog limfnog čvora pokazala je prisustvo mDĆ i toIEP-DĆ obeleženih CFSE-om u drenirajućim limfnim čvorovima (Grafik 8).



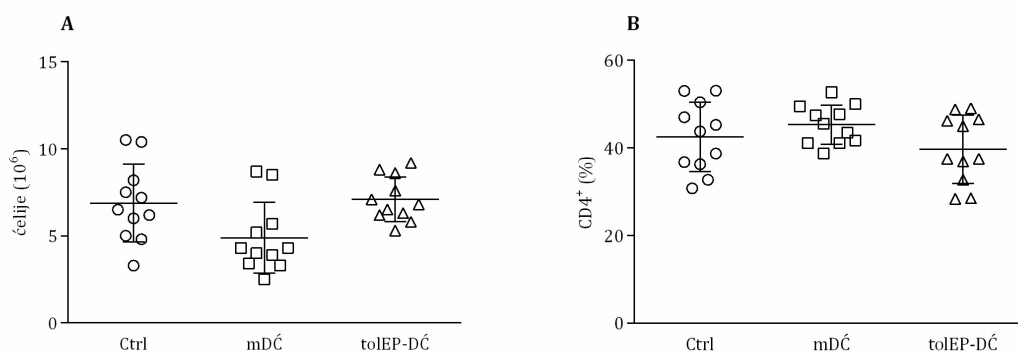
**Grafik 8. Ispitivanje migratorne sposobnosti mišjih DĆ.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Njihovo sazrevanje je indukovano LPS-om u odsustvu (mDĆ) ili prisustvu 3,1 mM EP-a (toIEP-DĆ). Neposredno pre ubrizgavanja u miševе, DĆ su obeležene CFSE-om. Nakon 24h usledila je imunizacija životinja CFA-om + PBS-om u zadnju desnu šapu, a nakon 96h

izolovane su ćelije odgovarajućeg poplitealnog limfnog čvora i protočnom citofluotimetrijom je potvrđeno prisustvo CFSE<sup>+</sup> ćelija. Broj CFSE<sup>+</sup> ćelija detektovan u 1x10<sup>6</sup> ćelija poplitealnog limfnog čvora je prikazan na grafiku. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD iz tri nezavisna eksperimenta, broj miševa uključenih u eksperiment odgovara broju grafičkih simbola na slici. Korišćen je Studentov t-test. Zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

Rezultati ukazuju da su tolEP-DĆ, kao i mDĆ sposobne da migriraju u limfni čvor koji drenira mesto imunizacije.

#### 4.3.11. Ispitivanje efekata dendritskih ćelija na imunski odgovor izazvan CFA-om kod C57BL/6 miševa *in vivo*

Usledilo je ispitivanje da li tolEP-DĆ ostvaruju efekat na imunski odgovor *in vivo*. Miševi su podeljeni u tri grupe, jednoj su ubrizgane mDĆ, drugoj tolEP-DĆ, a trećoj kontrolnoj grupi je ubrizgan fiziološki rastvor. Nakon 24h životinje su imunizovane CFA-om. Nakon tri dana su izolovane ćelije poplitealnog limfnog čvora i određivana je njihova brojnost. Analiziran je i udeo CD4<sup>+</sup> T-ćelija među njima, metodom protočne citofluorimetrije. Nije postojala statistički značajna razlika u ukupnom broju ćelija poplitealnog limfnog čvora (Grafik 9A), kao ni u udelu CD4<sup>+</sup> T-ćelija među njima (Grafik 9B) između bilo koje od ispitivanih grupa.



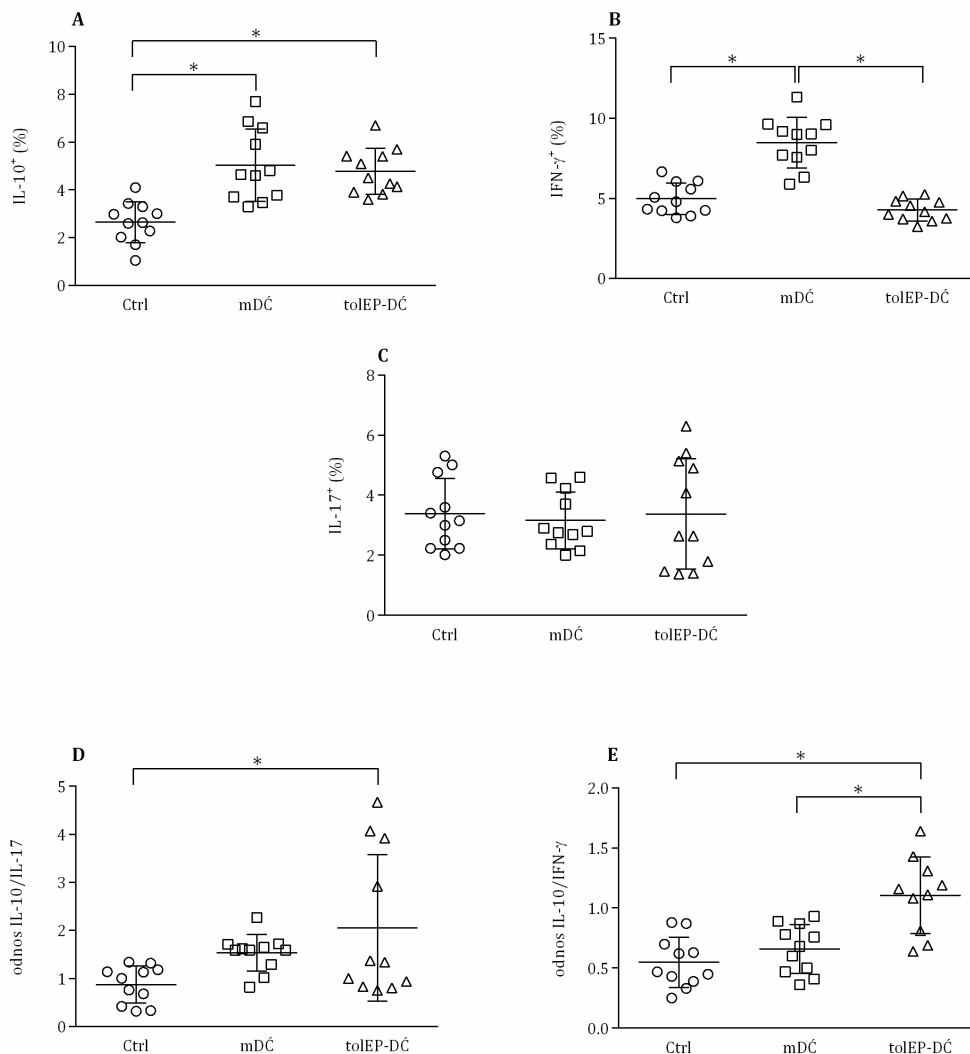
**Grafik 9. Ispitivanje celularnosti CD4<sup>+</sup> T-ćelija u poplitealnom limfnom čvoru nakon tretmana miševa DĆ-ama.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Njihovo sazrevanje je indukovano LPS-om u odsustvu (mDĆ) ili prisustvu 3,1 mM EP-a (tolEP-DĆ). Neposredno pre ubrizgavanja DĆ u miševe, one su obeležene CFSE-om. Kontrolna grupa miševa je tretirana fiziološkim rastvorom (Ctrl). Nakon 24h usledila je imunizacija životinja CFA-om + PBS-om

u zadnju šapu, a nakon 96h izolovane su ćelije poplitealnog limfnog čvora i protočnom citofluorimetrijom je utvrđen ukupan broj ćelija (A) kao i broj CD4<sup>+</sup> T-ćelija među ćelijama limfnog čvora (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD iz tri nezavisna eksperimenta, broj miševa uključenih u eksperiment odgovara broju grafičkih simbola na slici. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Kontrola (Ctrl), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Rezultati ukazuju da tretman DC-ma ne dovodi do promene u brojnosti ćelija poplitealnog limfnog čvora, niti udela CD4<sup>+</sup> T-ćelija u poplitealnom limfnom čvoru.

#### **4.3.12. Ispitivanje efekta dendritskih ćelija na udeo CD4<sup>+</sup> T-limfocita u poplitealnom limfnom čvoru koji proizvode IL-10, IL-17 i IFN- $\gamma$**

Utvrđivan je procenat CD4<sup>+</sup> T-ćelija poplitealnog limfnog čvora koje proizvode IL-10, IFN- $\gamma$  i IL-17. Uočeno je više IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelija kod miševa koji su primili tolEP-DC u odnosu na kontrolne miševе (Grafik 10A). Zatim, manja je bila zastupljenost IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelija kod miševa koji su tretirani tolEP-DC-ama u odnosu na miševе koji su tretirani mDC-ma (Slika 24B). Takođe, IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelije i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> su bile brojnije kod miševa tretiranih mDC-ma u poređenju sa kontrolnim životinjama. Nije uočena razlika u zastupljenosti IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelija između grupa (Grafik 10C). Važno je napomenuti da je odnos IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> prema IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelijama, kao i prema IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelijama bio veći u poplitealnim limfnim čvorovima miševa koji su tretirani tolEP-DC-ma u poređenju sa kontrolnim životinjama. Odnos IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelija prema IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ćelijama je bio veći u poplitealnim limfnim čvorovima miševa koji su tretirani tolEP-DC-ama u poređenju sa onima koji su tretirani mDC-ama (Grafik 10D, E).



**Grafik 10. Efekat tretmana DĆ-ma na procenat IL-10, IL-17 i IFN- $\gamma$  produkujućih ćelija u poplitealnom limfnom čvoru nakon imunizacije.** DĆ su diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Njihovo sazrevanje je indukovano LPS-om u odsustvu (mDĆ) ili prisustvu 3,1 mM EP-a (tolEP-DĆ). Neposredno pre ubrizgavanja u miševе DĆ su obeležene CFSE-om. Kontrolna grupa miševa je tretirana fiziološkim rastvorom (Ctrl). Nakon 24h usledila je imunizacija životinja CFA-om i PBS-om u zadnju šapu. Nakon 96h izolovane su ćelije poplitealnog limfnog čvora i protočnom citofluotimetrijom je analiziran udeo ćelija koje proizvode IL-10 (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-17 (C) među CD4<sup>+</sup> T-ćelijama, kao i odnos proporcija ćelija koje proizvode navedene citokine (D, E). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD iz tri nezavisna eksperimenta, broj miševa uključenih u eksperiment odgovara broju grafičkih simbola na slici. \* $p < 0,05$ , određeno one-way ANOVA testom praćenim Tukey testom predstavlja statističku značajnost. Kontrola (Ctrl), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DĆ).

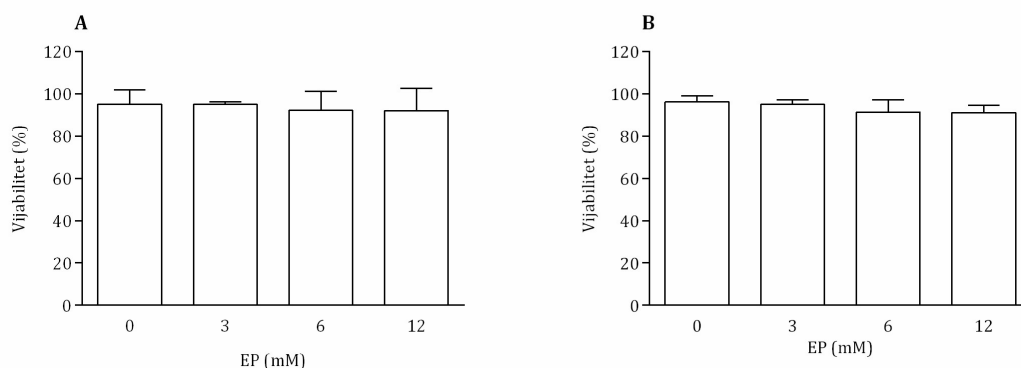


Rezultati ukazuju da toLEP-DĆ primenjene *in vivo* ostvaruju imunomodulacijske efekte na ćelije poplitealnog limfnog čvora povećavajući produkciju antiinflamacijskog citokina IL-10, i smanjujući produkciju proinflamacijskog citokina IFN- $\gamma$ .

#### 4.4. TOLEROGENI POTENCIJAL ETIL-PIRUVATA *IN VITRO* NA DENDRITSKE ĆELIJE LJUDI

##### 4.4.1. Uticaj etil-piruvata na vijabilitet dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze

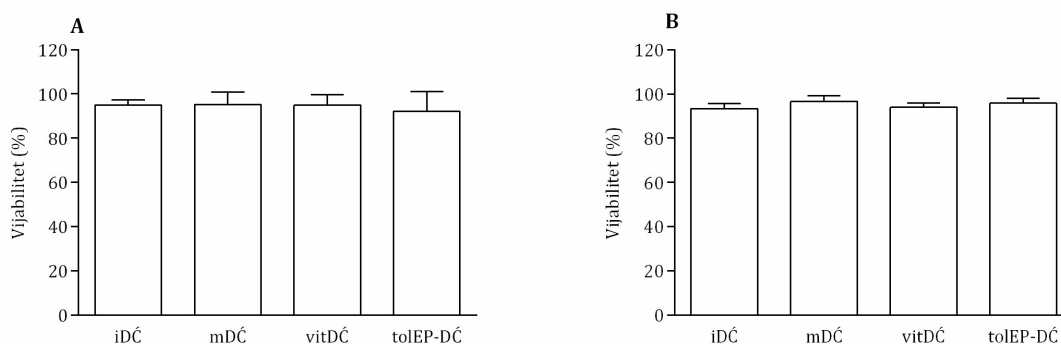
U narednim eksperimentima ispitivan je uticaj EP-a na MoDĆ. Prvo je ispitivan njegov efekat na vijabilitet DĆ. DĆ su diferencirane iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od MS-e. Tokom diferencijacije ćelije su bile netretirane (iDĆ), tretirane samo koktelom citokina za sazrevanje (mDĆ), ili tretirane koktelom citokina za sazrevanje i EP-om u raznim koncentracijama (3,1 mM, 6,2 mM i 12,5 mM) ili koktelom citokina za sazrevanje i 1,25 dihidroksi vitaminom D3 (1 nM) tokom diferencijacije. Vijabilitet ćelija je određivan obeležavanjem ćelija Aneksin-om V i 7AAD i analiziran protočnom citofluorimetrijom. EP nije uticao na vijabilitet DĆ diferenciranih iz dobrovoljnih davalaca krvi (Grafik 11A) kao ni onih iz pacijenata (Grafik 11B) čak ni pri najvećoj primenjenoj koncentraciji od 12,5 mM.



**Grafik 11. Efekat EP-a na vijabilitet MoDĆ.** DĆ su diferencirane iz monocita periferne krvi ljudi. Njihovo sazrevanje je indukovano koktelom citokina (TNF, IL1 $\beta$  i PGE2), tretman EP-om u različitim koncentracijama je primenjivan 2. i 4. dana. Dobrovoljni davaoci krvi (A); Pacijenti (B). Vijabilitet je određivan obeležavanjem ćelija Aneksin-om V i 7AAD i analiziran protočnom citofluorimetrijom.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD od najmanje pet pojedinaca. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Etil-piruvat (EP).

Potom, upoređivan je vijabilitet toIEP-DĆ, vitDĆ, iDĆ i mDĆ i nije uočena razlika između njih. Vijabilitet DĆ nije smanjen ni jednim tretmanom ni kod dobrovoljnih davalaca krvi (Grafik 12A), ni kod pacijenata (Grafik 12B).

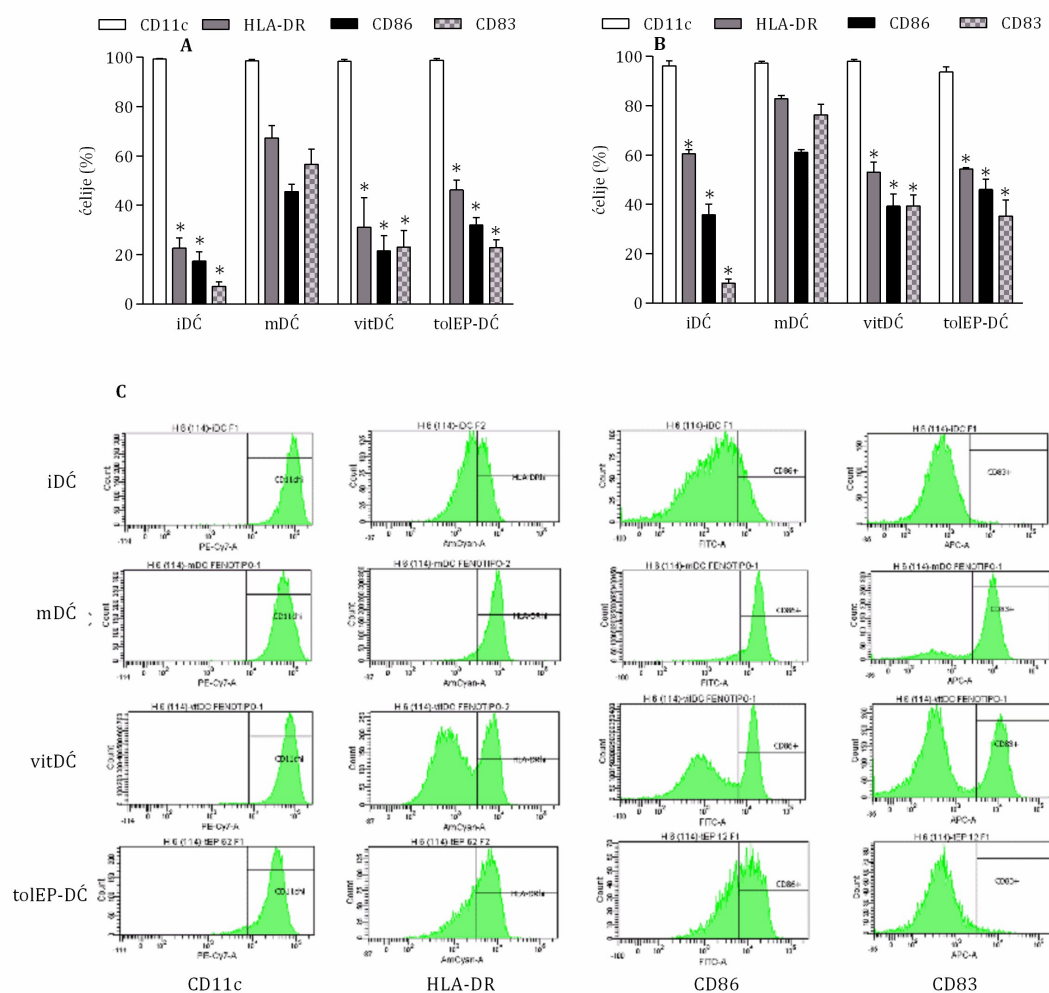


**Grafik 12. Efekat EP-a i 1,25 dihidroksi vitamina D3 na vijabilitet MoDĆ.** DĆ su diferencirane iz monocita periferne krvi ljudi. Njihovo sazrevanje je indukovano koktelom citokina (TNF, IL1 $\beta$  i PGE2) (mDĆ), u prisustvu EP-a (6,2 mM, 2. i 4. dana) (toIEP-DĆ), ili prisustvu 1,25-dihidroksi vitamina D3 (1 nM, 0. i 4. dana) (vitDĆ), ili nisu bile pod uticajem koktela ni tretmana (iDĆ). Dobrovoljni davaoci krvi (A); Pacijenti (B). Vijabilitet je određivan obeležavanjem ćelija Aneksin-om V i 7AAD i analiziran na protočnoj citofluorimetriji. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD od najmanje pet pojedinaca. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Ne zrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDĆ), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDĆ), 1,25-dihidroksi vitaminom D3 tretirane dendritske ćelije (vitDĆ) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (toIEP-DĆ).

Rezultati jasno ukazuju da EP primenjen čak i u visokim koncentracijama ne menja vijabilitet DĆ.

#### 4.4.2. Uporedna analiza efekata etil-piruvata i 1,25-dihidroksi vitamina D3 na ekspresiju površinskih molekula dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze

U cilju ispitivanja uticaja EP-a na fenotip ljudskih DC propagiranih iz dobrovoljnih davalaca krvi i pacijenata, nakon diferencijacije ćelija kako je prethodno opisano u materijalima i metodama, analizirana je ekspresija sledećih površinskih molekula: CD11c, HLA-DR, CD86 i CD83 metodom protočne citofluorimetrije. Nije uočena razlika u ekspresiji CD11c među ispitivanim DC, ni kod zdravih osoba (Slika 16A,C) ni kod pacijenata (Slika 16B,C). Međutim, kod tolEP-DC i vitDC ekspresija HLA-DR, CD86 i CD83 je bila snižena značajno u poređenju sa mDC. Taj uticaj je zapažen kako kod dobrovoljnih davalaca krvi, tako i kod pacijenata.

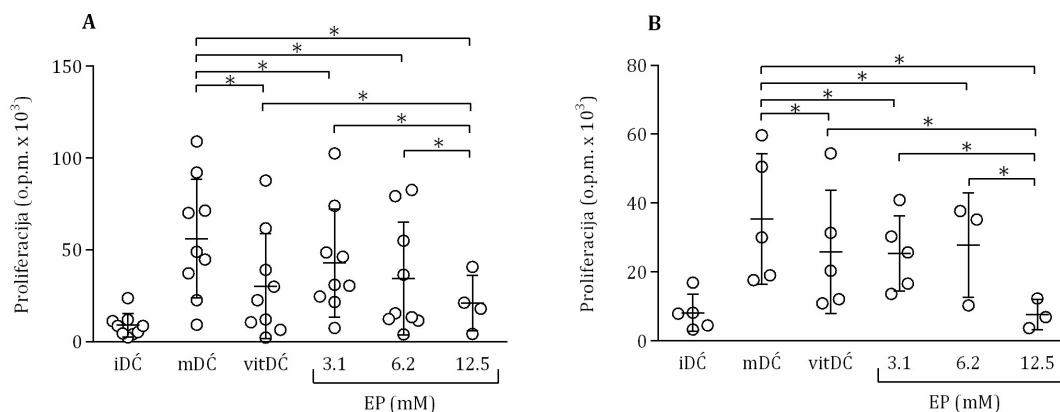


**Slika 16. Uticaj EP na ekspresiju površinskih molekula MoDC.** DC su diferencirane iz monocita periferne krvi ljudi. Njihovo sazrevanje je indukovano koktelom citokina (TNF, IL1 $\beta$  i PGE2) (mDC), u prisustvu EP-a (6,2 mM, 2. i 4. dana) (tolEP-DC), ili prisustvu 1,25 dihidroksi vitamina D3 (1 nM, 0. i 4. dana) (vitDC), ili nisu bile pod uticajem koktela ni tretmana (iDC). Dobrovoljni davaoci krvi (A); Pacijenti (B). Procenat ćelija koje ekspresiraju površinske molekule od interesa određivan je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD od najmanje pet pojedinaca. C) Prikazani su reprezentativni histogram plotovi. \*p < 0,05 vs. mDC, određeno Studentovim t-testom, predstavlja statističku značajnost. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDC), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC), 1,25-dihidroksi vitaminom D3 tretirane dendritske ćelije (vitDC) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Ovi rezultati jasno ukazuju da EP ne utiče na ekspresiju CD11c na DC, dok inhibira ekspresiju kostimulatornih molekula i HLA-DR molekula koji imaju ulogu u prezentaciji antigena T-ćelijama. Efekti EP-a su po intenzitetu slični onima koje na DC ostvaruje 1,25 dihidroksi vitamin D3.

#### **4.4.3. Uperedna analiza uticaja ljudskih dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom ili 1,25 dihidroksi vitaminom D3 na aktivaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi *in vitro***

Sledeći eksperimenti su rađeni sa ciljem da se ispita da li DC tretirane EP-om efikasno indukuju alogenu proliferaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi. U tu svrhu, različite populacije DC (iDC, mDC, vitDC i tolEP-DC) su ko-kultivisane sa PBMC koje su izolovane iz krvi alogernih pojedinaca. Nakon 96h, sakupljeni su ćelijski supernatanti za merenje produkcije citokina metodom ELISA, dok je intenzitet proliferacije PBMC određivan na osnovu ugradnje 1  $\mu$ Ci timidina u ćelije tokom narednih 18h, kao broj otkucaja po minuti detektovan beta brojačem. PBMC su imale manju proliferaciju kada su kultivisane sa tolEP-DC, u poređenju sa onim kultivisanim sa mDC, nezavisno od primenjene koncentracije EP-a. Koncentracija od 6,2 mM EP-a je inhibirala proliferaciju ćelija u sličnoj meri kao i vitamin D. Međutim, kada se uporedi najveća primenjena doza EP-a od 12,5 mM, značajno je inhibirana proliferacija ne samo u poređenju sa mDC već i u poređenju sa vitDC (Grafik 13). Isti rezultati su dobijeni sa DC dobijenim od zdravih osoba i pacijenata.

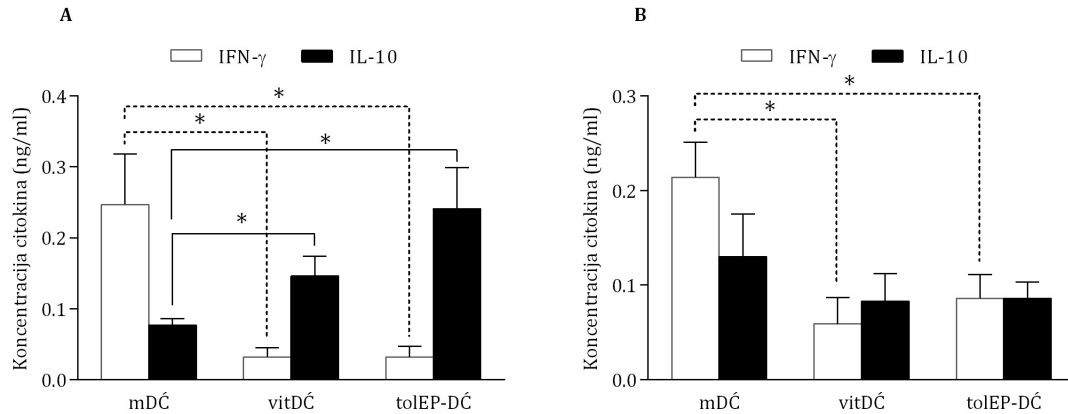


**Grafik 13. Efekat MoDC tretiranih EP-om na alogenu aktivnost PBMC.** DC su diferencirane iz monocita periferne krvi ljudi. Njihovo sazrevanje je indukovano koktelom citokina (TNF, IL1 $\beta$  i PGE2) (mDC), u prisustvu EP-a (tretman EP-om u različitim koncentracijama je primenjivan 2. i 4. dana) (tolEP-DC), ili prisustvu 1,25 dihidroksi vitamina D3 (1 nM, 0. i 4. dana) (vitDC), ili nisu bile ni pod uticajem koktela ni tretmana (iDC). PBMC su izolovane iz krvi dobrovoljaca. Dobrovoljni davaoci krvi (A); Pacijenti (B). Intenzitet proliferacije je određivan na osnovu ugradnje 1  $\mu$ Ci timidina u ćelije tokom poslednjih 18h petodnevne kultivacije, kao broj otkucaja po minuti. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD, broj ljudi uključenih u eksperiment odgovara broju grafičkih simbola na slici. \* $p < 0,05$  predstavlja statističku značajnost. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Nezrele dendritske ćelije (*engl.* Immature Dendritic Cells - iDC), zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC), 1,25-dihidroksi vitaminom D3 tretirane dendritske ćelije (vitDC) i etil-piruvat (EP).

Ovi rezultati ukazuju da su tolEP-DC neefikasne u indukciji alogene proliferacije ćelija *in vitro*, čak u većoj meri nego vitDC.

#### 4.4.4 Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija tretiranih etil-piruvatom diferenciranih iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od multiple skleroze na produkciju citokina u alogenoj ko-kultivaciji

Potom su određivani nivoi produkcije IL-10 i IFN- $\gamma$  u supernatantima ćelijskih kultura nakon ko-kultivacije. Nivo IFN- $\gamma$  je bio značajno snižen u ko-kultivaciji sa tolEP-DC i vitDC u poređenju sa mDC i kod zdravih (Grafik 14A) i kod bolesnih pojedinaca (Grafik 14B). Međutim, nivo IL-10 je bio značajno povećan u ko-kultivaciji sa tolEP-DC i vitDC u poređenju sa mDC u uzorcima zdravih pojedinaca, dok kod pacijenata nije bilo razlike.



**Grafik 14. Efekat MoDC tretiranih EP-om na produkciju citokina u alogenoj ko-kultivaciji.** DC su diferencirane iz monocita periferne krvi ljudi. Njihovo sazrevanje je indukovano koktelom citokina (TNF, IL1 $\beta$  i PGE2) (mDC), u prisustvu EP-a (6,2 mM, 2. i 4. dana) (tolEP-DC), ili prisustvu 1,25 dihidroksi vitamina D3 (1 nM, 0. i 4. dana) (vitDC), ili DC nisu bile ni pod uticajem koktela ni tretmana (iDC). PBMC su izolovane iz krvi dobrovoljaca. Dobrovoljni davaoci krvi (A); Pacijenti (B). Citokini su određivani iz supernatanta ćelijskih kultura dobijenih nakon 96h kultivacije i njihova koncentracija je merena Metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD od četiri pojedinca. \* $p < 0,05$  predstavlja statističku značajnost. Korišćen je one-way ANOVA test praćen Tukey testom. Zrele dendritske ćelije (*engl.* Mature Dendritic Cells - mDC), 1,25-dihidroksi vitaminom D3 tretirane dendritske ćelije (vitDC) i tolerogene dendritske ćelije tretirane EP-om (tolEP-DC).

Ovi rezultati ukazuju da tolEP-DC modulišu produkciju citokina na način koji je karakterističan za tolerogene DC.

# **5. Diskusija**

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazan antiincefalitogeni uticaj EP-a na razvoj EAE. EP ispoljava svoj terapijski efekat u EAE-u inhibicijom inflamacije u CNS-u, delujući imunomodulacijski na ćelije u kičmenoj moždini koje učestvuju u patogenezi EAE-a. Tretman pacova EP-om dovodi do redukcije broja reaktivnih makrofaga i ćelija mikroglije, inhibicije reaktivnosti astrocita i sprečava oštećenje aksona u kičmenoj moždini. Jedan od mehanizama kojim EP ostvaruje svoje dejstvo na makrofage/aktiviranu mikrogliju u CNS-u je inhibicijom molekula HMGB1. Potom, utvrđeno je da EP smanjuje ekspresiju MHC II molekula zaduženog za prezentaciju antigena na makrofagima, kao i produkciju proinflamacijskih citokina od strane ovih ćelija, *in vitro*. Pokazano je i da EP indukuje tolerogene osobine DC<sup>+</sup> inhibirajući njihovu sposobnost da obave efikasnu prezentaciju antigena i produkciju proinflamacijskih citokina. Svoje tolerogene efekte EP ostvaruje potencirajući Nrf2 signalni put i inhibirajući ekspresiju regulatornog proteina transkripcije NF-κB. Takođe, DC<sup>+</sup> tretirane EP-om inhibiraju alogenu proliferaciju CD4<sup>+</sup> T-ćelija *in vitro* i modulišu imunski odgovor indukovani CFA-om, *in vivo*. Tolerogeno dejstvo EP-a pokazano je kako na mišjim, tako i na DC<sup>+</sup>-ma poreklom iz zdravih pojedinaca i pacijenata obolelih od MS-e.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da EP ostvaruje terapijski efekat na EAE. Tretman pacova kojima je indukovani EAE je započet od samog početka pojave kliničkih simptoma EAE-a. Tretman je završen nakon što su se pacovi inicijalno oporavili od bolesti. Važno je naglasiti da je tretman EP-om smanjio jačinu simptoma EAE-a u prvom kliničkom ispoljavanju bolesti, a pre svega da je skoro u potpunosti sprečio pojavu relapsa. Ovo ukazuje da bi EP i kod ljudi koji imaju relapsno-remitentnu formu MS-e mogao da utiče, kako na rezoluciju postojećeg kliničkog ispada, tako i na sprečavanje nastanka novih. U prilog ovom gledištu idu studije drugih grupa koje su pokazale da EP ostvaruje neuroprotektivno i antiinflamacijsko dejstvo u raznim modelima bolesti, kao što su sepsa (Fink, 2007), povreda mozga (Lv *i sar.*, 2017; Shi *i sar.*, 2015), Parkins (Choi *i sar.*, 2010) i ishemijska povreda kičmene moždine (Wang *i sar.*, 2009). Na mišjem modelu hemoragijskog šoka pokazano je da EP dovodi do poboljšavanja preživljavanja u toku 24h od promene. Na istom modelu je i prvi put pokazano da EP ima antiinflamacijska svojstva smanjujući nivo proinflamacijskog regulatornog proteina transkripcije NF-κB i ekspresiju gena koji kodiraju za nekoliko proinflamacijskih citokina u jetri i mukozi creva, što je praćeno oporavkom od hemoragijskog šoka (Yang *i sar.*, 2002). Zatim, Venkataraman i saradnici (2002) su ispitali efekte EP-a na pacovskom modelu arterijske hipotenzije indukovane intravenskom injekcijom visoke doze



LPS-a i pokazali da EP produžava vreme preživljavanja životinja. Efekte EP-a na inflamacijske odgovore indukovane LPS-om *in vitro* i *in vivo* su ispitivali Ulloa i saradnici (2002). Miševi koji su primili EP pre tretiranja smrtonosnom dozom LPS-a su imali mnogo veći procenat preživljavanja. U skladu sa tim, oni su dalje ispitali terapijska svojstva EP-a na životinjskim modelima sepse gde je takođe pokazano da EP značajno poboljšava oporavak čak i pri najvećoj primenjenoj dozi (40 mg/kg). Eksperimentni Juana i saradnika (2012b) pokazali su da EP ima i neuroprotektivna svojstva u modelu povrede kičmene moždine, gde je EP inhibirao astrogliozu i neuroinflamaciju, poboljšao preživljavanje neurona i regeneraciju aksona, i doveo do funkcionalnog oporavka kičmene moždine. EP ostvaruje pozitivan efekat i u drugim modelima autoimunskih bolesti potvrđeno je u studiji objavljenoj od strane Koprivice i saradnika (2019) gde je pokazano da profilaktička primena EP-a *in vivo* smanjuje incidencu razvoja dijabetesa tip 1 kod C57BL/6 miševa utičući na aktivaciju regulatornog i supresivnog imunskog odgovora.

Potencijal u terapijskoj primeni EP-a se ogleda i u tome što je on redoks analog dimetil-fumarata (DMF) (Miljković *i sar.*, 2015), leka koji je odobren za lečenje relapsno remitentne multiple skleroze (RRMS) 2013. godine (Cada *i sar.*, 2013). Interesantno je međusobno porediti efekte EP-a i DMF-a na funkcije ćelija koje su bitne u patogenezi MS-e, jer se može pretpostaviti da bi oni mogli imati zajedničke mehanizme delovanja. Zaista, oba jedinjenja dovode do supresije citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 (Miljković *i sar.*, 2015), koji su glavni pokretači inflamacije i autoimunosti u MS-i (Petermann i Korn, 2011). Takođe, EP i DMF inhibiraju produkciju citokina (IL-6 i TNF), kao i azot monoksida (NO) i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) od strane makrofaga. Štaviše, EP i DMF pružaju direktnu antioksidativnu zaštitu svojom ulogom „čistača“ superoksida i hidoroksil radikala, koji imaju bitnu ulogu u neurodegenerativnim procesima povezanim sa MS-om (Miljković *i sar.*, 2015). EP je primenjenivan kod ljudi u vrlo visokim koncentracijama, uključujući nekoliko kliničkih studija (Fink, 2007; Kao i Fink, 2010)). Interesantan je odnos doza EP-a i DMF-a u primeni kod ljudi. Preporučena doza DMF-a je 240 mg dva puta dnevno, dok je u kliničkoj studiji ispitivanja uticaja EP-a u kardiovaskularnim oboljenjima (Bennett-Guerrero *i sar.*, 2009), primenjeno 6 doza od 7,5 g EP-a intravenozno tokom 36h pri čemu nisu zabeležena neželjena dejstva. S druge strane, zabeleženo je dosta štetnih efekata primene DMF-a u većim dozama, kao što su poremećaji u funkcionisanju gastrointestinalnog trakta, crvenilo, smanjenje broja leukocita i limfocita, povećanje nivoa aminotransferaza jetre, alergije, dermatitis kao i infekcije respiratornog trakta (Damal *i sar.*, 2013; Salmen i Gold, 2014). Ovo ukazuje da bi se

EP oralno mogao primeniti u dozama koje su i do 100 ili 1000 puta veće u odnosu na prihvaćene doze DMF-a. Ove doze bi trebalo da budu efikasne za imunomodulaciju i neuroprotekciju, a pri tome bez neželjenih toksičnih efekata. Takođe, EP se primenjuje i kao suplement u ishrani (Kao i Fink, 2010), što dalje potvrđuje njegovu bezbednost upotrebe kod ljudi. Ti podaci, kao i eksperimenti koji dokazuju njegov pozitivan efekat u EAE-u, potvrđuju potencijal EP-a u terapijskoj primeni za lečenje MS-e.

Tretman pacova EP-om, počev od pojave prvih kliničkih simptoma EAE-a, deluje na efektorske mehanizme bolesti. EP dovodi do smanjenje broja i aktivnosti imunskih ćelija kičmene moždine što ukazuje na njegovu zaštitnu ulogu u neuroinflamaciji, koja se podudara sa njegovim efektima u prethodno opisanim modelima bolesti. Tretman pacova EP-om suprimirao je infiltraciju proinflamacijskih ćelija u kičmenu moždinu. Posledično, inhibirao je oslobađanje IL-17 od strane inflamacijskih ćelija kičmene moždine. Iako je suprimirana produkcija samo IL-17, a ne IFN- $\gamma$  u imunskim ćelijama kičmene moždine, sveukupna produkcija IFN- $\gamma$  u CNS-u jeste smanjena jer je EP uticao na smanjenje inflamacijskih ćelija kičmene moždine. Opšte je prihvaćeno da Th1 i Th17 ćelije doprinose patogenezi bolesti produkcijom efektorskih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17. Pokazano je da IFN- $\gamma$  ima proinflamacijski efekat ako deluje lokalno u CNS-u, dok njegovo delovanje na sistemskom nivou rezultira u imunomodulaciji i zaštiti od bolesti (Matthys *i sar.*, 2000). IL-17 direktno deluje na integritet krvno-moždane barijere indukcijom reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u endotelskim ćelijama i time doprinosi razvoju patogeneze EAE-a (Kurschus, 2015). Dakle, utičući na produkciju IL-17 i smanjujući nivo IFN- $\gamma$  u CNS-u, EP moduliše jedne od glavnih efektorskih mehanizama EAE-a i ispoljava svoje blagotvorno dejstvo.

Antiinflamacijski efekti EP-a su pokazani i na drugim ćelijama uključenim u patogenezu EAE-a i MS-e. Tretman makrofaga EP-om *in vitro* doveo je do inhibicije produkcije proinflamacijskih citokina IL-6 i TNF od strane ovih ćelija. Ti rezultati se dopunjuju sa drugim rezultatima naše grupe (Miljković *i sar.*, 2015), gde je pri sličnoj postavci eksperimenta ispitivano antioksidativno dejstvo EP-a na makrofage. Naime, pokazano je da EP dovodi do smanjenja produkcije NO i ROS u makrofagima. Takođe, ispitivan je i uticaj EP-a *ex vivo* na makrofage i aktiviranu mikrogliju u CNS-u. Pokazano je da EP redukuje infiltraciju reaktivnih makrofaga u kičmenu moždinu tokom EAE-a i da utiče na morfologiju ovih ćelija. Takođe, EP dovodi do smanjenja broja i veličine ćelija mikroglije. Reaktivni makrofagi CNS-a i aktivirana mikroglija su uključeni u patogenezu EAE-a i MS-e (Goldmann i Prinz, 2013; Bogie *i sar.*, 2014). Ove ćelije proizvode različite citotoksične

molekule koji dalje utiču na oligodendrocite i neurone (Lassmann, 2010). Prema našim rezultatima, u ćelijama mikroglije EP smanjuje produkciju IL-6, TNF i NO kao i aktivaciju NF-κB (Miljković *i sar.*, 2015). Ranije je već pokazano da u modelu povrede kičmene moždine tretman EP-om dovodi do smanjenja broja Iba1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> i ED1<sup>+</sup> ćelija (Yuan *i sar.*, 2012a) što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji.

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da tretman pacova EP-om koji su imunizovani HKM+CFA-om, dovodi i do morfoloških promena astrocita. Ćelijsko telo astrocita je smanjeno a nastavci skraćeni i međusobno se ne preklapaju, što se podudara i sa smanjenom ekspresijom GFAP proteina. Ovakav opis odgovara morfologiji neaktivnih astrocita. Astrociti su kompleksne visoko diferencirane ćelije koje imaju ulogu u regulaciji neurotransmisije, održavanju krvno-moždane barijere i ostvaruju veliki doprinos za normalno funkcionisanje zdravog CNS-a (Wang i Bordey, 2008; Sofroniew i Vinters, 2010). Međutim, u odgovoru na razne tipove povreda i/ili inflamacije CNS-a astrociti se reaktiviraju i formiraju glijalni ožiljak (Fitch i Silver, 2008; Sofroniew, 2009). Takođe, astrogliozna je glavni pokazatelj nedovoljnog oporavka tkiva CNS-a jer predstavlja jedan od uzroka neefikasne remijelinizacije i regeneracije aksona (Yiu i He, 2006; Moreno *i sar.*, 2013; Hostenbach *i sar.*, 2014). Prethodno pokazano dejstvo EP-a na astrocite podrazumeva smanjenje produkcije IL-6 i aktivaciju NF-κB što može biti značajno za ublažavanje neurodegeneracije (Miljković *i sar.*, 2015). Svi ovi rezultati podržavaju rezultate ove doktorske disertacije i zajedno objašnjavaju antiencefalitogeni efekat EP-a.

EP ostvaruje i zaštitno dejstvo na aksone kičmene moždine imunizovanih pacova. Dok su netretirani pacovi imali vidno oštećene i uvećane aksone, tretman EP-om je doveo do značajne redukcije oštećenja. Svi ovi rezultati su u saglasnosti sa studijom Juana i saradnika (2012) gde je u pacovskom modelu povrede kičmene moždine tretman EP-om smanjivao reaktivnost astrocita i neuroinflamaciju, pospešivao regeneraciju aksona, i na taj način dovodio do funkcionalnog oporavka CNS-a. Iz svega ovoga ovoga proizilazi da EP u neuroinflamacijskim stanjima doprinosi vraćanju CNS-a u homeostazu.

Prikazani efekti EP-a na ćelije koje učestvuju u patogenezi EAE-a koreliraju sa inhibicijom ekspresije HMGB1 u makrofagima/aktiviranoj mikrogliji u kičmenoj moždini tretiranih životinja. Takođe, tretman EP-om dovodi i do promene u ćelijskoj lokalizaciji HMGB1 u ćelijama kičmene moždine, kao i do inhibicije ekspresije iRNK za Hmgb1 u homogenatima kičmene moždine. HMGB1 je plejotropni molekul koji ima ulogu membranskog proteina u rastu neurona, zatim molekulskog obrasca opasnosti i

proinflamacijskog citokina (Czura *i sar.*, 2001; Klune *i sar.*, 2008). Bitna je njegova funkcija kao redoks senzitivnog molekula. Redukovane i oksidovane forme ovog molekula preko receptora RAGE (*engl.* receptor for advanced glycation end products - RAGE) i/ili TLR (*engl.* Toll-like receptors - TLR) imaju različite uloge u ćelijskoj signalizaciji i imunskoj regulaciji (Tang *i sar.*, 2011). Takođe, HMGB1 i njegovi receptori RAGE i TLR2 i TLR4 su eksprimirani u aktivnim lezijama u mozgu pacijenata obolelih od MS-e (Andersson *i sar.*, 2008), što ide u prilog tome da bi mehanizam dejstva EP-a putem inhibicije HMGB1 mogao biti prikladan za potencijalnu primenu EP-a u terapiji MS-e. EP je redoks aktivna komponenta koja ima afinitet ka tiolnim grupama i sposobnost „čišćenja“ superoksida i hidroksil radikala (Miljković *i sar.*, 2015). Ovoj ideji u prilog idu i činjenice da postoji povećana ekspresija HMGB1 u EAE-u (Sun *i sar.*, 2015), kao i da primena neutrališućih anti-HMGB1 antitela blagotvorno deluje na EAE (Robinson *i sar.*, 2013).

Imajući u vidu značaj APC u patologiji EAE-a i MS-e kao ključnih ćelija u otpočinjanju imunskog odgovora i aktivaciji T-ćelija (Lucchinetti *i sar.*, 2011), ispitano je dejstvo EP-a na makrofage i DC. EP primenjen na makrofage *in vitro*, suprimira ekspresiju molekula MHC II zaduženog za prezentaciju antigena CD4<sup>+</sup> T-ćelijama, kao i adhezionog molekula CD11b. Ovaj uticaj EP-a je još jedan mogući način na koji ovaj agens ostvaruje blagotvorno dejstvo u EAE-u. Naime, makrofagi doprinose patogenezi EAE-a i MS-e i kroz preuzimanje, obrađivanje i prezentaciju antigena T-limfocitima (Lucchinetti *i sar.*, 2011). Uočeni efekat EP-a na sposobnost prezentacije antigena od strane makrofaga usmerio je dalja istraživanja na ispitivanje uticaja EP-a na DC koje predstavljaju najpotentnije APC. Međusobna povezanost DC i encefalitogenih T-ćelija je ključna u započinjanju i održavanju autoimunskog odgovora u EAE-u i MS-u (Noster *i sar.*, 2014). Rezultati ovog rada pokazuju da je EP primenjen *in vitro* modulirao ekspresiju kostimulatornih molekula CD40 i CD86 na mišjim DC, a da pritom nije uticao na ekspresiju CD11c, tj. nije promenio prirodu ovih ćelija. Kostimulatorni molekuli su ključni u aktivaciji T-ćelija i njihova povećana ekspresija je odlika zrelih imunogenih DC (Raïch-Regué *i sar.*, 2014). Samim tim, inhibicija ekspresije CD40 i CD86 pod uticajem EP-a govori o njegovoj sposobnosti da utiče supresivno na DC iako su one primile stimulus za sazrevanje.

Dalje, tretman EP-om je doveo do smanjenja nivoa proinflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF i IL-12) od strane DC i time dodatno umanjio mogućnost aktivacije T-limfocita od strane ovih ćelija. U skladu sa tim, u alogenoj ko-kultivaciji CD4<sup>+</sup> T-ćelija i DC, nivo proliferacije CD4<sup>+</sup> T-ćelija, kao i produkcija IL-17 od strane njih, su bili značajno sniženi

kada su one ko-kultivisane sa tolEP-DĆ u odnosu na ko-kultivaciju sa mDĆ. Ovi efekti EP-a su prisutni bez obzira da li je on primenjivan tokom diferencijacije DĆ ili zajedno sa stimulusom za sazrevanje. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nedavnom studijom koja je takođe ispitala efekat EP-a na mišje DĆ. U ovoj studiji je pokazano da primena EP-a 1h pre ili posle stimulusa za sazrevanje DĆ-a, suprimira aktivaciju mišjih DĆ *in vitro*, inhibirajući produkciju proinflamacijskih citokina od strane ovih ćelija, kao i ekspresiju kostimulatornih molekula na DĆ (Chakhtoura *i sar.*, 2019). Takođe, primena EP-a 24h pre maturacije DĆ doprinosi inhibiciji proliferacije limfocita u alogenoj ko-kultivaciji (Chakhtoura *i sar.*, 2019). Imajući u vidu da su neke od glavnih odlika tolDĆ smanjena produkcija proinflamacijskih citokina i nesposobnost aktivacije CD4<sup>+</sup> T-ćelija u alogenoj ko-kultivaciji (Domogalla *i sar.*, 2017), iz svega ovoga proizilazi da EP ostvaruje antiinflamacijski i tolerogeni efekat na DĆ.

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da EP ostvaruje dejstvo na DĆ stimulacijom signalnog puta Nrf2. EP povećava ekspresiju Nrf2 u DĆ i ima sposobnost da održi njegove visoke nivoe u ovim ćelijama, čak i kada su one izložene jakom inflamacijskom stimulusu. Ovakav uticaj EP-a na Nrf2 bi mogao da ima izuzetan značaj za njegov imunomodulacijski efekat na DĆ. Naime, pokazano je da deficijencija Nrf2 u DĆ dovodi do povećanog sazrevanja ovih ćelija i izazivanja proinflamacijskog imunskog odgovora T-ćelija (Wang *i sar.*, 2017; Aw Yeang *i sar.*, 2012). Aktivacija Nrf2 u DĆ-ma dovodi do smanjenja produkcije proinflamacijskih citokina i njihovog imunosupresivnog fenotipa tokom sazrevanja, što govori u prilog tome da je Nrf2 jedan od ključnih faktora u indukciji diferencijacije tolDĆ (Wei *i sar.*, 2018). Nrf2 je negativni regulator transkripcione aktivnosti NF-κB koji indukuje produkciju proinflamacijskih citokina u DĆ stimulisanim LPS-om (Yoshimura *i sar.*, 2001). Izlaganje DĆ LPS-u dovodi do aktivacije NF-κB regulatornog proteina transkripcije koji sledstveno dovodi do produkcije proinflamacijskih citokina od strane DĆ i indukuje njihovo imunogeno svojstvo (May i Ghosh, 1998). Dakle, indukcija tolerancije uključuje inhibiciju ekspresije NF-κB, a u prilog tome neki protokoli za pravljenje tolDĆ podrazumevaju diferencijaciju DĆ u prisustvu inhibitora NF-κB (Benham *i sar.*, 2015). U skladu sa tim, ovde je pokazano da EP dovodi do smanjenja nivoa ekspresije NF-κB u jedrima DĆ i njegove translokacije u citoplazmu.

Zatim, EP je ispoljio efekat i na antioksidativni enzim NQO1. Prisustvo samog EP-a u iDĆ dovodi do povećanja nivoa NQO1 u odnosu na netretirane iDĆ, a nakon dodavanja LPS-a u trajanju od 4h zadržava se visok nivo ekspresije NQO1, što ide u prilog antioksidativnom dejstvu EP-a u DĆ-ma. NQO1 je jedan od ciljnih gena Nrf2 signalnog puta čija povećana

ekspresija takođe dovodi do zaštite ćelija od oksidativnog stresa (Hammer *i sar.*, 2017). Pokazano je i da tolEP-DĆ imaju veće nivoe HO-1 u poređenju sa mDĆ. Bitno je napomenuti da je nivo ekspresije HO-1 veći i u DĆ koje su tretirane samo EP-om bez dodatka LPS-a u odnosu na mDĆ. Dakle, DĆ tretirane EP-om imaju relativno visok bazalni nivo ekspresije HO-1 koji se održava uprkos jakom maturacionom i inflamacijskom stimulusu, kakav je LPS. Od ranije je poznato da je ekspresija HO-1 visoka u iDĆ i tolDĆ, dok je niska u mDĆ (Hull *i sar.*, 2014; Chauveau *i sar.*, 2005; Moreau *i sar.*, 2009). Dve studije su pokazale da indukcija HO-1 dovodi do diferencijacije DĆ u tolDĆ inhibiranjem njihove proinflamacijske funkcije i održavanjem u stanju nalik nezrelim DĆ (Chauveau *i sar.*, 2005; Schumacher *i sar.*, 2012). Zaista, analiza morfologije DĆ-a ispitana u ovom radu praćenjem preko aktina, ukazuje na sličnost tolEP-DĆ sa iDĆ. Uticaj EP na ekspresiju HO-1 u DĆ-ma je stoga još jedan pokazatelj njegovog tolerogenog dejstva. Važno je istaći i da DMF ostvaruje potencirajuće dejstvo na HO-1 i NQO1 u DĆ (Smith *i sar.*, 2003; Lehmann *i sar.*, 2007; Ghoreschi *i sar.*, 2011). Uprkos velikom broju dokaza koji podržavaju hipotezu da stimulacija ekspresije HO-1 može biti dobra strategija u lečenju inflamacijskih oboljenja, problem nastaje usled teškog pronalaska pogodnih jedinjenja koja bi indukovala njenu povećanu ekspresiju, a da pritom ne ispolje toksična dejstva (Campbell *i sar.*, 2018). Samim tim, imajući u vidu da je EP bezbedno jedinjenje za primenu kod ljudi (Kao i Fink, 2010), njegova sposobnost da dovodi do povećanja nivoa HO-1 u DĆ ima dodatni značaj.

tolEP-DĆ efikasno modulišu imunski odgovor indukovan aktivnom imunizacijom CFA-om, *in vivo*. Ove ćelije primenjene injekcijom na istom mestu kao i CFA suprimiraju imunski odgovor u drenirajućim limfnim čvorovima. Ubrizgane tolEP-DĆ migriraju ka regionalnom limfnom čvoru i ostvaruju svoj imunomodulacijski efekat, povećavajući produkciju IL-10 i smanjujući produkciju IFN- $\gamma$ . Imajući u vidu da imunizacija CFA-om izaziva jak imunski odgovor (Billiau i Matthys, 2001), sposobnost tolEP-DĆ da ga modulišu govori o njihovom izuzetnom imunomodulacijskom potencijalu koji bi se mogao iskoristiti i za tretman autoimunskih bolesti. Imajući u vidu da tokom patogeneze autoimunskih bolesti dolazi do aktivacije ograničenog broja klonova T-limfocita specifičnih za određene antigene, intenzitet imunskog odgovora je slabiji nego kod stimulacije adjuvansom, kakav je CFA. Efikasnost tolDĆ je ispitivana u nekoliko životinjskih modela autoimunskih bolesti među kojima je i EAE (Chorny *i sar.*, 2005, Mansilla *i sar.*, 2015). U studiji Mansilja i kolega (2015) pokazano je da tolDĆ diferencirane u prisustvu 1,25 dihidroksi 1,25 dihidroksi vitamina D33 i izložene maturacionom signalu u prisustvu MOG-a inhibiraju EAE indukovan

istim antigenom. Samim tim, nameće se ideja da se tolerogena svojstva tolEP-DĆ koje bi sazrevale u prisustvu određenih antigena ispitaju u adekvatnom modelu EAE-a. Ovakva istraživanja bi dala odgovor na pitanje da li tolEP-DĆ mogu da ostvare efikasno imunomodulacijsko dejstvo specifično za određene antigene bez generalnog imunosupresivnog efekta.

Tolerogeni efekat EP-a je potvrđen i na ljudskim DĆ diferenciranim iz monocita periferne krvi zdravih dobrovoljaca i pacijenata obolelih od MS-e. Bitno je napomenuti da pacijenti koji su donirali krv nisu bili na terapiji za MS u trenutku doniranja, kao ni u periodu pre doniranja koji je bio dovoljno dug da se iz organizma eliminišu primenjeni lekovi, te se može isključiti uticaj imunomodulacijskih i/ili imunosupresivnih terapeutika na uočena dejstva EP-a. Takođe, efekat EP-a je upoređen sa efektima 1,25 dihidroksi vitamina D<sub>3</sub>, koji je molekul sa ustanovljenim tolerogenim svojstvima. Pri najvećoj primenjenoj dozi od 12,5 mM, EP nije imao efekat na vijabilitet DĆ u poređenju sa mDĆ i vitDĆ. Ti rezultati ukazuju da bi EP mogao biti primenjivan i u većim dozama i tako još potentnije ispoljavati svoje dejstvo. Zatim, EP nije imao uticaj na ekspresiju CD11c, ali je ispoljio supresivni efekat na ekspresiju HLA-DR i kostimulatornih molekula (CD86 i CD83). Efekti EP-a se nisu razlikovali u zavisnosti da li su uzorci bili od zdravih pojedinaca ili pacijenata, što govori o postojanosti njegovog uticaja na DĆ i ako su one izolovane iz osoba koje pate od autoimunske bolesti. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno okarakterisanim tolerogenim fenotipom vitDĆ koji podrazumeva inhibiciju ekspresije molekula neophodnih za prezentaciju antigena T-limfocitima kao i za njihovu aktivaciju (Ferreira *i sar.*, 2014). Dakle, iz ovoga proizilazi da EP ostvaruje slične efekte na fenotip DĆ kao 1,25 dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>. Dalje su potvrđene funkcionalne karakteristike tolEP-DĆ. U poređenju sa vitDĆ tretiranim standardnom dozom 1,25 dihidroksi vitamina D<sub>3</sub> (1 nM), tolEP-DĆ tretirane najvećom primenjenom dozom EP-a (12,5 mM) imaju slabiji kapacitet stimulacije aloproliferacije. Kao i u prethodnim eksperimentima, nije postojala razlika u rezultatima, bez obzira da li su DĆ poreklom iz pacijenata ili zdravih pojedinaca. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti potencijal tolEP-DĆ u imunoterapiji, jer u funkcionalnom testu ostvaruju bolji rezultat od vitDĆ. DĆ tretirane EP-om i 1,25 dihidroksi vitaminom D<sub>3</sub> ispoljavaju inhibicioni efekat na diferencijaciju Th1 CD4<sup>+</sup> ćelija jer se produkuje manje IFN- $\gamma$ . I ovaj rezultat je istovetan bez obzira da li su uzorci dobijeni od pacijenata ili od zdravih pojedinaca. Jedina razlika koja je zapažena između zdravih pojedinaca i pacijenata je u nivou produkcije IL-10 u supernatantima ćelijskih kultura nakon ko-kultivacije DĆ sa PBMC. Dok je kod zdravih

pojedina nivo IL-10 bio povećan i kod vitDĆ i tolEP-DĆ u odnosu na mDĆ, kod pacijenata nije bilo razlike bez obzira na vrstu tolerogenog stimulusa koji je primenjen. Poznato je da IL-10 ima važnu ulogu u imunomodulacijskoj aktivnosti tolDĆ jer indukuje diferencijaciju Treg ćelija (Horton *i sar.*, 2017). Ovo ukazuje da bi DĆ, kao i druge imunske ćelije MS pacijenata mogle inherentno imati ograničenu sposobnost da proizvode IL-10. U skladu sa ovakvom pretpostavkom su već prethodno pomenuti rezultati da je procenat PBMC koje proizvode IL-10 niži kod pacijenata (Ozenci *i sar.*, 2000), kao i da ove ćelije imaju smanjenu ekspresiju mRNA za IL-10 (Glasnović *i sar.*, 2014; Belghith *i sar.*, 2018). Istraživanja posvećena ispitivanju navedene pretpostavke bi pomogla u razumevanju predispozicije ka razvoju MS-e. Važno je napomenuti da uzorci pacijenata i zdravih osoba korišćeni u ovom istraživanju nisu bili usaglašeni međusobno po godinama, polu i ostalim relevantnim demografskim parametrima, te bi to mogao biti razlog uočene razlike u produkciji IL-10 od strane PBMC. Takođe, izvor DĆ pacijenata je bila puna krv, dok su DĆ zdravih osoba dobijeni iz koncentrovanih leukocita. Međutim, ove činjenice ne ugrožavaju generalni zaključak o tolerogenom uticaju EP-a na DĆ jer su tolEP-DĆ imale iste ako ne i snažnije tolerogene efekte u poređenju sa klasičnim vitDĆ, bez obzira da li su diferencirane iz zdravih pojedinaca ili pacijenata.

Cilj imunoterapije tolDĆ-ma je indukcija tolerancije na specifični antigen uz izbegavanje sistemske imunosupresije. Izazivanje specifičnog tolerogenog imunskog odgovora pruža veliki potencijal u lečenju autoimunskih bolesti. Terapija tolDĆ-ma bi mogla efikasno da zaustavi autoimunski odgovor u početnim fazama bolesti, kod pacijenata kojima je nedavno postavljena dijagnoza na osnovu kliničke slike. Takođe, ona ima potencijal i u podmaklim fazama bolesti, gde bi, bilo sama ili u kombinaciji sa drugim terapeutima, mogla da doprinese povratku funkcionalnosti ugroženog tkiva ili regije zahvaćene autoimunskim oboljenjem (Carballido i Santamaria, 2019). Sveobuhvatno, istraživanja upućuju na to da će u bliskoj budućnosti imunoterapija tolDĆ-ma biti lek kojim će život pacijenata koji boluju od neke autoimunske bolesti biti znatno kvalitetniji. Usled pomenutog velikog potencijala tolDĆ u imunoterapiji autoimunskih bolesti, važno je stalno ispitivati nova i bolja jedinjenja za generisanje tolDĆ u cilju unapređivanja metoda i znanja koja bi doprinela većoj efikasnosti, reproducibilnosti i specifičnosti budućih imunoterapija. U skladu sa tim, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivan i dokazan tolerogeni potencijal EP-a na DĆ diferencirane iz kostne srži miševa, kao i iz monocita periferne krvi ljudi. Pored već dokazane prednosti EP-a u funkcionalnim eksperimentima u odnosu na 1,25 dihidroksi vitamin D3, njegova prednost se



može ogleđati i u indukciji stabilnosti DĆ-a. Jedan od zadataka imunoterapije je diferencijacija tolDĆ koje nakon ubrizgavanja u pacijenta mogu odoleti sredinskim proinlamijskim uticajima i zadržati svoje tolerogene funkcije (Obregon *i sar.*, 2017). U tom kontekstu je izuzetno vredno svojstvo EP-a da ne dozvoljava pokretanje signalnih puteva koji pospešuju inflamaciju i oštećenje ćelija ni u prisustvu jakog proinlamijskog medijatora, LPS-a.

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da EP ostvaruje terapijsko dejstvo na EAE modulacijom funkcija ćelija koje učestvuju u patogenezi ove bolesti. Utvrđeno je tolerogeno dejstvo EP-a na mišje DĆ *in vitro*, kao i efikasnost ovih ćelija u modulaciji imnskog odgovora *in vivo*. Potvrđen je i tolerogeni efekat EP-a na DĆ diferencirane iz monocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca i pacijenata obolelih od MS-e. Iz svega ovoga proizilazi da EP ima potencijal da bude primenjen u terapiji MS-e, bilo direktno ili kao tolerogeni agens u pripremi tolDĆ za potencijalnu ćelijsku imunoterapiju. Rezultati ove studije bi trebalo da budu osnova za dalja istraživanja o uticaju EP-a na autoimunski odgovor usmeren protiv CNS-a, a koja bi ispitala mogućnost prelaska sa prekliničkih na klinička istraživanja. Imajući u vidu da različite autoimunske i hronične inflamacijske bolesti imaju zajedničke karakteristike patogeneze sa MS-om, potencijal EP-a da bude primenjen u terapiji takvih bolesti je takođe vredan daljeg istraživanja.

## **6. Zaključci**

Na osnovu postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije i u skladu sa dobijenim rezultatima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. EP ostvaruje antiencefalitogeno dejstvo u EAE-u kada se primenjuje intraperitonealno jednom dnevno pacovima, počevši od pojave prvih simptoma bolesti sve do njihovog inicijalnog oporavka, i to tako što:

- Ublažava kliničke simptome bolesti
- Inhibira inflamaciju u kičmenoj moždini pacova smanjujući broj infiltrata, broj inflamacijskih ćelija u infiltratima, kao i produkciju IL-17
- Redukuje broj reaktivnih makrofaga i ćelija mikroglije u kičmenoj moždini, smanjuje razgranatost i veličinu ovih ćelija
- Inhibira pojavu reaktivnih astrocita u kičmenoj moždini
- Sprečava oštećenje aksona u kičmenoj moždini
- Inhibira ekspresiju iRNK za Hmgb1, smanjuje ekspresiju HMGB1 u ćelijama kičmene moždine, a pre svega u reaktivnim makrofagima/mikrogliji

2. EP *in vitro* ostvaruje imunosupresivno dejstvo na aktivirane makrofage diferencirane iz kostne srži i aktivirane makrofage poreklom iz peritoneuma DA pacova tako što:

- Inhibira produkciju proinflamacijskih citokina u aktiviranim makrofagima pri čemu ne smanjuje vijabilitet ovih ćelija
- Smanjuje ekspresiju molekula MHCII i CD11b

3. EP *in vitro* ostvaruje tolerogeni uticaj na mišje DĆ tako što:

- Inhibira produkciju proinflamacijskih citokina ne menjajući njihov vijabilitet
- Smanjuje ekspresiju kostimulatornih molekula CD40 i CD86, a ne utiče na visoku ekspresiju CD11c molekula
- Smanjuje njihovu sposobnost da aktiviraju T-ćelije u alogenoj ko-kultivaciji
- Povećava ekspresiju molekula Nrf2, NQO1 i HO-1 u ovim ćelijama
- Smanjuje ekspresiju NF-κB transkripcionog faktora u ovim ćelijama
- Smanjuje njihovu sposobnost da migriraju u drenirajuće limfne čvorove miševa imunizovanih CFA-om
- Povećava broj ćelija koje produkuju IL-10 i smanjuje broj ćelija koje produkuju IFN-γ u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije CFA-om

4. EP *in vitro* ostvaruje tolerogeni efekat na MoDC tako što:

- Slično kao i 1,25 dihidroksi vitamin D3, ne utiče na njihov vijabilitet
- Suprimira ekspresiju kostimulatornih molekula (CD86 i CD83) i HLA-DR molekula na DC-ma dobijenim iz zdravih pojedinaca i iz pacijenata obolelih od MS-e, u sličnoj meri kao i 1,25 dihidroksi vitamin D3
- DC diferencirane iz zdravih pojedinaca ili pacijenata obolelih od MS-e imaju smanjenu sposobnost da indukuju proliferaciju alogernih imunskih ćelija kao i produkciju citokina od strane ovih ćelija. EP ispoljava jači inhibitorski efekat na alostimulatorni potencijal MoDC u poređenju sa 1,25 dihidroksi vitaminom D3.

Na osnovu prethodno iznetih konkretnih zaključaka, može se izvesti opšti zaključak da EP ostvaruje pozitivno dejstvo u EAE-u delujući imunomodulacijski na ćelije u kičmenoj moždini koje učestvuju u patogenezi EAE-a. Takođe, EP svoj efekat ostvaruje i na antigen prezentujuće ćelije (makrofage i dendritske ćelije) koje učestvuju u otpočinjanju imunskog odgovora i prezentaciji antigena T-ćelijama. Šta više, utvrđeno je da EP-om tretirane mišje DC i ljudske MoDC, u *in vitro* uslovima razvijaju tolerogeni fenotip i funkcije. Iz ovoga proizilazi da bi EP trebalo ispitati kao potencijalni terapeutik za multiplu sklerozu. Primena EP-a bi mogla biti direktna, ili bi se u terapiji koristile tolerogene DC dobijene nakon tretmana EP-om. Rezultati ove doktorske disertacije otvaraju mnogobrojne mogućnosti za dalje ispitivanje imunomodulacijskog dejstva EP-a i u drugim autoimunskim i hroničnim inflamacijskim bolestima.

# **7. Literatura**

Ahlgren, C., Odén, A., and Lycke, J. (2014). High Nationwide Incidence of Multiple Sclerosis in Sweden. *PLoS One* 9, e108599.

Ahmed, M.S., and Bae, Y.-S. (2016). Dendritic Cell-based Immunotherapy for Rheumatoid Arthritis: from Bench to Bedside. *Immune Netw.* 16, 44–51.

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., and Rossi, F.M. V (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat. Neurosci.* 14, 1142–1149.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2, 725–731.

Albrecht, P., Bouchachia, I., Goebels, N., Henke, N., Hofstetter, H.H., Issberner, A., Kovacs, Z., Lewerenz, J., Lisak, D., Maher, P., et al. (2012). Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J. Neuroinflammation* 9, 638.

Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.

Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O’Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200.

Andersson, A., Covacu, R., Sunnemark, D., Danilov, A.I., Dal Bianco, A., Khademi, M., Wallström, E., Lobell, A., Brundin, L., Lassmann, H., et al. (2008). Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1248–1255.

Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J. Exp. Med.* 199, 1401–1408.

Ascherio, A., and Munger, K. (2008). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention. *Semin. Neurol.* 28, 017–028.

Aw Yeang, H.X., Hamdam, J.M., Al-Huseini, L.M.A., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E., and Sathish, J.G. (2012). Loss of transcription

factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 10556–10564.

Bach, J.-F., Bendelac, A., Brenner, M.B., Cantor, H., De Libero, G., Kronenberg, M., Lanier, L.L., Raulet, D.H., Shlomchik, M.J., and von Herrath, M.G. (2004). The role of innate immunity in autoimmunity. *J. Exp. Med.* *200*, 1527–1531.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767–811.

Barragan, M., Good, M., and Kolls, J.K. (2015). Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. *Nutrients* *7*, 8127–8151.

Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* *60*, 430–440.

Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 904–912.

Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* *45*, 1353–1360.

Belghith, M., Bahrini, K., Kchaou, M., Maghrebi, O., Belal, S., and Barbouche, M.R. (2018). Cerebrospinal fluid IL-10 as an early stage discriminative marker between multiple sclerosis and neuro-Behçet disease. *Cytokine* *108*, 160–167.

Bell, G.M., Anderson, A.E., Diboll, J., Reece, R., Eltherington, O., Harry, R.A., Fouweather, T., MacDonald, C., Chadwick, T., McColl, E., et al. (2017). Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 227–234.

Benham, H., Nel, H.J., Law, S.C., Mehdi, A.M., Street, S., Ramnoruth, N., Pahau, H., Lee, B.T., Ng, J., G. Brunck, M.E., et al. (2015). Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci. Transl.*

Med. 7, 290ra87-290ra87.

Bennett-Guerrero, E., Swaminathan, M., Grigore, A.M., Roach, G.W., Aberle, L.G., Johnston, J.M., and Fink, M.P. (2009). A phase II multicenter double-blind placebo-controlled study of ethyl pyruvate in high-risk patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 23, 324–329.

Bhasin, M., Wu, M., and Tsirka, S.E. (2007). Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Immunol.* 8, 10.

Bielekova, B. (2018). Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb. *Perspect. Med.* a034470.

Billiau, A., and Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70, 849–860.

Bogie, J.F.J., Stinissen, P., and Hendriks, J.J.A. (2014). Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 128, 191–213.

Brambilla, R. (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 137, 757–783.

Brown, M.A., and Weinberg, R.B. (2018). Mast Cells and Innate Lymphoid Cells: Underappreciated Players in CNS Autoimmune Demyelinating Disease. *Front. Immunol.* 9, 514.

Brown, D., Trowsdale, J., and Allen, R. (2004). The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64, 215–225.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M. V (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.

Cada, D.J., Levien, T.L., and Baker, D.E. (2013). Dimethyl fumarate. *Hosp. Pharm.* 48, 668–679.



Campbell, N.K., Fitzgerald, H.K., Malara, A., Hambly, R., Sweeney, C.M., Kirby, B., Fletcher, J.M., and Dunne, A. (2018). Naturally derived Heme-Oxygenase 1 inducers attenuate inflammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment. *Sci. Rep.* *8*, 10287.

Carballido, J.M., and Santamaria, P. (2019). Taming autoimmunity: Translating antigen-specific approaches to induce immune tolerance. *J. Exp. Med.* *216*, 247–250.

Chakhtoura, M., Chain, R.W., Sato, P.Y., Qiu, C.C., Lee, M.H., Meissler, J.J., Eisenstein, T.K., Koch, W.J., Caricchio, R., and Gallucci, S. (2019). Ethyl Pyruvate Modulates Murine Dendritic Cell Activation and Survival Through Their Immunometabolism. *Front. Immunol.* *10*, 30.

Chauveau, C., Rémy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.-X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* *106*, 1694–1702.

Choi, J.-S., Lee, M.S., and Jeong, J.-W. (2010). Ethyl pyruvate has a neuroprotective effect through activation of extracellular signal-regulated kinase in Parkinson's disease model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *394*, 854–858.

Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.-W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., et al. (2011). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 751–756.

Chora, A.A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T.F., Cardoso, S., Ho, P.P., Lee, L.Y., Sobel, R.A., Steinman, L., and Soares, M.P. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* *117*, 438–447.

Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Pozo, D., Ganea, D., and Delgado, M. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 13562–13567.

Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., et al. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination

through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400.

Čierny, D., Michalik, J., Dubovan, P., Škereňová, M., Javor, J., Kurča, E., Dobrota, D., and Lehotský, J. (2019). The association of rs703842 variants in CYP27B1 with multiple sclerosis susceptibility is influenced by the HLA-DRB1\*15:01 allele in Slovaks. *J. Neuroimmunol.* 330, 123–129.

Cohen, J.A., Coles, A.J., Arnold, D.L., Confavreux, C., Fox, E.J., Hartung, H.-P., Havrdova, E., Selmaj, K.W., Weiner, H.L., Fisher, E., et al. (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 380, 1819–1828.

Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517.

Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., and Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 164, 1079–1106.

Cortese, M., Riise, T., Bjørnevik, K., Holmøy, T., Kampman, M.T., Magalhaes, S., Pugliatti, M., Wolfson, C., and Myhr, K.-M. (2015). Timing of use of cod liver oil, a vitamin D source, and multiple sclerosis risk: The EnvIMS study. *Mult. Scler.* 21, 1856–1864.

Czura, C.J., Wang, H., and Tracey, K.J. (2001). Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J. Endotoxin Res.* 7, 315–321.

Damal, K., Stoker, E., and Foley, J.F. (2013). Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. *Biologics* 7, 247–258.

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., Courten, M. de, Matsoukas, J., and Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci.* 7.

Dean, G., Yeo, T.W., Goris, A., Taylor, C.J., Goodman, R.S., Elian, M., Galea-Debono, A., Aquilina, A., Felice, A., Vella, M., et al. (2008). HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology* 70, 101–105.

Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis.

Nat. Rev. Immunol. *15*, 545–558.

Denic, A., Johnson, A.J., Bieber, A.J., Warrington, A.E., Rodriguez, M., and Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* *18*, 21–29.

Domogalla, M.P., Rostan, P. V, Raker, V.K., and Steinbrink, K. (2017). Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front. Immunol.* *8*, 1764.

Duffy, S.S., Lees, J.G., and Moalem-Taylor, G. (2014). The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult. Scler. Int.* *2014*, 285245.

van Duivenvoorde, L.M., Han, W.G.H., Bakker, A.M., Louis-Pence, P., Charbonnier, L.-M., Apparailly, F., van der Voort, E.I.H., Jorgensen, C., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E.M. (2007). Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J. Immunol.* *179*, 1506–1515.

Ferreira, G.B., Overbergh, L., Verstuyf, A., and Mathieu, C. (2013).  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 and its analogs as modulators of human dendritic cells: A comparison dose-titration study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *136*, 160–165.

Ferreira, G.B., Gysemans, C.A., Demengeot, J., da Cunha, J.P.M.C.M., Vanherwegen, A.-S., Overbergh, L., Van Belle, T.L., Pauwels, F., Verstuyf, A., Korf, H., et al. (2014).  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 Promotes Tolerogenic Dendritic Cells with Functional Migratory Properties in NOD Mice. *J. Immunol.* *192*, 4210–4220.

Fink, M.P. (2003). Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *Crit. Care Med.* *31*, S51-6.

Fink, M.P. (2007). Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis. *Curr. Drug Targets* *8*, 515–518.

Fitch, M.T., and Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp. Neurol.* *209*, 294–301.

Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H.G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* *162*, 1–11.

Flórez-Grau, G., Zubizarreta, I., Cabezón, R., Villoslada, P., and Benitez-Ribas, D. (2018). Tolerogenic Dendritic Cells as a Promising Antigen-Specific Therapy in the Treatment of Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica From Preclinical to Clinical Trials. *Front. Immunol.* *9*, 1169.

Friese, M.A., Jakobsen, K.B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M.J., McMahon, R.M., Jensen, L.T., Huygelen, V., Jones, E.Y., Bell, J.I., et al. (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *14*, 1227–1235.

Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., and Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* *132*, 1175–1189.

Ghoreschi, K., Brück, J., Kellerer, C., Deng, C., Peng, H., Rothfuss, O., Hussain, R.Z., Gocke, A.R., Respa, A., Glocova, I., et al. (2011). Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J. Exp. Med.* *208*, 2291–2303.

Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., and Trucco, M. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* *34*, 2026–2032.

Ginestal-López, R.C. (2018). Immunotherapy for neurological diseases, present and future. *Farm. Hosp.* *42*, 251–260.

Glasnović, A., Cvija, H., Stojić, M., Tudorić-Đeno, I., Ivčević, S., Romić, D., Tičinović, N., Vuletić, V., Lazibat, I., and Grčević, D. (2014). Decreased level of sRAGE in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients at clinical onset. *Neuroimmunomodulation* *21*, 226–233.

Goldmann, T., and Prinz, M. (2013). Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 1–8.

Gong, J., Chehrazi-Raffle, A., Reddi, S., and Salgia, R. (2018). Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J. Immunother. Cancer* *6*, 8.

- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597.
- Gourraud, P.-A., Harbo, H.F., Hauser, S.L., and Baranzini, S.E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol. Rev.* 248, 87–103.
- Goverman, J., Perchellet, A., and Huseby, E.S. (2005). The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 4, 239–245.
- Greenfield, A.L., and Hauser, S.L. (2018). B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann. Neurol.* 83, 13–26.
- Gregersen, J.W., Kranc, K.R., Ke, X., Svendsen, P., Madsen, L.S., Thomsen, A.R., Cardon, L.R., Bell, J.I., and Fugger, L. (2006). Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 443, 574–577.
- Gregory, S.G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J.R., Hart, J., Prokop, A., Caillier, S.J., Ban, M., Goris, A., Barcellos, L.F., et al. (2007). Interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 39, 1083–1091.
- Hammer, A., Waschbisch, A., Knippertz, I., Zinser, E., Berg, J., Jörg, S., Kuhbandner, K., David, C., Pi, J., Bayas, A., et al. (2017). Role of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 Signaling for Effects of Fumaric Acid Esters on Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 8, 1922.
- Handel, A.E., Giovannoni, G., Ebers, G.C., and Ramagopalan, S. V. (2010). Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 156–166.
- Handunnetthi, L., Ramagopalan, S. V, and Ebers, G.C. (2010). Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1\*15. *Neurology* 74, 1905–1910.
- Harkioliaki, M., Holmes, S.L., Svendsen, P., Gregersen, J.W., Jensen, L.T., McMahon, R., Friese, M.A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J.S., et al. (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348–357.
- Hart, B.A., and Massacesi, L. (2009). Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 341–355.

- Harry, R.A., Anderson, A.E., Isaacs, J.D., and Hilkens, C.M.U. (2010). Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 2042–2050.
- Hartmann, F.J., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., Gran, B., Piehl, F., Olsson, T., Codarri, L., et al. (2014). Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat. Commun.* *5*, 5056.
- Hasselmann, J.P.C., Karim, H., Khalaj, A.J., Ghosh, S., and Tiwari-Woodruff, S.K. (2017). Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. *J. Neurosci. Methods* *284*, 71–84.
- Hermann-Kleiter, N., and Baier, G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* *115*, 2989–2997.
- Hilkens, C.M.U., and Isaacs, J.D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clin. Exp. Immunol.* *172*, 148–157.
- Höftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2004). Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* *14*, 43–50.
- Horton, C., Shanmugarajah, K., and Fairchild, P.J. (2017). Harnessing the properties of dendritic cells in the pursuit of immunological tolerance. *Biomed. J.* *40*, 80–93.
- Hostenbach, S., Cambron, M., D’haeseleer, M., Kooijman, R., and De Keyser, J. (2014). Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neurosci. Lett.* *565*, 39–41.
- Hoy, S.M. (2015). Peginterferon beta-1a: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs* *29*, 171–179.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C.H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S.J., and Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J. Immunol.* *195*, 3665–3674.
- Huang, D. (2015). Challenges in randomized controlled trials and emerging multiple sclerosis therapeutics. *Neurosci. Bull.* *31*, 745–754.

Hull, T.D., Agarwal, A., and George, J.F. (2014). The Mononuclear Phagocyte System in Homeostasis and Disease: A Role for Heme Oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1770–1788.

Isackson, P.J., Bidney, D.L., Reeck, G.R., Neihart, N.K., and Bustin, M. (1980). High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar. *Biochemistry* *19*, 4466–4471.

Jauregui-Amezaga, A., Cabezón, R., Ramírez-Morros, A., España, C., Rimola, J., Bru, C., Pinó-Donnay, S., Gallego, M., Masamunt, M.C., Ordás, I., et al. (2015). Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *J. Crohns. Colitis* *9*, 1071–1078.

Kalariya, N.M., Reddy, A.B.M., Ansari, N.H., VanKuijk, F.J.G.M., and Ramana, K. V. (2011). Preventive Effects of Ethyl Pyruvate on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *52*, 5144.

Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X., Yan, Z., et al. (2014). HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med.* *40*, 1–116.

Kang, Z., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Liu, C., Giltiy, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R.M., Bergmann, C., et al. (2010). Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* *32*, 414–425.

Kao, K.K., and Fink, M.P. (2010). The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 151–159.

Kappos, L., Polman, C.H., Freedman, M.S., Edan, G., Hartung, H.P., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Jakobs, P., et al. (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* *67*, 1242–1249.

Kawakami, N., Lassmann, S., Li, Z., Odoardi, F., Ritter, T., Ziemssen, T., Klinkert, W.E.F., Ellwart, J.W., Bradl, M., Krivacic, K., et al. (2004). The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune

encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *199*, 185–197.

Keir, M.E., Francisco, L.M., and Sharpe, A.H. (2007). PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 309–314.

Kim, J.-B., Yu, Y.-M., Kim, S.-W., and Lee, J.-K. (2005). Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain Res.* *1060*, 188–192.

Klune, J.R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T.R., and Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* *14*, 476–484.

Koch, M.W., Mostert, J.P., de Vries, J.J., De Keyser, J., Kappos, L., Polman, C. H., Freedman, M. S., Edan, G., Hartung, H.-P., Miller, D. H., et al. (2007). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* *68*, 1163–1164.

Koprivica, I., Vujičić, M., Gajić, D., Saksida, T., and Stojanović, I. (2018). Ethyl Pyruvate Stimulates Regulatory T Cells and Ameliorates Type 1 Diabetes Development in Mice. *Front. Immunol.* *9*, 3130.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* *6*, 1219–1227.

Kurschus, F.C. (2015). T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomed. J.* *38*, 183–193.

Lang, H.L.E., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., et al. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* *3*, 940–943.

Lassmann, H. (2010). Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Exp. Neurol.* *225*, 2–8.

Lassmann, H., Brück, W., and Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* *7*, 115–121.



- Lassmann, H., Brück, W., and Lucchinetti, C.F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* *17*, 210–218.
- Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Lio, C.-W., Santacruz, N., Peterson, D.A., Stappenbeck, T.S., and Hsieh, C.-S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* *478*, 250–254.
- Laurent, S., Carrega, P., Saverino, D., Piccioli, P., Camoriano, M., Morabito, A., Dozin, B., Fontana, V., Simone, R., Mortara, L., et al. (2010). CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum. Immunol.* *71*, 934–941.
- Lehmann, J.C.U., Listopad, J.J., Rentzsch, C.U., Igney, F.H., von Bonin, A., Hennekes, H.H., Asadullah, K., and Docke, W.-D.F. (2007). Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 835–845.
- Lindner, M., Klotz, L., and Wiendl, H. (2018). Mechanisms underlying lesion development and lesion distribution in CNS autoimmunity. *J. Neurochem.* *146*, 122–132.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* *47*, 707–717.
- Lucchinetti, C.F., Popescu, B.F.G., Bunyan, R.F., Moll, N.M., Roemer, S.F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J.E., Scheithauer, B.W., Giannini, C., et al. (2011). Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2188–2197.
- Lucin, K.M., and Wyss-Coray, T. (2009). Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little? *Neuron* *64*, 110–122.
- Lunde, H.M.B., Assmus, J., Myhr, K.-M., Bø, L., and Grytten, N. (2017). Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *88*, 621–625.
- Lundström, W., Highfill, S., Walsh, S.T.R., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., Alfredsson, L., Olsson, T., Hillert, J., and Mackall, C.L. (2013). Soluble IL7R $\alpha$  potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1761-70.

Lv, T., Miao, Y.-F., Jin, Y.-C., Yang, S.-F., Wu, H., Dai, J., and Zhang, X.-H. (2017). Ethyl Pyruvate Attenuates Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage in the Endovascular Perforation Rabbit Model Possibly Via Anti-inflammation and Inhibition of JNK Signaling Pathway. *Neurochem. Res.* *42*, 1044–1056.

Maggi, P., Sati, P., and Massacesi, L. (2017). Magnetic resonance imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset. *J. Neuroimmunol.* *304*, 86–92.

Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* *108*, 111–165.

Mansilla, M.J., Sellès-Moreno, C., Fàbregas-Puig, S., Amoedo, J., Navarro-Barriuso, J., Teniente-Serra, A., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., and Martínez-Cáceres, E.M. (2015). Beneficial Effect of Tolerogenic Dendritic Cells Pulsed with MOG Autoantigen in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 222–230.

Marrosu, M.G., Muntoni, F., Murru, M.R., Costa, G., Pischedda, M.P., Pirastu, M., Sotgiu, S., Rosati, G., and Cianchetti, C. (1992). HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 \*0201 and \*0302 alleles. *Neurology* *42*, 883–886.

Matthys, P., Vermeire, K., Heremans, H., and Billiau, A. (2000). The protective effect of IFN-gamma in experimental autoimmune diseases: a central role of mycobacterial adjuvant-induced myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 447–454.

May, M.J., and Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* *19*, 80–88.

McLaughlin, K.A., and Wucherpfennig, K.W. (2008). Chapter 4 B Cells and Autoantibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Related Inflammatory Demyelinating Diseases. In *Advances in Immunology*, pp. 121–149.

Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* *106*, 255–258.

Miljković, D., Blazevski, J., Petković, F., Djedović, N., Momcilović, M., Stanisavljević, S., Jevtić, B., Stojković, M.M., and Spasojević, I. (2015). A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant anti-inflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. *J.*

Immunol. 194.

Miljković Đ i Mostarica Stojković M. (2006) Resistance to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis – a tool for studying pathogenesis of the central nervous system autoimmunity. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, Vol.42, No.1, 1-18, Belgrade.

Miller, D.M., Weinstock-Guttman, B., Béthoux, F., Lee, J.C., Beck, G., Block, V., Durelli, L., LaMantia, L., Barnes, D., Sellebjerg, F., et al. (2000). A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult. Scler.* 6, 267–273.

Miron, V.E., Boyd, A., Zhao, J.-W., Yuen, T.J., Ruckh, J.M., Shadrach, J.L., van Wijngaarden, P., Wagers, A.J., Williams, A., Franklin, R.J.M., et al. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* 16, 1211–1218.

Moreau, A., Hill, M., Thébault, P., Deschamps, J.Y., Chiffolleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegon, I., Alliot-Licht, B., and Cuturi, M.C. (2009). Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J.* 23, 3070–3077.

Moreno, M., Guo, F., Mills Ko, E., Bannerman, P., Soulika, A., and Pleasure, D. (2013). Origins and significance of astrogliosis in the multiple sclerosis model, MOG peptide EAE. *J. Neurol. Sci.* 333, 55–59.

Nash, B., Ioannidou, K., and Barnett, S.C. (2011). Astrocyte phenotypes and their relationship to myelination. *J. Anat.* 219, 44–52.

Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 45–56.

Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295.

Noster, R., Riedel, R., Mashreghi, M.-F., Radbruch, H., Harms, L., Haftmann, C., Chang, H.-D., Radbruch, A., and Zielinski, C.E. (2014). IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci. Transl. Med.* 6, 241ra80.

O'Brien, K., Gran, B., and Rostami, A. (2010). T-cell based immunotherapy in experimental

autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunotherapy* 2, 99–115.

Obregon, C., Kumar, R., Pascual, M.A., Vassalli, G., and Golshayan, D. (2017). Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance. *Front. Immunol.* 8, 1514.

Olerup, O., and Hillert, J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1–15.

Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Huang, Y.M., Kivisäkk, P., and Link, H. (2000). Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 120, 147–153.

Palmer, A.M. (2010). Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11, 1313–1323.

Petermann, F., and Korn, T. (2011). Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* 585, 3747–3757.

Phillips, B.E., Giannoukakis, N., and Trucco, M. (2008). Dendritic cell mediated therapy for immunoregulation of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 5, 873–879.

Pikoulas, T.E., and Fuller, M.A. (2012). Dalfampridine: a medication to improve walking in patients with multiple sclerosis. *Ann. Pharmacother.* 46, 1010–1015.

Planas, R., Santos, R., Tomas-Ojer, P., Cruciani, C., Lutterotti, A., Faigle, W., Schaeren-Wiemers, N., Espejo, C., Eixarch, H., Pinilla, C., et al. (2018). GDP-1-fucose synthase is a CD4+ T cell-specific autoantigen in DRB3\*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 10, eaat4301.

Polfliet, M.M.J., van de Veerdonk, F., Döpp, E.A., van Kesteren-Hendrikx, E.M.L., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2002). The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 122, 1–8.

Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., and Dittel, B.N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J. Neurosci. Res.* 81, 374–389.

- Popov, I., Li, M., Zheng, X., San, H., Zhang, X., Ichim, T.E., Suzuki, M., Feng, B., Vladau, C., Zhong, R., et al. (2006). Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. *Arthritis Res. Ther.* 8, R141.
- Raïch-Regué, D., Glancy, M., and Thomson, A.W. (2014). Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application. *Immunol. Lett.* 161, 216–221.
- Raivich, G., and Banati, R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 261–281.
- Ramagopalan, S. V, and Ebers, G.C. (2009). Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome Med.* 1, 105.
- Ramón Y Cajal, S. (1909). *Histologie du Système Nerveux de L'Homme & des Vertébrés.* Paris:Maloiné.
- Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581.
- Rice, G.P.A., Hartung, H.-P., and Calabresi, P.A. (2005). Anti-4 integrin therapy for multiple sclerosis: Mechanisms and rationale. *Neurology* 64, 1336–1342.
- Riedemann, N.C., Guo, R.-F., and Ward, P.A. (2003). Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9, 517–524.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., and Berry, G.P. (1933). Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58, 39–53.
- Robinson, A.P., Caldis, M.W., Harp, C.T., Goings, G.E., and Miller, S.D. (2013). High-mobility group box 1 protein (HMGB1) neutralization ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 43, 32–43.
- 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.
- Saei, A., and Hadjati, J. (2013). Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral

tolerance in health and disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *161*, 293–303.

Salmen, A., and Gold, R. (2014). Mode of action and clinical studies with fumarates in multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* *262*, 52–56.

Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., and Liblau, R.S. (2011). Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* *585*, 3758–3763.

Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Förster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *100*, 1354–1361.

Schumacher, A., Wafula, P.O., Teles, A., El-Mouseleh, T., Linzke, N., Zenclussen, M.L., Langwisch, S., Heinze, K., Wollenberg, I., Casalis, P.A., et al. (2012). Blockage of Heme Oxygenase-1 Abrogates the Protective Effect of Regulatory T Cells on Murine Pregnancy and Promotes the Maturation of Dendritic Cells. *PLoS One* *7*, e42301.

Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., et al. (2013). Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus. *Immunity* *38*, 555–569.

Shi, H., Wang, H.-L., Pu, H.-J., Shi, Y.-J., Zhang, J., Zhang, W.-T., Wang, G.-H., Hu, X.-M., Leak, R.K., Chen, J., et al. (2015). Ethyl Pyruvate Protects against Blood-Brain Barrier Damage and Improves Long-term Neurological Outcomes in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 374–384.

Sims, C.A., Wattanasirichaigoon, S., Menconi, M.J., Ajami, A.M., and Fink, M.P. (2001). Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit. Care Med.* *29*, 1513–1518.

Smith, G., Comrie, M.M., Roland Wolf, C., Dawe, R.S., Clark, C., Evans, A.T., Ferguson, J., and Ibbotson, S.H. (2003). Quantitative Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Analysis of Drug Metabolizing and Cytoprotective Genes in Psoriasis and Regulation by Ultraviolet Radiation. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 390–398.

Sofroniew, M. V (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar

formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.

Sofroniew, M. V, and Vinters, H. V (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.

Song, M., Kellum, J.A., Kaldas, H., and Fink, M.P. (2004). Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 307–316.

Sriram, S., and Steiner, I. (2005). Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 58, 939–945.

Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468–2476.

Steinman, L., and Zamvil, S.S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 60, 12–21.

Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 351–358.

STOSIC-GRUJICIC, S., RAMIC, Z., BUMBASIREVIC, V., HARHAJI, L., and MOSTARICA-STOJKOVIC, M. (2004). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 49–55.

Su, X., Wang, H., Zhu, L., Zhao, J., Pan, H., and Ji, X. (2013a). Ethyl pyruvate ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury through anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neuroscience* 245, 99–108.

Su, X., Wang, H., Zhu, L., Zhao, J., Pan, H., and Ji, X. (2013b). Ethyl pyruvate ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury through anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neuroscience* 245, 99–108.

Sun, Y., Chen, H., Dai, J., Zou, H., Gao, M., Wu, H., Ming, B., Lai, L., Xiao, Y., Xiong, P., et al. (2015). HMGB1 expression patterns during the progression of experimental autoimmune

encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *280*, 29–35.

Swanborg, R.H. (2001). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol. Rev.* *184*, 129–135.

Tai, N., Yasuda, H., Xiang, Y., Zhang, L., Rodriguez-Pinto, D., Yokono, K., Sherwin, R., Wong, F.S., Nagata, M., and Wen, L. (2011). IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. *Clin. Immunol.* *139*, 336–349.

Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011). High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1315–1335.

Tang, D., Billiar, T.R., and Lotze, M.T. (2012). A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. *Mol. Med.* *18*, 1360–1362.

Tasdemir-Yilmaz, O.E., and Freeman, M.R. (2014). Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev.* *28*, 20–33.

Taskapilioglu, O. (2018). ORAL DRUGS SPECIFIC FOR MULTIPLE SCLEROSIS: PAST, TODAY, AND FUTURE. *Arch. Neuropsychiatry* *55*, S15–S20.

Toft-Hansen, H., Füchtbauer, L., and Owens, T. (2011). Inhibition of reactive astrocytosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease. *Glia* *59*, 166–176.

Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C.J., Fink, M.P., and Tracey, K.J. (2002). Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12351–12356.

Vaughn, C.B., Jakimovski, D., Kavak, K.S., Ramanathan, M., Benedict, R.H.B., Zivadinov, R., and Weinstock-Guttman, B. (2019). Epidemiology and treatment of multiple sclerosis in elderly populations. *Nat. Rev. Neurol.*

Venkataraman, R., Kellum, J.A., Song, M., and Fink, M.P. (2002). Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide-induced shock. *Shock* *18*,



507–512.

Voskuhl, R.R., Peterson, R.S., Song, B., Ao, Y., Morales, L.B.J., Tiwari-Woodruff, S., and Sofroniew, M. V (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J. Neurosci.* *29*, 11511–11522.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.-P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* *18*, 605–617.

Wang, J., Liu, P., Xin, S., Wang, Z., and Li, J. (2017). Nrf2 suppresses the function of dendritic cells to facilitate the immune escape of glioma cells. *Exp. Cell Res.* *360*, 66–73.

Wang, Q., Ding, Q., Zhou, Y., Gou, X., Hou, L., Chen, S., Zhu, Z., and Xiong, L. (2009). Ethyl Pyruvate Attenuates Spinal Cord Ischemic Injury with a Wide Therapeutic Window through Inhibiting High-mobility Group Box 1 Release in Rabbits. *Anesthesiology* *110*, 1279–1286.

Wang, Y., Yin, P., Huang, S., Wang, J., and Sun, R. (2013a). Ethyl pyruvate protects against lipopolysaccharide-induced white matter injury in the developing rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* *31*, 181–188.

Wang, Y., Li, B., Li, Z., Huang, S., Wang, J., and Sun, R. (2013b). Improvement of hypoxia-ischemia-induced white matter injury in immature rat brain by ethyl pyruvate. *Neurochem. Res.* *38*, 742–752.

WANG, D., and BORDEY, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.*

Wei, H.-J., Gupta, A., Kao, W.-M., Almudallal, O., Letterio, J.J., and Pareek, T.K. (2018). Nrf2-mediated metabolic reprogramming of tolerogenic dendritic cells is protective against aplastic anemia. *J. Autoimmun.* *94*, 33–44.

Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* *50*, 57–60.

Westerlind, H., Boström, I., Stawiarz, L., Landtblom, A.-M., Almqvist, C., and Hillert, J. (2014). New data identify an increasing sex ratio of multiple sclerosis in Sweden. *Mult. Scler.* *20*, 1578–1583.

Wheeler R.D and Owens, T. (2005): The changing face of cytokines in the brain: perspectives from EAE. *Curr. Pharm. Des.* 11:1031-1037.

Willekens, B., and Cools, N. (2018). Beyond the Magic Bullet: Current Progress of Therapeutic Vaccination in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 32, 401–410.

Wilson, N.S., El-Sukkari, D., and Villadangos, J.A. (2004). Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 103, 2187–2195.

Woodberry, T., Bouffler, S., Wilson, A., Buckland, R., and Brüstle, A. (2018). The Emerging Role of Neutrophil Granulocytes in Multiple Sclerosis. *J. Clin. Med.* 7, 511.

Wraith, D.C. (2017). The Future of Immunotherapy: A 20-Year Perspective. *Front. Immunol.* 8, 1668.

Wu, J., and Horuzsko, A. (2009). Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Hum. Immunol.* 70, 353–356.

Yang, R., Gallo, D.J., Baust, J.J., Uchiyama, T., Watkins, S.K., Delude, R.L., and Fink, M.P. (2002). Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G212-21.

Yang, R., Uchiyama, T., Alber, S.M., Han, X., Watkins, S.K., Delude, R.L., and Fink, M.P. (2004). Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit. Care Med.* 32, 1453–1459.

Yang, R., Zou, X., Koskinen, M.-L., and Tenhunen, J. (2012). Ethyl pyruvate reduces liver injury at early phase but impairs regeneration at late phase in acetaminophen overdose. *Crit. Care* 16, R9.

Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63–66.

Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617–627.

Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., and Feldmann, M. (2001). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* *13*, 675–683.

Yuan, Y., Su, Z., Pu, Y., Liu, X., Chen, J., Zhu, F., Zhu, Y., Zhang, H., and He, C. (2012). Ethyl pyruvate promotes spinal cord repair by ameliorating the glial microenvironment. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 749–763.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Neda (Gojko) Đedović rođena je 30. jula 1989 u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/2009 na smeru Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne studije završila je 2014. godine sa prosečnom ocenom 7,82. Iste godine upisala je Master studije na Biološkom fakultetu, na smeru Imunobiologija i završila ih 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,50. Master rad pod nazivom "Uticaj etil piruvata na produkciju interferona gama i interleukina 17 u pacovskim i humanim T limfocitima" uradila je pod mentorstvom dr Đorđa Miljkovića na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Master rad je odbranila sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisala 2015/2016. godine i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,73.

Neda se 2016. godine zaposlila kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razloga Republike Srbije (OI173013). Od četvrte godine studija do zasnivanja radnog odnosa volontirala je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Zvanje istraživač saradnik stiče 14.06.2018. Neda Đedović je do sada autor/koautor na 13 radova u međunarodnim časopisima, ima dva saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i tri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Član je Društva imunologa Srbije, Društva za neuronauke Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, a samim tim i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Federacije evropskih neuronaučnih društava (Federation of European Neuroscience Societies, FENS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Neda Đedović je učestvovala u organizaciji i realizaciji projekata promocije imunologije u Srbiji, u sklopu proslave svetskog dana imunologije (29.04.2016) na poziv IUS (International Union of Immunological Societies), a na temu „Imunoterapija“. Ova promocija je nagrađena od strane IUIS kao kampanja sa najboljom temom. Takođe, dobitnica je dve stipendije za stručno usavršavanje na Germans Trijas i Pujol Univerzitetskoj bolnici i istraživačkom institutu u Španiji, COST AFACTT Short-term Scientific Mission 2016.godine i EFIS-IL Short-term Fellowship 2018.godine.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Неда Ђедовић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3029/2015 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису»

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Неда Ђедовић

Број индекса Б3029/2015

Студијски програм Биологија-имунобиологија

Наслов рада «Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису»

Ментор др Ђорђе Миљковић

Потписани/а \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

«Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису»

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.