

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena Z. Tasić

**Ispitivanje protektivnog dejstva
grafenskih kvantnih tačaka u modelu
neuroinflamacije kod pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Jelena Z. Tasić

**Examination of protective effect of
graphene quantum dots in a model of
neuroinflammation in rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR:

Prof. dr **Aleksandra Isaković,**

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

KOMENTOR:

Prof. dr **Vladimir Trajković,**

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr **Dušan Popadić,**

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

2. Doc. dr **Željka Stanojević,**

Docent, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

3. Prof. dr **Vladislav Volarević,**

Vanredni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka

4. Dr sci. **Verica Paunović**

Naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

5. Dr sci. **Svetlana Jovanović Vučetić**

Viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ u okviru Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“ u okviru Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Svom mentoru, prof. dr Aleksandri Isaković se zahvaljujem na ukazanom poverenju, strpljenju, toploj atmosferi kao i ličnoj i profesionalnoj podršci tokom izrade ove doktorske teze. Takođe, zahvaljujem se i na pomoći tokom finalizacije doktorske disertacije.

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću se zahvaljujem na korisnim savetima, inovativnim idejama, pomoći oko tumačenja rezultata i finalnog oblikovanja doktorske teze.

Prof. dr Dušanu Popadiću i prof. dr Vladislavu Volareviću se zahvaljujem na pomoći pri oblikovanju doktorske disertacije.

Dr sci. Zoranu Markoviću i dr sci. Svetlani Jovanović Vučetić se zahvaljujem na sintezi ugljeničnih nanočestica i korisnim savetima pri pisanju doktorske teze.

Neizmernu zahvalnost dugujem doc. dr Željki Stanojević koja me je naučila prvim koracima rada sa eksperimentalnim životinjama, nesebično delila svoje znanje tokom proteklih godina i svojim sugestijama pomogla u uobličavanju ove disertacije. Veliko hvala asist. dr Sašenki Vidičević na prisustvu i nesebičnoj pomoći u svakom eksperimentu koji je bio deo ove teze, kao i u mnogim drugim. Zahvaljujem se dr Nini Tomonjić na podršci pri pisanju disertacije. Njihova kolegijalnost, prijateljska podrška i pozitivna energija svakodnevnog rad čine lakšim i lepšim.

Dr sci. Saši Petričeviću se zahvaljujem na pomoći tokom eksperimentalnog rada sa životinjama.

Akademiku prof. dr Vladimiru Bumbašireviću, prof. dr Tamari Kravić-Stevović, asist. dr Tamari Martinović i asist. dr Darku Ćiriću se zahvaljujem na pomoći pri izradi histoloških preparata i njihovom tumačenju.

Dr sci. Verici Paunović se zahvaljujem na pomoći pri izradi i tumačenju rezultata koji se tiču protočne citofluorimetrije, a koji su značajno doprineli kvalitetu doktorske disertacije.

Prof. dr Ivanki Marković i prof. dr Sonji Misirlić-Denčić se zahvaljujem na podršci i prijateljskoj atmosferi koja svakodnevni rad na institutu čine lepšim.

Zahvaljujem se celokupnom kolektivu Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu na prijatnoj radnoj atmosferi, a posebnu zahvalnost dugujem Nadi Bojović, Sanji Čabarkapi i Nikoli Mičiću, čija je pomoć u mnogome olakšala laboratorijski rad.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, na безусловnoj podršci i ljubavi, svojoj sestri koja je bila moj najveći motivator i verovala da ja to mogu, kao i suprugu na razumevanju i podršci tokom izrade ove teze.

SAŽETAK

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je jedan od najizučavanijih animalnih modela neuroinflamacije i najčešće je korišćen animalni model multiple skleroze (MS). Grafenske kvantne tačke (GKT) su tanki listići grafena (<100 nm), elipsastog oblika, sačinjeni iz 1-10 slojeva grafena. U biološkim sistemima, GKT mogu da ispoljavaju prooksidativno i antioksidativno dejstvo a u skorašnjim studijama je pokazano i njihovo imunomodulatorno dejstvo. S toga je cilj ovog istraživanja je bio da se ispita efekat primene GKT na klinički tok bolesti i inflamaciju centralnog nervnog sistema (CNS) u EAE modelu kao i celularne i molekularne mehanizme koji se nalaze u osnovi potencijalnog povoljnog efekta. Efekat GKT kao i mehanizmi njihovog delovanja su ispitivani primenom *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo* pristupa. Za indukciju EAE korišćeni su pacovi *Dark Agouti* (DA) soja koji su imunizovani homogenatom kičmene moždine pacova u kompletnom Frojndovom adjuvansu. U cilju definisanja faze bolesti u kojoj GKT ostvaruju svoje potencijalno povoljno dejstvo, životinje su tretirane sa GKT (10 mg/kg tt, ip) tokom induktivne, efektorske ili obe faze bolesti. Ispitivanje lokalizacije GKT u tkivima životinja, analiza limfocitne infiltracije i apoptoze ćelija CNS i demijelinizacije vršeno je odgovarajućim histološkim metodama. Koristeći tkiva drenirajućeg limfnog čvora koji oslikava aktivnost induktivne faze bolesti i kičmene moždine (KM) koja oslikava aktivnost efektorske faze bolesti, metodom protočne citofluorimetrije je vršena fenotipska karakterizacija izolovanih mononuklearnih ćelija, qRT-PCR metodom ispitivana ekspresija gena za medijatore inflamacije a imunoblotom analizirana aktivacija proteina koji učestvuju u autofagiji i Akt/MAPK signalnim putevima. U *in vitro* modelu kokultivacije oligodendrocita i neurona sa stimulisanim limfocitima ispitan je

protektivan efekat GKT tretmana, MTT testom. Najizraženiji protektivan efekat na klinički tok bolesti GKT su ispoljile kada su primenjene tokom obe faze bolesti. Primena GKT je smanjila limfocitnu infiltraciju, demijelinizaciju, oštećenje aksona i apoptozu (pretežno) oligodendrocita u CNS imunizovanih životinja. GKT su takođe smanjile Th1 ćelijski odgovor što je pokazano smanjenom procentualnom zastupljenošću CD3⁺IFN- γ ⁺ ćelija kao i iRNK za T-bet, IFN- γ i ostalih medijatora inflamacije (IL-1 β , TNF, GM-CSF) u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora i KM imunizovanih pacova. Dodatno, GKT su modulisale signalni put autofagije i Akt/MAPK signalni put. Sposobnost akumulacije GKT u tkivima i ćelijama imunskog sistema i CNS je doprinela njihovom protektivnom svojstvu što je pokazano i *in vitro*, na modelu kokultivacije ćelija nervnog sistema (oligodendrociti i neuroni) sa ConA stimulisanim limfocitima. Pretretman sa GKT štiti oligodendrocite i neurone od oštećenja posredovanog stimulisanim limfocitima. Istovremeno, GKT suprimiraju produkciju medijatora inflamacije što je pokazano smanjenom ekspresijom iRNK za T-bet, IFN- γ , IL-1 β , TNF, GM-CSF kao i ROR- γ t. Na osnovu dobijenih rezultata, možemo zaključiti da GKT ostvaruju povoljan terapijski efekat na kliničko ispoljavanje EAE delujući direktno i na ćelije imunskog sistema i na ćelije CNS-a kao i modulacijom autofagije, MAPK/Akt signalnog puta i Th1 imunskog odgovora.

Ključne reči: grafenske kvantne tačke, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, neuroinflamacija, apoptoza, demijelinizacija, autofagija, MAPK

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

SUMMARY

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is one of the most studied animal models of neuroinflammation and also, one of the most commonly used animal models of multiple sclerosis (MS). Graphene quantum dots (GQD) are thin ellipsoidal graphene sheets (<100 nm), made of 1-10-layer thick sheets of graphene. GQD exhibit prooxidative and antioxidative effect in biological systems. Also, previous studies show its immunomodulatory effect. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of GQD on clinical course of a disease and central nervous system (CNS) inflammation in EAE model, as well as cellular and molecular mechanisms underlying its potential protective effect. The effect of GQD and its mechanisms of action were examined using *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* approaches. *Dark Agouti* (DA) rats were immunized with spinal cord homogenate in complete Freund's adjuvant, in order to induce EAE. GQD treatment (10 mg/kg bw, ip) was administrated during the inductive, effector and both phases of a disease. Using the appropriate histological approaches, the presence of lymphocyte infiltration, apoptosis and demyelination of CNS was investigated, as well as the ability of GQD to accumulate in cells of immune system and CNS. Flow cytometry analysis was used to determine phenotype characterization of mononuclear cells isolated from the draining lymph nodes (inductive phase) and spinal cord (SC) tissue (effector phase), while the level of mRNA for the inflammatory mediators was determined by qRT-PCR. Autophagy and Akt/MAPK signaling pathways in draining lymph nodes and SC tissue were investigated using immunoblot assay while the protective effect of GQD treatment on oligodendrocytes and neuronal cells that were co-cultivated with ConA stimulated lymphocytes *in vitro*, was verified by MTT test. GQD treatment had the most prominent protective effect on clinical score

when applied throughout the course of the disease. Immune infiltration, apoptotic death of (mostly) oligodendrocytes, demyelination and axonal damage in the CNS of EAE animals were reduced by GQD treatment. Furthermore, GQD treatment reduced Th1 cell response which was demonstrated by a reduced percent of CD3⁺IFN- γ ⁺ cells, as well as the level of mRNA for T-bet and IFN- γ , as well as other mediators of inflammation (IL-1 β , TNF and GM-CSF) in draining lymph node and CNS immune infiltrate of EAE treated animals. Additionally, autophagy and Akt/MAPK signaling pathways were modulated. The ability of GQD to accumulate in tissues and cells of immune system and CNS contributes its protective effect. Oligodendrocytes and neurons were protected from T cell mediated damage *in vitro* while, at the same time, the level of mRNA for T-bet, IFN- γ , IL-1 β , TNF, GM-CSF and ROR- γ t was reduced in ConA stimulated T cells. Based on the given results, we can conclude that GQD treatment has beneficial therapeutic effect on a clinical manifestation of EAE acting directly on both immune and CNS cells. Also, GQD modulate autophagy, Akt/MAPK signaling pathway and Th1 cell response.

Keywords: graphene quantum dots, experimental autoimmune encephalomyelitis, neuroinflammation, apoptosis, demyelination, autophagy, MAPK

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. UGLJENIČNI NANOMATERIJALI.....	1
<i>1.1.1. Biološka dejstva ugljeničnih nanomaterijala.....</i>	<i>5</i>
1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS.....	6
1.3. IMUNOPATOGENEZA EAE.....	9
<i>1.3.1. T ćelijske subpopulacije u limfocitnom infiltratu CNS</i>	<i>11</i>
1.4. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA, APOPTOZE I AUTOFAGIJE U NEUROINFLAMACIJI.....	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA UGLJENIČNIH NANOČESTICA.....	20
3.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	22
3.3. INDUKCIJA I KLINIČKA PROCENA EAE	23
<i>3.3.1. Imunizacija životinja.....</i>	<i>23</i>
<i>3.3.2. Praćenje kliničke slike</i>	<i>23</i>
<i>3.3.3. Tretman pacova ugljeničnim nanočesticama.....</i>	<i>24</i>
3.4. HISTOLOŠKA ANALIZA.....	25
<i>3.4.1. Ispitivanje limfocitnih infiltrata u CNS.....</i>	<i>25</i>
<i>3.4.2. Ispitivanje apoptoze unutar CNS</i>	<i>25</i>
<i>3.4.3. Ispitivanje demijelinizacije</i>	<i>26</i>
<i>3.4.4. Ultrastrukturalna analiza ćelija i tkiva.....</i>	<i>27</i>
3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE I PROTOČNA CITOFLUORIMETRIJA ...	28
<i>3.5.1. Detekcija membranskih i unutarćelijskih antigena mononuklearnih ćelija.....</i>	<i>28</i>
3.6. ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE GENA	29
<i>3.6.1. Izolacija RNK</i>	<i>30</i>

3.6.2. Reverzna transkripcija.....	30
3.6.3. Kvantitativni PCR (qRT-PCR).....	31
3.6.4. Prajmeri i probe	32
3.7. IMUNOBLOT ANALIZA	33
3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	33
3.7.2. Kvantifikacija ekspresije i aktivnosti proteina.....	34
3.8. KULTIVISANJE ĆELIJA IN VITRO	36
3.8.1. Izolacija i uspostavljanje primarne kulture oligodendrocita pacova	37
3.8.2. Izolacija i uspostavljanje primarne kulture neurona pacova	37
3.8.3. Izolacija mononuklearnih ćelija	38
3.9. ISPITIVANJE EFEKTA GKT NA ĆELIJAMA	39
3.9.1. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija	39
3.9.2. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija u prisustvu aktiviranih T limfocita.....	39
3.9.3. Ispitivanje efekta GKT na ekspresiju gena za medijatore inflamacije u limfocitima stimulisanim sa ConA	40
3.9.4. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet oligodendrocita i neurona u prisustvu supernatanta ConA stimulisanih limfocita.....	40
3.9.5. Ispitivanje ćelijskog vijabiliteta	40
3.10. STATISTIČKA ANALIZA	41
4. REZULTATI.....	42
4.1. KARAKTERIZACIJA UGLJENIČNIH NANOĀESTICA	42
4.2. ISPITIVANJE UTICAJA TRETMANA UGLJENIČNIM NANOĀESTICAMA NA KLINIĀKI TOK EAE	45
4.2.1. KKT, fulerenol i GO ne utiĀu na kliniĀki tok EAE	45
4.2.2. GKT smanjuju kliniĀke simptome EAE.....	46
4.3. ISPITIVANJE UTICAJA GKT NA PROMENE U CNS TOKOM EAE.....	49
4.3.1. GKT smanjuju limfocitnu infiltraciju CNS u EAE	49

4.3.2. <i>Tretman GKT smanjuje procenat apoptotičnih ćelija u KM tokom EAE</i>	51
4.3.3. <i>GKT smanjuju demijelinizaciju u EAE</i>	53
4.4. MOLEKULARNI MEHANIZMI DEJSTVA GKT NA ĆELIJE IMUNSKOG SISTEMA TOKOM INDUKTIVNE I EFEKTORSKE FAZE EAE	56
4.4.1. <i>GKT smanjuju proinflamatorni i Th1 odgovor u EAE</i>	56
4.4.2. <i>GKT povećavaju aktivnost MAPK i Akt signalnih puteva u EAE</i>	58
4.4.3. <i>GKT modulišu autofagiju u EAE</i>	60
4.5. AKUMULACIJA GKT U TKIVIMA I ĆELIJAMA IMUNSKOG I NERVOG SISTEMA	62
4.6. CITOPROTEKTIVNO DEJSTVO GKT IN VITRO	63
4.6.1. <i>GKT nisu citotoksične za OLN93 i PC12 ćelije</i>	64
4.6.2. <i>GKT štite oligodendrocite i neurone od oštećenja izazvanog T limfocitima</i>	65
5. DISKUSIJA	68
6. ZAKLJUČCI:	78
7. REFERENCE:	79

1. UVOD

1.1. UGLJENIČNI NANOMATERIJALI

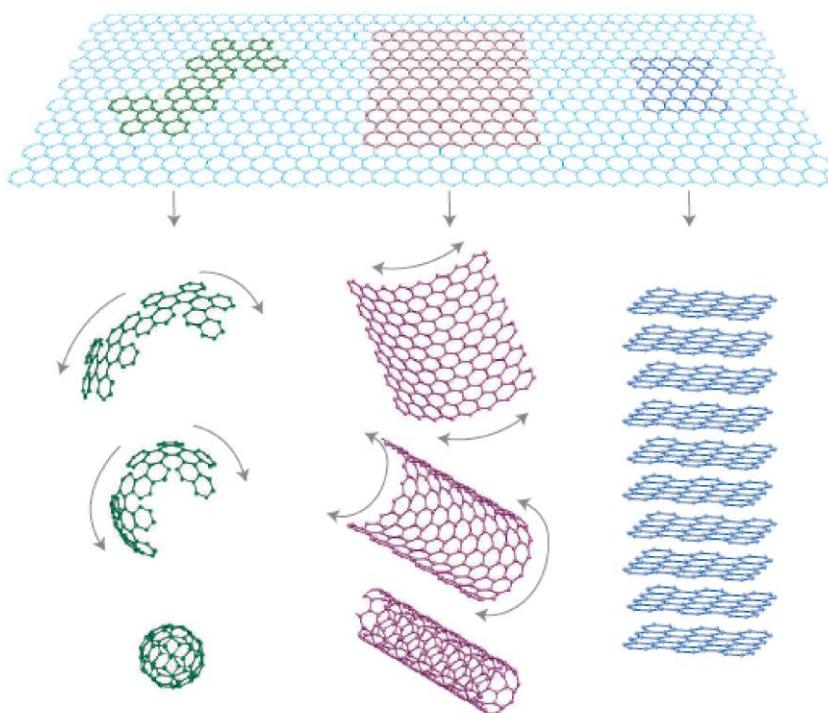
Ugljenični nanomaterijali su čestice ugljenika čija je bar jedna dimenzija u nanometarskoj skali (1). Ugljenik je šesti element u periodnom sistemu elemenata i predstavlja osnovnu jedinicu građe svih ugljeničnih nanomaterijala. Zahvaljujući sp^2 hibridizaciji, ugljenikovi atomi formiraju jake kovalentne veze. Usled razlika u međusobnom vezivanju ugljenikovih atoma i atomskoj strukturi nastaju njegovi alotropi koji se razlikuju po svojim fizičkim, hemijskim i morfološkim osobinama. Neke od poznatih alotropskih modifikacija ugljenika su: dijamant, fuleren, amorfni ugljenik, ugljenične nanocevi i grafit iz kojeg je dobijen grafen (2).

Fuleren se najčešće nalazi u formi bakminsterfulerena sa 60 ugljenikovih atoma (C_{60}). Sp^2 hibridizovani atomi ugljenika su organizovani u oblik poznat kao skraćeni ikozaedar (3). Dodavanjem polarnih funkcionalnih grupa se prevazilazi njegova slaba rastvorljivost i niska biokompatibilnost. Tako, hidroksilacijom fulerena nastaju fulerenoli ($C_{60}(OH)_n$) čiji broj OH grupa varira ($2 \leq n \leq 44$). Veličina stabilnih nanoklastera fulerenola se kreće u intervalu od 10 do 250 nm i zavisi od pH rastvora, koncentracije fulerena i broja OH grupa (4).

Ugljenične nanocevi su sačinjene od urolanih grafenskih ploča, što im daje cilindričnu strukturu. Prečnik nanocevi može biti manji od 1 nm dok dužina iznosi i nekoliko mikrometara. U zavisnosti od broja ugljenikovih atoma, mogu se naći u formi jednoslojnih ili višeslojnih nanocevi. Karakterišu se niskom rastvorljivošću koja se prevazilazi dodavanjem organskih funkcionalnih grupa, čime je omogućena njihova primena u biološkim sistemima (5-7). Zahvaljujući velikoj površini mogu biti konjugovani sa različitim molekulima, a sp^2 hibridizovani ugljenikovi atomi i podesive fizičke karakteristike (prečnik, dužina, broj slojeva grafenskih ploča) im daju dobra električna i optička svojstva (7).

Grafen se prvi put pominje 1968. godine, kada je okarakterisan kao jednoslojan list ugljenikovih atoma. Hans Peter Boem (*Hanns-Peter Boehm*) je 1960. godine, metodom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) primetio jedan ili nekoliko slojeva grafena oksida (8), a pojam „grafen” je uveden 1987. godine (9). Nekoliko decenija kasnije (2010. godine), dvojica fizičara ruskog porekla, Andrej Gejm (Andre Geim) i Konstantin Novoselov sa Univerziteta u Mančesteru (Velika Britanija) su dobila Nobelovu nagradu u oblasti fizike za revolucionarne eksperimente kojima su uspeli da izoluju dvodimenzionalni grafen tokom 2004. godine (8). Primenjujući takozvani metod „lepljive trake“, zasnovan na raslojavanju visoko orijentisanog pirolitičkog grafita, dobijali su slojeve grafena različite debljine koje su prenosili na silicijumsku podlogu metodom suvog ili vlažnog transfera (10). Ovaj veoma jednostavan metod omogućava izolaciju visokokvalitetnog, čistog jednoslojnog grafena uz minimalna oštećenja dobijenih grafenskih ploča. Međutim, zbog nemogućnosti široke primene i niske reproducibilnosti, grafen dobijen na ovaj način se koristi uglavnom u bazičnim istraživanjima (8).

Grafen se sastoji od jednog sloja sp^2 hibridizovanih ugljenikovih atoma, organizovanih u dvodimenzionalnu heksagonalnu rešetku koja podseća na strukturu saća. Sp^2 hibridizovane orbitale atoma ugljenika omogućavaju formiranje jakih kovalentnih σ veza između jednog i tri susedna atoma ugljenika. Ove kovalentne veze su odgovorne za stabilnost i čvrstinu rešetke, kao i za elastične osobine grafena. Interakcije između preostalih susednih nehibridizovanih $2p_z$ orbitala grade delokalizovane $\pi=\pi$ veze koje se nalaze iznad atomske ravni i odgovorne su za termalnu i električnu provodljivost (11). Planarni grafen je nestabilan i ne može se naći u prirodi, zbog čega zauzima različite forme - umotan u fullerene, urolan u nanocevi ili naslagan u grafit (Slika 1) (10, 12). U zavisnosti od načina sinteze grafena nastaju različiti defekti, a heteroatomi i funkcionalne grupe koje mogu biti vezane za površinu ugljeničnih materijala, određuju njihova strukturalna i fizičko-hemijska svojstva. Funkcionalne grupe poput epoksidnih (O-C-O), hidroksilnih (C-OH), karbonilnih (C=O) i karboksilnih (COOH) predstavljaju reaktivna mesta i utiču na njihovu rastvorljivost i biokompatibilnost (13, 14). Zahvaljujući dobrim električnim, optičkim, termalnim i mehaničkim osobinama, grafen se istražuje u mnogim oblastima nauke.



Slika 1. Različite forme planarnog grafena: levo- fuleren; sredina- nanocevi; desno- grafit. Preuzeto i modifikovano iz rada Geim AK, Novoselov KS. *The rise of graphene. Nat Mater.* 2007; 6:183-91. (12).

Grafen oksid (GO) predstavlja oksidovanu formu grafena čije lateralne dimenzije iznose i po nekoliko stotina nanometara (13, 15, 16). Iako prisustvo kiseonika u funkcionalnim grupama grafen oksida remeti njegova električna i mehanička svojstva, sa druge strane omogućava bolju rastvorljivost u vodi i mogućnost kovalentne modifikacije. GO je često korišćen kao prekursor u sintezi različitih grafenskih struktura poput grafenskih kvantnih tačaka (GKT) i karbonskih kvantnih tačaka (KKT) koje, zahvaljujući izrazito malim dimenzijama, ostvaruju interakcije sa biološkim strukturama na nivou atoma (17). Ovi materijali su manji oblici njihovih prekursora, čije lateralne dimenzije ne prelaze 100 nm. Zahvaljujući optičkim svojstvima - širokom apsorpcionom spektru i veoma uskom emisionom spektru, uz visoku otpornost na gubitak fotoluminiscencije usled degradacije molekularne strukture (engl., *photobleaching*), kvantne tačke se koriste kao fluorescentne probe u biomedicinskim istraživanjima (17).

Grafenske kvantne tačke (GKT) se sastoje iz jednog ili više slojeva grafena, elipsastog su oblika i bočnih dimenzija od 1,5 - 100 nm. Središte GKT obično ima heksagonalnu strukturu grafena dok su ivice cik-cak nazubljene (18). U prisustvu oksigenisanih funkcionalnih grupa, elektrohemijaska svojstva GKT nalikuju na osobine GO ili njegovu redukovanu formu (19). Fotoluminiscentna svojstva GKT su posledica kvantnog ograničenja koje potiče od π -elektrona u sp^2 hibridizovanoj mreži ugljenikovih atoma. Fotoluminiscentna svojstva mogu zavisiti od veličine, konfiguracije ivica, oblika i funkcionalnih grupa (20), a cik-cak ivice GKT imaju emisione spektre koji variraju od dubokog UV (235,2 nm) do infracrvenog (999,5 nm) dela spektra (21). Grafenske kvantne tačke se mogu sintetisati primenom različitih metoda „top down“ i „bottom up“ pristupa. „Top down“ metode se baziraju na eksfolijaciji grafenskih materijala mehaničkim, hemijskim i elektrohemijskim putem (18), čime dolazi do slabljenja *van der Waals* veza između slojeva grafita. Na ovaj način nije moguće kontrolisati veličinu i morfologiju dobijenih čestica (8). Sa druge strane, „bottom up“ metode podrazumevaju kontrolisanu sintezu GKT iz malih gradivnih blokova. Postupci koji se primenjuju u ovim metodama su veoma kompleksni i zasnivaju se na postepenoj fuziji malih aromatičnih molekula ili reakcijama kondenzacije pomoću pirolize i karbonizacije organskih jedinjenja (21). Zagrevanjem organskih jedinjenja iznad njihove tačke topljenja dolazi do kondenzacije, nukleacije i posledičnog formiranja mreže sp^2 hibridizovanih ugljenikovih atoma. Primena čvrstih nosača kao što su platina, bakar i nikel može olakšati taloženje ugljenikovih atoma u planarne strukture (8, 21).

Karbonske kvantne tačke (KKT) su, za razliku od GKT, više sferične i amorfne, mada mogu da budu i u obliku kristalne rešetke sačinjene uglavnom od sp^3 hibridizovanih ugljenikovih atoma (22). Neke studije ukazuju na postojanje strukture dijamanta sa sp^3 hibridizovanim ugljenikovim atomima (23). KKT su hemijski inertne, rastvorljive i otporne na gubitak fotoluminiscence, koja za razliku od GKT sa ivičnim defektima, potiče od površinskih defekata. Zahvaljujući svojim električnim svojstvima, po ozračivanju se mogu ponašati kao donori ili akceptori elektrona, a mogu se koristiti i kao biosenzori (24). U poređenju sa GKT, KKT su manje atraktivne za elektrohemijisku primenu zbog manje specifične površine, slabije uređenosti i amorfne strukture (19).

1.1.1. Biološka dejstva ugljeničnih nanomaterijala

Imajući u vidu visoku biokompatibilnost, dobru rastvorljivost, kao i mogućnost ulaska u ćelije, svojstva ugljeničnih nanomaterijala su ispitivana u različitim biološkim sistemima. U skladu sa tim, pored značajne primene kao prekursora u sintezi različitih grafenskih struktura, GO je korišćen u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Iako postoje podaci u prilog tome da ploče GO teško ulaze u ćeliju (15, 25), Wang i saradnici su pokazali sposobnost njihove akumulacije u citoplazmi i jedru fibroblasta (26). Toksikološke studije o biodistribuciji i eliminaciji GO iz organizma ukazuju na sposobnost akumulacije u plućima (27), jetri i slezini (28). Zahvaljujući velikoj površini, GO se može koristiti kao nosač lekova (29). Međutim, usled dugog zadržavanja i otežanog izlučivanja iz organizma, njegova primena u *in vivo* studijama je diskutabilna (16). Sa druge strane, zahvaljujući dobrim električnim svojstvima, fotoluminiscenci, biokompatibilnosti i niskoj toksičnosti, GKT predstavljaju dobru alternativu poluprovodničkim neorganskim kvantnim tačkama (npr. CdSe, CdTe) koje su korišćene kao probe za „bioimidžing“ (30). GKT imaju veliki potencijal za primenu u biološkim sistemima obzirom da, nakon ekscitacije plavim svetlom proizvode reaktivne kiseonične vrste. Ovo ih čini dobrim kandidatima za primenu u fotodinamičkoj terapiji (30). Fotodinamičkim dejstvom GKT ubijaju bakterije (31) i tumorske ćelije indukcijom autofagije i apoptoze (32). Sa druge strane, neozračene GKT nisu citotoksične za tumorske ćelije (32), niti utiču na vijabilitet, proliferaciju, metaboličku aktivnost i diferencijaciju humanih neuronalnih stem ćelija (33). Slično za KKT je pokazano odsustvo citotoksičnog dejstva na HepG2 (22), MCF-7 i HT-29 (34) tumorskim ćelijskim linijama, kao i na 293T ćelijama bubrega (35). Odsustvo toksičnog efekta GKT i KKT je pokazano i *in vivo*, pri čemu su, iako akumulirane u jetri i slezini, postepeno izlučivane iz organizma (36-38).

Fulerenoli, zahvaljujući svom antioksidativnom svojstvu, predstavljaju dobre kandidate u lečenju neurodegenerativnih bolesti u kojima dolazi do apoptoze neurona kao posledice oksidativnog stresa (39). Takođe, imaju hepatoprotektivna (40) i citoprotektivna svojstva (41), kao i sposobnost da neutrališu citotoksično dejstvo doksorubicina (42). S druge strane, fotodinamička aktivacija solubilnih derivata fulerena je toksična za tumorske ćelije kolona, cerviksa, larinksa i pluća (43). Pored

antioksidativnog svojstva, za fulerenole je pokazan i antiinflamatoran efekat na modelu karagenanom indukovanoj edema šape kod pacova (44).

Ugljenične nanočestice se mogu potencijalno koristiti kao nosači lekova (45-47) dok sposobnost ulaska u ćelije i prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (48-50) pruža mogućnost za njihovu primenu u lečenju neuroloških oboljenja (21). Takođe je pokazano da ugljenične nanočestice poput fulerena, GO, karbonskih nanotuba i GKT imaju imunomodulatorna svojstva. Derivati fulerena smanjuju neuroinflamaciju (51) i suprimiraju ćelijski odgovor posredovan T limfocitima u stečenoj imunosti (52). Pored toga, GO je toksičan za limfocite i dovodi do njihove apoptoze (53), dok karbonske nanocevi stimulišu produkciju IL-1 β i IL-6 nakon hronične aplikacije miševima, kao i *in vitro*, u makrofagima (54). Protektivno i antiinflamatorno dejstvo neozračenih GKT je pokazano *in vivo* u modelu fulminantnog hepatitisa kod miševa (55), dok je proinflamatorni T ćelijski odgovor suprimiran indukcijom tolerogenih dendritskih ćelija (56). Međutim, u ćelijskoj liniji humanih monocita GKT su izazvale proinflamatorni odgovor indukcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (57).

1.2. EKSPERIMENTALNI AUTOIMUNSKI ENCEFALOMIJELITIS

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je animalni model neuroinflamacije, koja se nalazi u osnovi demijelinizujućih bolesti kao što su multipla skleroza (MS) i akutni diseminovani encefalitis. Saznanja o patogenezi MS su zasnovana na proučavanju EAE modela. Naime, kako se odgovor na pitanja koja se odnose na početak bolesti, regulaciju relapsa/remisija i lokalizacije lezija unutar centralnog nervnog sistema (CNS) ne može dobiti iz kliničkih studija, neophodno je postojanje odgovarajućih animalnih modela (58). Zbog velikog broja molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi demijelinizacije, razvijena su tri eksperimentalna animalna modela, pri čemu svaki reprodukuje različitu etiologiju samog procesa:

1. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE),
2. Kuprizonski model
3. Encefalomijelitis izazvan Theilerovim mišijim virusom (TMEV) (59)

Među pomenutim modelima, EAE je najčešće korišćen. Karakteriše se prisustvom inflamatornih infiltrata (sačinjenih od T i B limfocita i makrofaga) koji uzrokuju stvaranje fokalnih demijelinizujućih plakova u CNS, što rezultuje različitim neurološkim ispadima. U EAE modelima se koriste različite životinjske vrste, najčešće iz roda glodara. U zavisnosti od autoantigena koji se koristi za imunizaciju i životinjskog soja, varira i imunizacioni protokol. U EAE modelima dolazi do razvoja lezija koje nalikuju lezijama koje se javljaju kod pacijenata obolelih od MS (58), pri čemu se bolest najčešće manifestuje kao paraliza repa koja se širi na zadnje i prednje ekstremitete (60-62).

Prvi koraci na polju istraživanja EAE datiraju još iz 1925. godine. Imunizacijom zečeva homogenatom humane kičmene moždine dolazi do inflamacije kičmene moždine i paralize ekstremiteta (63). Tokom 1930. godine Rivers je zajedno sa svojim saradnicima pokazao da EAE može biti indukovano kod primata višestrukim injekcijama emulzije moždanog tkiva zdravih zečeva (64). Dodatno, Paterson je 1960. godine ukazao da transfer ćelija izolovanih iz limfnog čvora imunizovanog pacova, u singene neimunizovane pacove dovodi do indukcije EAE (61). Tokom narednih godina, usavršavani su različiti protokoli imunizacije. Veliki napredak je postignut upotrebom Frojndovog (engl., Freund) adjuvansa, čime je omogućena indukcija bolesti nakon jedne imunizacije u više vrsta životinja. Takođe, uvođenje *Pertussis* toksina je značajno unapredilo imunizacioni protokol. Glodari korišćeni u EAE modelu su zečevi, zamorci, miševi i pacovi, dok su marmoset majmuni (*Callithrix jacchus*) najviše korišćeni za izučavanje EAE kod primata.

Godine 1947. Walt i kolege su predložili EAE kao pogodan eksperimentalni model za proučavanje MS (65). Upravo su zbog toga brojni istraživači koristili ovaj model za istraživanje patofizioloških mehanizama koji se nalaze u osnovi ove bolesti, kao i terapijskih pristupa. EAE se može indukovati primenom različitih protokola:

1. Aktivna imunizacija se zasniva na inokulaciji homogenata tkiva CNS, mijelina ili peptida iz mijelina, što pokreće imunsku reakciju protiv specifičnih antigenskih proteina mijelina. Različiti tipovi peptida mijelina kao što su: mijelin bazni protein (MBP), proteolipidni protein (PLP), mijelin oligodendrocitni glikoprotein

(MOG) i nekoliko njihovih encefalitogenih epitopa koriste se za indukovanje bolesti. Izolovani peptidi se aplikuju subkutano, solubilizovani u odgovarajućem adjuvansu (61, 66). Postojeći imunizacioni protokoli uglavnom koriste prečišćene ili rekombinantne proteine mijelina, kao i sintetičke peptide dobijene iz ovih proteina (61). Odgovarajući odnos antigena i adjuvansa je bitan za razvoj bolesti. Jedan od najčešće korišćenih adjuvansa je kompletni Frojndov adjuvans koji sadrži *Mycobacterium tuberculosis* i indukuje Th1 ćelijski odgovor. Korišćenje kompletnog Frojndovog adjuvansa dovodi do aktivacije perifernog imunskog odgovora koji povećava permeabilnost krvno-moždane barijere (67).

2. Pasivna imunizacija, poznata i kao adoptivni transfer, se karakteriše transferom antigen-specifičnih CD4⁺ T limfocita iz životinja imunizovanih encefalitogenom u singene primaocce (62). Ovaj vid imunizacije omogućava praćenje uloge CD4⁺ T limfocita tokom bolesti, a takođe je pogodan za proučavanje efektorske faze bolesti, u odsustvu adjuvansa. Pošto se vrši transfer već aktiviranih CD4⁺ T limfocita, EAE se razvija brže, čime je omogućeno proučavanje efektorske faze bolesti, nezavisno od induktivne. Takođe, manipulacija T limfocitima *in vitro* omogućava proučavanje uticaja različitih subpopulacija T limfocita na razvoj bolesti.

3. Značajni rezultati su dobijeni proučavanjem spontane inflamacije CNS kod transgenih životinja. Prve transgene životinje korišćene u ovakvom pristupu dobijene su genetskim manipulacijama na B10.PL soju miševa. Miševi su imali povećanu ekspresiju T ćelijskog receptora (TCR) na CD4⁺ limfocitima koji su specifični za MBP, a poznati su još kao MBP Ac1-10 linija miševa. Kod ovih životinja, bolest se razvijala spontano ali u malom broju slučajeva (68). Kod MBP-TCR transgenih miševa sa nefunkcionalnim RAG (engl., *recombination-activating genes*) genima, u odsustvu T regulatornih (Treg) i B limfocita, incidenca razvoja EAE je iznosila 100%. Dodatnim eksperimentima je pokazano da Treg limfociti inhibiraju nastanak EAE (69). Genetskim manipulacijama su dobijeni novi transgeni miševi među kojima je i SJL/J soj koji je ekspresirao T ćelijski receptor specifičan za PLP₁₃₉₋₁₅₁ i razvijao EAE sa fatalnim ishodom (70). Zatim, C57BL/6 miševi sa T ćelijskim receptorom specifičnim za MOG₃₅₋₅₅ su razvijali spontani EAE u 4% slučajeva dok je u 30% slučajeva došlo do

razvoja optičkog neuritisa (71). Imajući u vidu ključnu ulogu $CD8^+$ T limfocita u MS, određen broj istraživanja je baziran i na genetskim modifikacijama ovih ćelija. Tako su dizajnirane $CD8^+$ T ćelije koje eksprimiraju T ćelijske receptore specifične za MBP i MOG. Međutim, za indukciju EAE u miševima sa $CD8^+$ T limfocitima specifičnim za MBP neophodno je prisustvo virusne infekcije (72). B limfociti takođe učestvuju u imunopatogenezi MS pa su zbog toga razvijeni transgeni modeli miševa koji su eksprimirali MOG-specifičan TCR na $CD4^+$ T limfocitima i MOG-vezujući teški lanac imunoglobulina na B limfocitima. Ovi miševi razvijaju spontani optikospinalni encefalomijelitis koji zahvata kičmenu moždinu i optičke nerve (73).

1.3. IMUNOPATOGENEZA EAE

Imunopatogeneza EAE je dinamičan proces tokom kojeg nastaju različite T ćelijske subpopulacije, čija se učestalost u perifernim limfoidnim organima i CNS menja tokom induktivne, efektorske i faze oporavka. Tokom induktivne faze bolesti, usled interakcije sa antigen prezentujućim ćelijama dolazi do aktivacije i diferencijacije naivnih $CD4^+$ T limfocita u efektorske autoreaktivne $CD4^+$ ćelije. Efikasna interakcija sa antigen prezentujućim ćelijama podrazumeva vezivanje TCR za peptide koji se nalaze u sklopu MHC molekula II klase (MHC II) i vezivanje koaktivirajućeg receptora (npr., CD28) za kostimulator (npr., CD80, CD86). Kao posledica ovih interakcija, u ćelijama se pokreću kaskadni signalni procesi koji dovode do proliferacije T limfocita i njihove diferencijacije u efektorske ćelije koje produkciju medijatore inflamacije. Diferencijacija T ćelija u različite T ćelijske subpopulacije zavisi od citokinskog miljea, a ključne $CD4^+$ T ćelijske subpopulacije uključene u imunopatogenezu EAE su Th1 i Th17, kao i Treg ćelije (74).

CNS je imunoprivilegovan organ u kojem su procesi inflamacije pod kontrolom rezidentne mikroglije koja predstavlja njegov glavni imunski sistem i štiti neurone od oštećenja tokom infekcije. Tokom efektorske faze, aktivirani $CD4^+$ T limfociti lakše prolaze kroz krvno-moždanu barijeru u odnosu na naivne T limfocite. Transmigracija encefalitogenih $CD4^+$ T ćelija kroz krvno-moždanu barijeru, čija je permeabilnost povećana usled inflamacije, regulisana je hemokinima i adhezivnim molekulima. U

prisustvu IFN- γ i faktora nekroze tumora (engl., *tumor necrosis factor*, TNF), endotelne ćelije krvnih sudova eksprimiraju adhezivne molekule ICAM-1 (engl., *intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (engl., *vascular cell adhesion molecule*) za koje se vezuju integrini encefalitogenih T ćelija, čime je omogućen njihov prolazak kroz krvne sudove i ulazak u CNS (75). Pored krvno-moždane barijere, i horioidni pleksus predstavlja mesto ulaska autoreaktivnih T ćelija u CNS. Naime, konstitutivna ekspresija CCL20 hemokina u horioidnom pleksusu privlači autoreaktivne T ćelije, među kojima Th17 eksprimiraju CCR6, hemokinski receptor koji omogućava njihov ulazak u CNS tokom induktivne faze bolesti (76). Po prolasku kroz krvno-moždanu barijeru, infiltrišuće CD4⁺ T ćelije bivaju reaktivirane u CNS od strane antigen prezentujućih ćelija, uključujući i dendritske ćelije koje prezentuju peptide mijelina u sklopu MHC II molekula. Inflamatorni odgovor dalje stimuliše regrutovanje monocita i/ili makrofaga koji proizvode TNF i IL-1 (61, 62). Mehanizmom širenja epitopa dolazi do aktivacije naivnih CD4⁺ T ćelija specifičnih za različite epitope CNS proteina (77). U odgovoru na nastalu promenu u mikrosredini, aktivirana mikroglija sekretuje citokine, hemokine kao i reaktivne kiseonične i azotne vrste (NO) (78), koji u sadejstvu sa medijatorima Th1 i Th17 ćelijskog odgovora doprinose oštećenju okolnog tkiva. Razvoj i progresija autoimunskog odgovora na mijelin specifične antigene uslovljeni su ravnotežom i interakcijom između efektorskih i regulatornih T ćelija. Jednom aktivirane i klonski ekspandirane autoreaktivne efektorske T ćelije (Th1, Th17) indukuju inflamaciju i dovode do oštećenja tkiva. Sa druge strane, Treg i Th2 ćelije kontrolišu i smanjuju inflamaciju izazvanu autoreaktivnim T ćelijama, čime uvode imunizovane životinje u fazu oporavka (79).

Najteže kliničke manifestacije EAE na vrhuncu bolesti javljaju se između 10. i 15. dana nakon imunizacije. Tada dolazi do demijelinizacije kičmene moždine i edema usled nakupljanja inflamatornog infiltrata koji se sastoji uglavnom od limfocita i makrofaga (59). Iako se malo zna o molekularnim mehanizmima koji se nalaze u osnovi demijelinizacije, poznato je da usled infiltracije Th1 i Th17 limfocita dolazi do oštećenja i apoptoze oligodendrocita, koji su odgovorni za mijelinizaciju u CNS (80). Oštećenje oligodendrocita je posredovano produkcijom medijatora inflamacije i NO od strane aktiviranih T limfocita, glijalnih ćelija i makrofaga. Pokazano je da je nivo NO značajno povišen u MS lezijama i smatra se bitnim aspektom oštećenja oligodendrocita

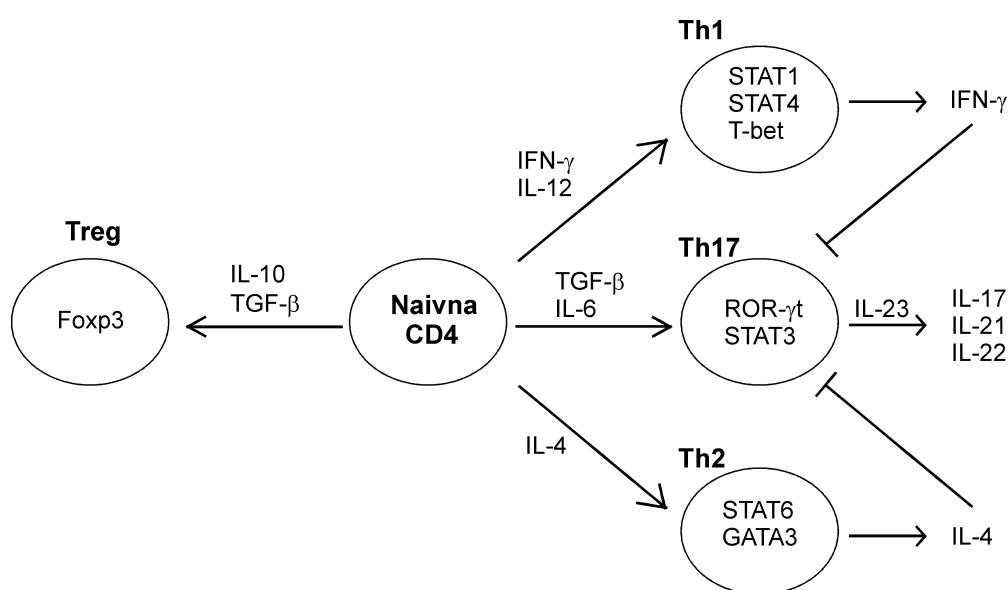
(81). Kao posledica demijelinizacije i izmenjene ekspresije membranskih Na-kanala, oštećeni aksoni (82) otežano sprovode nervne impulse što rezultuje kliničkim manifestacijama bolesti.

1.3.1. T ćelijske subpopulacije u limfocitnom infiltratu CNS

Istraživanja na EAE modelu su omogućila jasno i precizno definisanje limfocitnog infiltrata unutar CNS. Tako, danas se pouzdano zna da je on sačinjen predominantno od T i B limfocita i NK (engl., *natural killer*) ćelija. T limfociti su heterogena grupa ćelija koju sačinjavaju: pomoćnički T limfociti (engl., *T helper*, Th CD4⁺), citotoksični T limfociti (CD8⁺) i regulatorni T limfociti (Treg). Unutar svake klase T limfocita, moguća je njihova diferencijacija u različite podtipove u zavisnosti od citokinskog miljea (81).

Th ćelije spadaju u kategoriju CD4⁺ ćelija koje učestvuju u indukciji i regulaciji urođenog i stečenog imunskog odgovora (Slika 2). U početku se smatralo da je MS posredovan **Th1 ćelijama** koje nastaju aktivacijom naivnih CD4⁺ T limfocita u prisustvu IL-12 (81, 83). IL-12 je heterodimer sačinjen iz dve subjedinice, p35 i p40. Da IL-12 ima važnu ulogu u razvoju EAE dokazuju i istraživanja u kojima su korišćeni *knockout* miševi za IL-12p35^{-/-} i IL-12p40^{-/-}. Time je pokazano da nedostatak p35 subjedinice IL-12 ne utiče na razvoj bolesti dok su IL-12p40⁻ *knockout* miševi bili rezistentni na razvoj EAE (84). Aktivirane Th1 ćelije proizvode IFN- γ i TNF koji su glavni medijatori inflamacije u MS i EAE. Pored IL-12, produkciju IFN- γ promovira JNK2 (engl., *c-Jun N-terminal kinase*) i p38 MAP-kinaze (mitogenom aktivirane protein kinaze, MAPK) dok JNK1 indirektno, inhibicijom ekspresije gena za IL-4, inhibira Th2 i favorizuje Th1 ćelijski odgovor (85, 86). Poznato je da Th1 ćelije koje proizvode IFN- γ infiltriraju centralni nervni sistem životinja obolelih od EAE, kao i to da inhibicija produkcije IFN- γ smanjuje progresiju bolesti (87). Transkripcioni faktori T-bet, STAT1, STAT4 i c-Rel su bitni u polarizaciji Th1 ćelijskog odgovora. Međutim, Bettelli i saradnici su pokazali da utišavanje STAT1 transkripcionog faktora nema uticaja na razvoj bolesti (88). Dodatno, proinflamatorno svojstvo IFN- γ se ogleda i u tome što stimuliše ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1 adhezivnih molekula (75) na ćelijama endotela

i samim tim povećava permeabilnost krvnih sudova za T limfocite. Štaviše, kod pacijenata kojima je aplikovan IFN- γ je došlo do pogoršanja bolesti (48, 83). Ovi dokazi ukazuju na bitnu ulogu Th1 ćelijskog odgovora u razvoju MS. IFN- γ je dugo smatran proinflamatornim citokinom koji je neophodan za indukciju EAE, s obzirom na visok nivo ovog citokina u CNS u vrhuncu bolesti koji opada tokom faze oporavka. Međutim, neometan razvoj bolesti kod miševa deficijentnih za IFN- γ ili njegov receptor isključio je njegovu ulogu kao jedinog ključnog citokina u indukciji EAE (89, 90).



Slika 2. Diferencijacija T ćelijskih subpopulacija. Preuzeto iz rada Aranami T, Yamamura T. *Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS).* *Allergol Int.* 2008;57:115-20. (91)

Dokazi o bitnoj, ali ne i ključnoj ulozi IFN- γ u razvoju EAE su ukazivali na postojanje dodatnih faktora. Otkriće IL-23 koji je strukturno sličan IL-12 jer se sastoji od 2 subjedinice, p19 i p40, ukazalo je na mogućnost postojanja novog ćelijskog odgovora nezavisnog od Th1 (92). Cua i saradnici su utišavanjem gena za p19 subjedinicu (IL-12p19-/- *knockout*) inhibirali razvoj EAE kod miševa i pokazali da p19-/- i p40-/- *knockout* ne razvijaju EAE (84). Proučavajući IL-23 i mehanizam njegovog delovanja, došlo se do otkrića autoreaktivnih CD4⁺ T limfocita koji produkuju IL-17 i IL-22. Naime, sinergističkim dejstvom TGF- β i IL-6 na naivne CD4⁺ T limfocite tokom njihove aktivacije dolazi do diferencijacije u **Th17 ćelije** koje eksprimiraju receptor za

IL-23 (IL23R), koji je neophodan za njihovu klonsku ekspanziju i preživljavanje. Pored toga, u diferencijaciji Th17 ćelija značajnu ulogu imaju i IL-1 i IL-21 (83). Poznato je da je TGF- β neophodan za razvoj Th17, ali i CD4⁺ Treg ćelija. Uticaj TGF- β u polarizaciji naivnih CD4⁺ T limfocita zavisi od citokinskog miljea. Tako, naivne CD4⁺ T ćelije u prisustvu IL-10 i TGF- β ekspimiraju Foxp3 transkripcioni faktor, marker Treg ćelija, dok IL-6 iz aktiviranih antigen prezentujućih ćelija u sadejstvu sa TGF- β inhibira stvaranje Treg, a promovise nastanak Th17 ćelija (83, 91). Jedan od ključnih transkripcionih faktora koji učestvuje u diferencijaciji Th17 subpopulacije ćelija je ROR- γ t receptor (engl., *retinoic acid orphan related receptors*, ROR). U ovu grupu receptora spadaju i ROR α , ROR β , ROR γ i njegova obrađena varijanta ROR γ t, a kodirani su genom *Rorc* koji se ekspimirira isključivo u limfoidnim ćelijama. CD4⁺ T limfociti pod dejstvom IL-23 ekspimiraju ROR γ t transkripcioni faktor i njegova ekspresija pozitivno korelira sa ekspresijom IL-17A, IL-17F i IL-22 (93). Globalnom analizom transkripcionih faktora koji učestvuju u Th17 polarizaciji ustanovljeno je da vezivanje ROR γ za promotor gena za IL-17 uvek prati i vezivanje STAT3, IRF4 i BATF transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju *Rorc* gena. Pri tome, fosforilacija STAT3 transkripcionog faktora zavisi od IL-6 i IL-23 koji stimulišu JAK-STAT kinazni put (94). U prilog uloge STAT3 u indukciji Th17 odgovora govori nalaz da pacijenti sa humanim hiper IgE sindromom koji nose mutaciju za STAT3 imaju smanjenu ekspresiju IL-17 (95). Međutim, povišena ekspresija STAT3 u *Rorc*^{-/-} ćelijama ne dovodi do ekspresije IL-17, što ukazuje na ključnu ulogu ROR γ t transkripcionog faktora u ekspresiji IL-17 (93). Sposobnost Th17 ćelija da sintetišu i produkuju proinflamatorne citokine IL-17A i IL-17F, kao i da indukuju druge ćelije da sintetišu proinflamatorne medijatore kao što su IL-6, GM-CSF (engl., *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), matriks metaloproteinaze i CXC hemokine kao što je CXCL8 (neutrofilni hemoatraktant), odgovorna je za doprinos Th17 ćelija inflamaciji CNS (48).

Th2 je anti-inflamatorna subpopulacija CD4⁺ T limfocita koji produkuju IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13. Polarizacija Th2 limfocita se odvija u prisustvu IL-4 aktivacijom STAT6 i GATA3 transkripcionih faktora (81). Takođe, u diferencijaciji Th2 ćelijskog odgovora učestvuje i ERK kinaza (engl., *extracellular signal-regulated kinases*) regulišući funkciju receptora za IL-4 (85, 86). Povišena ekspresija GATA3 je u korelaciji sa odloženim početkom i blažom kliničkom slikom EAE. Terapeutici koji

pojačavaju Th2 ćelijski odgovor ujedno dovode i do inhibicije Th1 odgovora, što smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina i ublažava klinički tok EAE (81).

T regulatorne (Treg.) ćelije su najpotentnije imunomodulatorne ćelije u stečenoj imunosti koje suprimiraju aktivnost efektorskih T ćelija i održavaju imunološku ravnotežu. Za njihovu diferencijaciju je neophodan TGF- β koji u prisustvu IL-10 stimuliše ekspresiju Foxp3 transkripcionog faktora i površinskih markera CD4 i CD25 (83). Imunosupresivnu aktivnost ostvaruju preko IL-10 i TGF- β koji koji inhibiraju proliferaciju Th1 ćelija (81). Takođe, Treg ćelije u CNS suprimiraju IFN- γ ali ne i IL-17 (96). U krvi pacijenata obolelih od relapsno remitentne MS, tokom faze remisije broj Treg ćelija je povišen, mada je mali broj ovih ćelija uvek prisutan u MS lezijama nezavisno od toga da li je bolest aktivna ili ne. Faza oporavka u EAE je takođe praćena akumulacijom Foxp3⁺ Treg ćelija u CNS (81, 97).

Pored navedenih mehanizama koji regulišu polarizaciju T ćelijskog odgovora, treba pomenuti i ulogu mTOR (engl., *mammalian target of rapamycin*) u diferencijaciji Th1, Th2 i Th17 ćelijskih subpopulacija. T limfociti deficijenti za mTOR imaju sposobnost produkcije IL-2 nakon stimulacije, ali ne uspevaju da se diferentuju ni u jednu od navedenih ćelijskih subpopulacija (98). Inhibicija mTOR se povezuje sa anergijom T limfocita, aktivacijom Treg i pojačanim odgovorom memorijskih T ćelija na mikrobne agense (99). Selektivnim utišavanjem Rheb proteina (pozitivnog regulatora mTOR) u T limfocitima miševa dolazi do razvoja blažeg oblika EAE koji je praćen smanjenom limfocitnom infiltracijom u CNS i smanjenom klonskom ekspanzijom Th1 i Th17 limfocita na periferiji (100).

1.4. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA, APOPTOZE I AUTOFAGIJE U NEUROINFLAMACIJI

Oksidativni stres nastaje kada produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta prevaziđe antioksidativni kapacitet ćelije. Tada dolazi do oštećenja lipida ćelijskih membrana, posledičnog ulaska kalcijuma, oštećenja i lize mitohondrija, kao i oštećenja DNK i proteina u ćelijama (101). Reaktivne kiseonične vrste obuhvataju visoko reaktivne atome ili molekule koji nastaju parcijalnom redukcijom kiseonika. U njih spadaju superoksidni anjon (O_2^-), hidroksilni anjon (OH^-) i vodonik peroksid (H_2O_2). Reaktivne kiseonične vrste mogu biti sintetisane u mitohondrijama kao sporedni proizvod ćelijske respiracije ili delovanjem NADPH oksidaze koja aktivno proizvodi superoksid u neutrofilima u uslovima inflamacije. Antioksidativnu zaštitu ćelije ostvaruju delovanjem glutaciona, superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze (102).

Programirana ćelijska smrt tipa I (apoptoza) je visoko konzervisan i genetski determinisan proces koji se fiziološki odigrava tokom razvoja i starenja, a u cilju održavanja homeostaze organizma (103). Ovaj energetski zavisn proces je posredovan proteolitičkim enzimima kaspazama, koje se sintetišu u neaktivnoj prekursorskoj formi pro-kaspaza. Kaspaze se mogu klasifikovati kao inicijatorske (kaspaza-2,-8,-9,-10), efektorske (kaspaza-3,-6,-7) i inflamatorne kaspaze (kaspaza-1,-4,-5). Prekusorske forme inicijatorskih kaspaza se autokatalitički aktiviraju nakon grupisanja u odgovarajuće komplekse i proteolitičkom aktivnošću aktiviraju efektorske kaspaze. Dalje, efektorske kaspaze učestvuju u aktivaciji endonukleaza i proteaza koje fragmentišu hromozomalnu DNK i proteine citoskeleta i nukleusa (104). Tokom apoptotske smrti dolazi do kondenzacije i fragmentacije hromatina, pupljenja membrane i formiranja apoptotskih tela sa ćelijskim sadržajem, koja na svojoj površini imaju fosfatidil serin (103). Apoptoza je regulisana spoljašnjim (put receptora smrti) ili unutrašnjim putem (put mitohondrija) (103, 105). Apoptoza učestvuje i u formiranju imunskog sistema, pa tako tokom sazrevanja limfociti koji ne ekspimiraju funkcionalni antigenski receptor i oni koji ekspimiraju autoreaktivne receptore podležu apoptotskoj ćelijskoj smrti (103, 106). Poremećaji u procesu apoptoze i uklanjanju apoptotičnih fragmenata su jedan od faktora odgovornih za nastanak autoimunskih bolesti (107). Uloga apoptoze je ispitivana i u neurodegenerativnim bolestima, gde se propadanje

neurona u Alchajmerovoj i Parkinsonovoj bolesti (108), kao i oligodendroglije u lezijama tipa III kod MS pacijenata pripisuje apoptozi (109).

Autofagija je katabolički proces koji se konstantno odigrava u ćelijama u cilju degradacije sopstvenih nefunkcionalnih ili nepotrebnih citoplazmatskih komponenti (makromolekula i organela). Ovaj dinamičan proces omogućava ćelijama adaptaciju na promene u okruženju i održava stanje homeostaze u stresnim uslovima poput gladovanja, hipoksije, oštećenja DNK i oksidativnog stresa (110). Definisane su tri forme autofagije: autofagija posredovana šaperonima, mikroautofagija i makroautofagija, koje se razlikuju po fiziološkoj funkciji, mehanizmu sekvenciranja i sadržaju autofagozoma. Termin autofagija se najčešće odnosi na makroautofagiju koja je pod strogom kontrolom Atg (engl., *autophagy related*) proteina. Jedan od ključnih molekula koji učestvuje u regulaciji ovog procesa je serin/treonin kinaza mTOR, čija aktivacija inhibira autofagiju. Aktivnost Raptor-mTOR funkcionalnog kompleksa (mTORC1) je regulisana energetske statusom ćelije i različitim faktorima stresa. U fiziološkim uslovima, mTORC1 kompleks se aktivira delovanjem PI3K/Akt signalnog puta što inhibira autofagiju (111). Sa druge strane, mTORC1 je inhibiran adenozin monofosfatom aktiviranom protein kinazom (AMPK). AMPK predstavlja glavni energetski senzor u ćelijama koji se aktivira u uslovima povećanog AMP/ATP odnosa (112, 113) i dovodi do inhibicije mTORC1 kompleksa, a time i aktivacije procesa autofagije. Nakon indukcije autofagije dolazi do stvaranja autofagozoma u kome se sekvencira citoplazmatski sadržaj, a zatim sazrevanja autofagozoma i fuzije autofagozoma i lizozoma (autofagolizozom) i degradacije sadržaja unutar vezikula (114). Eksperimentalno dokazivanje prisustva autofagije se najčešće vrši praćenjem konverzije LC3 proteina iz solubilne citoplazmatske (LC3-I) u membransku (LC3-II) formu tokom faze sazrevanja autofagozoma. Za LC3 se vezuje p62 (engl., *p62/sequestosome1-SQSTM1*) koji proteine obeležene ubikvitinom usmerava u autofagozome u kojima će biti razgrađeni (115, 116). Smanjivanje koncentracije p62 usled degradacije u autofagolizozomima se u eksperimentalnim uslovima koristi kao dokaz efikasne autofagije (117). Autofagija obavlja bitne uloge u imunskom sistemu, među kojima su uklanjanje intracelularnih patogena, prezentacija antigena tokom sazrevanja limfocita i regulacija sekrecije proinflamatornih medijatora (118, 119).

Inhibicija autofagije u dendritskim ćelijama smanjuje kliničke manifestacije EAE (120), što je u skladu sa njenom ulogom u prezentaciji antigena.

Poznato je da u neuroinflamaciji dolazi do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (80, 81) koje dovode do oštećenja i apoptoze oligodendrocita. Pored toga, skorija istraživanja ukazuju i na aktivaciju autofagije (121, 122). Smatra se da inflamacija dovodi do oksidativnog stresa koji mehanizmom pozitivne povratne sprege dalje promoviše inflamaciju (123). Apoptoza oligodendrocita do koje dolazi usled oksidativnog stresa i inflamacije je stimulirana spoljašnjim receptorskim putem koji je iniciran aktivacijom receptora smrti iz TNFR (engl., *tumor necrosis factor receptor*) familije (105, 107). U regulaciji apoptoze u neuroinflamaciji bitnu ulogu imaju MAPK, među kojima ERK1/2 promoviše preživljavanje ćelija, za razliku od p38 i JNK koje imaju proapoptotsko svojstvo (85). Takođe, treba imati u vidu da tokom procesa ćelijske smrti dolazi do pokretanja signala koji stimulišu nakupljanje limfocita (124), što je čest nalaz prisutan u MS (125, 126). Uloga proteina PI3K/Akt signalnog puta, kao i ERK u procesu demijelinizacije je pokazana u *in vivo* studijama (127, 128). Skorašnji podaci dobijeni u bazičnim *in vitro/in vivo* istraživanjima i GWAS (engl., *genome-wide association study*) studijama povezuju signalne puteve i proteine koji su uključeni u kontrolu autofagije sa autoimunošću. Autofagija indukovana oksidativnim stresom pomaže u uklanjanju oštećenih mitohondrija i proteina u ćelijama (123, 129) i učestvuje u regulaciji oksidativnog stresa i inflamatornih puteva u organizmu (123). Indukcija autofagije uglavnom ima citoprotektivno dejstvo, ali ako je preterana ili neadekvatno aktivirana može da dovede i do smrti ćelije, pa se autofagija još naziva i programirana ćelijska smrt tipa II. Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi dualne prirode autofagije u regulaciji ćelijske smrti su tema brojnih studija (129).

Kao što je prethodno navedeno, zahvaljujući uglavnom svojim pro- i antioksidativnim svojstvima, ugljenične nanočestice su predmet brojnih istraživanja u biomedicini. Za razliku od uloge u regulaciji ćelijske smrti, njihova uloga u modulaciji imunskog odgovora nije intenzivno proučavana (31, 32, 55, 56, 130). Uprkos ograničenjima koja se pretežno odnose na neophodnu primenu adjuvansa (61) i upotrebu inbrednih životinjskih sojeva (131), EAE danas predstavlja veoma prihvatljiv i koristan animalni model za izučavanje inflamatornih procesa unutar CNS. Značaj EAE

modela u rasvetljavanju mehanizama neuroinflamacije i uvođenju novih terapijskih modaliteta u MS potvrđuje činjenica da su Natalizumab, Glatiramer acetat i Mitoksantron, registrovani od strane FDA (engl., *Food and Drug Administration*), proizašli direktno iz ispitivanja na ovom modelu (132-134). Imajući u vidu da biološki efekti GKT predstavljaju atraktivnu oblast istraživanja, kao i činjenicu da njihova uloga u neuroinflamaciji do sada nije proučavana, želeli smo da ispitamo potencijalni terapijski efekat GKT u EAE modelu na celularnom i molekulskom nivou.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati efekat GKT na klinički tok bolesti i inflamaciju CNS u modelu EAE.
2. Ispitati celularne i molekularne mehanizme eventualnog povoljnog dejstva GKT u EAE.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA UGLJENIČNIH NANOČESTICA

Grafenske kvantne tačke (GKT) su sintetisane elektrohemijom oksidacijom grafitnih elektroda (130) uronjenih u disperziju 3 % NaOH u etanolu (96 %), pri intenzitetu struje od 20 mA. Rastvor GKT je neutralisan pomoću HCl, a dobijeni NaCl je uklonjen filtriranjem nakon flokulacije. Etanol je uklonjen isparavanjem, a dobijeni prah je rastvoren u acetonu da bi se uklonila hidrofobna frakcija. Posle uklanjanja acetona, GKT su rastvorene u vodi i dalje prečišćene dijalizom pomoću creva za dijalizu od 3,5 kDa. GKT su dobijene i na drugi način, termalnom dekompozicijom limunske kiseline (27). Limunska kiselina je zagrevana na 200 °C tokom 30 minuta uz neprekidno mešanje, nakon čega je dodato 0,5 mol/l NaOH kako bi se postigla pH vrednost rastvora 7. Uzorak je zatim prečišćen dijalizom pomoću creva za dijalizu od 3,5 kDa. Iz vodenog rastvora obe vrste GKT su dobijene u obliku praha uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Karbonske kvantne tačke (KKT) su sintetisane oksidacijom aktiviranog ugljenika pomoću smeše koncentrovanih kiselina (ccHNO₃ i ccH₂SO₄). Aktivirani ugljenik (300 mg) je pomešan sa 20 ml HNO₃ i 60 ml H₂SO₄ u ledenom kupatilu, a potom je reakciona smeša grejana na temperaturi od 110 °C, tokom 12 h. Nakon toga, reakciona smeša je neutralisana pomoću NaHCO₃. Dobijeni talog natrijumovih soli je odvojen filtriranjem, dok su u rastvoru ostale KKT koje su prečišćene dijalizom pomoću creva za dijalizu od 3,5 kDa. KKT u obliku praha su dobijene uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Fulerenol je sintetisan hidrosilacijom čistog C₆₀ fulerena koji je oksidovan sa H₂O₂ u prisustvu katalizatora tetra-*n*-butilamonijum hidroksida (TBAH) (135). Fuleren (200 mg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) je rastvoren u toluenu (100 ml) tokom 30 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Rastvoru fulerena je sporo dodata voda tako da se očuva granica faza, a zatim je direktno u vodenu fazu dodato 20 ml H₂O₂ (v/v 33 %) i 1

ml TBAH (v/v 40 %). Reakciona smeša je grejana uz mešanje na 60°C tokom 24 h, nakon čega je odvojena vodena faza iz koje je fulerenol taložen smešom 2-propanola, dietil etra i n-heksana (u odnosu 7:5:5). Fulerenol je dobijen u vidu praha sušenjem pomoću vakuma.

Grafen oksid (GO) je dobijen oksidacijom grafitnog praha Z-346, *Timrex KS6 graphite* (Imerys Graphite & Carbon, Bodio, Švajcarska). Za sintezu je korišćena unapređena Humerova metoda koja isključuje korišćenje NaNO₃ (93, 136). Grafitni prah (1 g) je pomešan sa 23,3 ml koncentrovane H₂SO₄ uz konstantno mešanje na ledu, nakon čega je vršena sonifikacija (30 minuta) i dodat je KMnO₄ (3 g). Zatim je dodato 50 ml MiliQ vode i temperatura reakcione smeše povećana na 40 °C tokom 30 minuta i 95 °C tokom 15 minuta. Potom je reakciona smeša dodata u 170 ml MiliQ vode sa 5 ml H₂O₂ (33%), čime je reakcija prekinuta. GO je filtriran i talog sa filtera ispran sa 100 ml vodenog rastvora HCl (1:10), a zatim sa vodom sve dok nije postignuta pH 7. Prah GO je sakupljen nakon vakumskog sušenja.

Sve nanočestice u obliku praha su rastvarane u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom (engl., *Phosphate Buffer Saline*, PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u koncentraciji od 5 mg/ml, sterilisane γ -zračenjem (10 kGy) i čuvane na +4 °C. Za potrebe fotoluminiscentne spektroskopije ugljenične nanočestice su pobuđivane svetlošću različitih talasnih dužina u opsegu od 330 do 450 nm. Spektri fotoluminescencije su mereni na spektrofluorimetru *Fluorolog-3 FL3-221* (HORIBA, Northampton, Velika Britanija), na sobnoj temperaturi, upotrebom 450 W Xenon lampe kao izvora ekscitacije (328 nm) i R928P fotomultiplikatorske tube kao detektora. Morfologija i veličina ugljeničnih nano čestica je proučavana mikroskopijom atomskih sila (engl., *atomic force microscopy*, AFM). Uzorci su pripremljeni nakapavanjem disperzije nančestica na bakarnu mrežicu obloženu ugljenikom sa 300 proreza, prečnika ~63 μ m (engl., *drop casting method*). AFM merenja su vršena na *Quesant* mikroskopu (Agoura Hills, CA, SAD) u visoko amplitudnom dinamičkom režimu rada (engl., *tapping*), a korišćene su AFM Q-WM300 rotirajuće monolitijumske silicijumske probe za bezkontaktnu visokofrekventnu primenu. Za merenja su korišćene standardne silicijumske iglice (Nano and More GmbH, Wetzlar, Nemačka) pri konstantnoj sili od 40 N/m na sobnoj temperaturi. Uzorci su rastvarani u MiliQ vodi u koncentraciji od 0,5

mg/ml. Tanak sloj GKT je nanet na mineral liskun (sušenje na vazduhu na 60 °C, 60 minuta) i analiziran. AFM slike su analizirane Gwyddion softverom (137). Zeta potencijal, kao mera površinskog naelektrisanja nanočestica, meren je pomoću Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) sa 4 mW helijum/neonskim laserom i termo-električnim regulatorom. Sva merenja su vršena na temperaturi od 25 °C, a vrednost zeta potencijala je izražena kao srednja vrednost nakon pet merenja. Za rendgenska fotoelektronsku spektroskopiju (engl., *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) korišćen je K-Alpha XPS sistema (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD) opremljen mikro fokusiranim monohromatskim Al K-Alpha X-ray izvorom (1486,6 eV). Rendgenski zrak veličine 400 nm je korišćen pri 6 mA x 12 kV, a spektri su dobijeni uz konstantan energetska režim analizatora sa energijom prolaza od 200 eV. Za potrebe digitalne akvizicije i obradu podataka je korišćen Advantage software verzija 5,952 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD). Kalibracija spektara je vršena sa standardima zlata, srebra i bakra pomoću K-Alpha sistema.

3.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U ovom istraživanju su korišćene ženke pacova genetski visokosrodnog soja *Dark Agouti* (DA), starosti od 8 do 10 nedelja, telesne težine $96,0 \pm 10,8$ g. Životinje su dobijene iz uzgajališta Vivarijuma Galenika AD i gajene pod standardnim uslovima, bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti na životinjama su odobreni od strane etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, broj 7841/1 od 11.04.2017. godine. Takođe, svi eksperimenti su odobreni i od strane Etičkog Saveta Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije – Uprava za Veterinu, broj rešenja 323-07-03370/2017-05/4. Ova studija je izvedena u skladu sa direktivama Evropskog Saveta od 24. novembra 1986. (86/609/EEC).

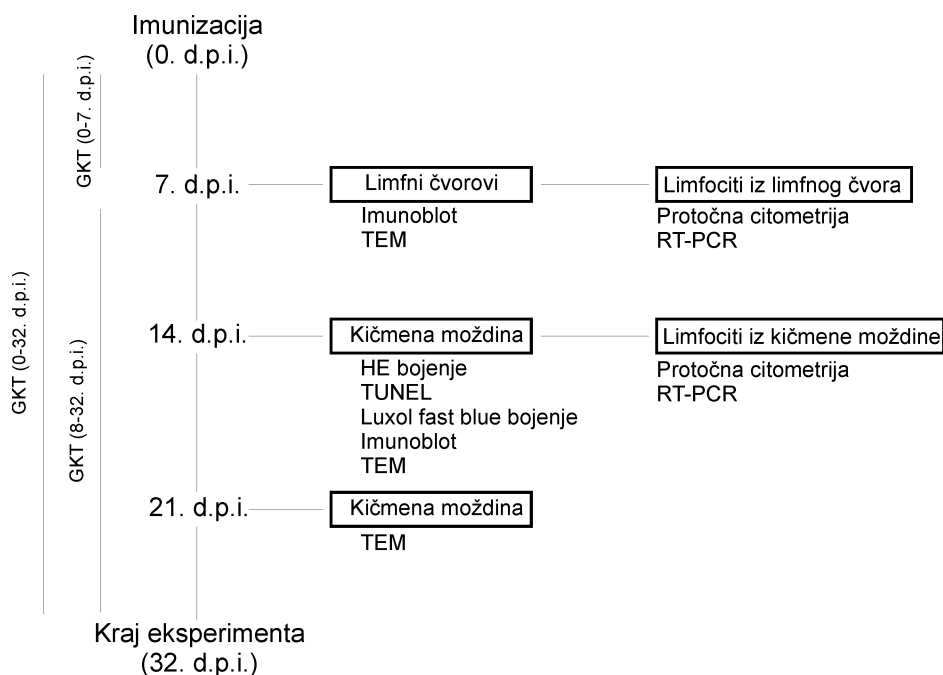
3.3 INDUKCIJA I KLINIČKA PROCENA EAE

3.3.1. Imunizacija životinja

Životinje su imunizovane tkivom kičmene moždine (KM) DA soja pacova koje je homogenizovano dodavanjem PBS u odnosu 1:1 (50 % težina u odnosu na zapreminu). U homogenat KM je dodat kompletni Frojndov adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI, SAD) koji sadrži 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*. Mešanjem istih zapremina homogenata KM i kompletnog Frojndovog adjuvansa dobijena je encefalitogena emulzija koja je injektovana intradermalno (po 100 µl), u zadnje šape pacova.

3.3.2. Praćenje kliničke slike

Životinje su posmatrane svakodnevno od dana imunizacije pa do kraja eksperimenta. Klinička ocena je vršena prema skali od 0 do 4 na sledeći način: 0 - odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 1 - atonija repa; 2 - pareza zadnjih ekstremiteta; 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta i 4 – smrt životinje. U slučajevima slabije ili jače izraženih kliničkih znakova od tipičnih za određeni stepen bolesti, korišćene su intermedijerne vrednosti (npr. jako izražena atonija repa je definisana kao 1,5 a paraliza zadnjih ekstremiteta sa inkontinencijom je definisana kao 3,5). Nakon imunizacije praćeni su sledeći parametri: početak bolesti tj., prvi dan kada su primećeni klinički znakovi bolesti, kumulativni klinički skor koji predstavlja sumu svih svih kliničkih skorova i najveća zabeležena klinička ocena. Tokom oporavka je praćena incidenca pojave relapsa koji predstavlja povećanje kliničkog skora za najmanje jedan stepen u trajanju od 2 ili više dana. U odgovarajućim vremenskim tačkama (7., 14. i 21. dana posle imunizacije – d.p.i.), pacovi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom u etarskoj anesteziji i uzeti su uzorci odgovarajućih tkiva (Šema 1).



Šema 1. Eksperimentalni plan

3.3.3. Tretman pacova ugljeniĉnim nanoĉesticama

Nakon imunizacije, eksperimentalne ųivotinje su metodom sluĉajnog izbora rasporeĊene u kontrolnu i terapijsku grupu (≤ 3 pacova po kavezu). Sve eksperimentalne grupe su brojale po 8 ųivotinja. Pacovima u terapijskoj grupi su intraperitonealno aplikovane ugljeniĉne nanoĉestice u dozi od 10 mg/kg telesne mase jednom dnevno, od dana imunizacije do kraja eksperimenta (32. dan). Zatim, ugljeniĉne nanoĉestice koje su ispoljile najpovoljniji efekat su aplikovane u tri razliĉita terapijska reųima: 1. od dana imunizacije do kraja eksperimenta (32. dan); 2. tokom prvih sedam dana od dana imunizacije; 3. od osmog dana posle imunizacije do kraja eksperimenta, kako bi se ispitalo u kojoj fazi bolesti ostvaruju najbolji efekat. Kontrolnim EAE ųivotinjama je aplikovana odgovarajuĉa zapremina sterilnog PBS. Za ispitivanje akutne toksiĉnosti (poremeĉaj disanja, slabost, anoreksija, promene u ponaųanju), kao i motornih poremeĉaja sliĉnih onima u EAE (promena u tonusu repa i zadnjih udova), zdravim neimunizovanim pacovima su aplikovane nanoĉestice intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg telesne mase jednom dnevno tokom 14 dana.

3.4. HISTOLOŠKA ANALIZA

3.4.1. Ispitivanje limfocitnih infiltrata u CNS

Izolovani lumbosakralni uzorci KM pacova su fiksirani u 4 % paraformaldehidu, dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafinu. Isečci tkiva (debljine 5 μm) su deparafinisani u ksilolu i rehidrirani rastvorima alkohola opadajuće koncentracije. Nakon rehidratacije, isečci su obojeni rastvorom hematoksilina, isprani tekućom vodom, a zatim obojeni rastvorom eozina, dehidrirani i pokriveni DPX medijumom. Digitalni snimci preseka tkiva su napravljeni na fotomikroskopu Leica DM40000B LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka), koji je opremljen digitalnom kamerom (Leica DFC295) i softverom LAS 4.4. Morfometrijska analiza površine preseka KM sa mononuklearnim infiltratom vršena je pomoću ImageJ 1.49 softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MA, SAD), koristeći opciju *Set Measurements/Area* i izračunata je kao procenat površine preseka cele KM. Kvantifikacija je vršena na 5 nasumično odabranih preseka po pacovu.

3.4.2. Ispitivanje apoptoze unutar CNS

Fragmentisana DNK, kao jedan od markera apoptotske smrti ćelija, na presecima lumbalnog dela KM detektovana je TUNEL analizom, u kojoj TdT (terminalna dezoksinukleotidil transferaza) katalizuje dodavanje dUTP (dezoksiuridin trifosfat) nukleotida obeleženih markerom na krajeve fragmenata prekinute DNK. Uzorci KM su fiksirani u 4 % paraformaldehidu i ukalupljeni u parafinu. Nakon deparafinizacije i permeabilizacije uzoraka sa 0,2 % Tritonom X-100, ćelije su tretirane sa 3 % BSA (engl., *Bovine Serum Albumin*) i TUNEL-reakcionom mešavinom (Roche, Manhajm, Nemačka). U reakciji se anti-fluorescein antitelo obeleženo alkalnom fosfatazom vezuje za FITC-dUTP, a potom dodavanje precipitujućeg supstrata Fast red (Roche, Manhajm, Nemačka) omogućava vizuelizaciju signala na svetlosnom mikroskopu. Nakon bojenja sa *Fast red*, preseci su obojeni hematoksilinom da bi se vizuelizovale neapoptične ćelije. Apoptične ćelije sa crveno obojenim jedrom su brojane u 5 nasumično izabranih polja (uveličanje 200 x) na svakom preseku KM. Broj

apoptotičnih ćelija je izražen kao procenat broja crveno obojenih apoptotičnih nukleusa u odnosu na plavo obojene neapoptotične nukleuse na istom preseku. Apoptoza oligodendrocita i limfocita je detektovana dvostrukim TUNEL/MBP bojenjem (138) korišćenjem primarnog mišijeg anti-MBP antitela (1:200) (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija) i sekundarnog kozijeg anti-mišijeg IgG TRITC antitela (1:200) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, SAD), nakon TUNEL eseja u kome nije izvršena konverzija antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom i *Fast red*. Obojeni uzorci su zatim posmatrani na Leica TCS SP2 konfokalnom mikroskopu (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) korišćenjem FITC-TRITC kombinacije lasera i PL APO 63x 1.3 Glycerol HCX CS objektiva. Apoptotična jedra oligodendrocita su se videla zeleno, dok je mijelin bio narandžasto obojen.

3.4.3. Ispitivanje demijelinizacije

Uticaj GKT na pojavu demijelinizacije je ispitan metodom koja se zasniva na korišćenju, *Luxol fast blue* (engl.) boje koja se vezuje za lipoproteine i boji mijelin u plavo (139). Izolovano tkivo KM je fiksirano u 4 % paraformaldehidu i ukalupljeno u parafinu kako bi se napravili isecci debljine 10 μ M. Isecci su deparafinirani ksilolom, hidrirani u 96 % alkoholu i bojani u *Luxol fast blue* rastvoru (1g *Luxol fast blue*, 100 ml 96 % alkohola i 5 ml 10 % sirćetne kiseline) zagrejanom na 60 °C tokom 1 h. Uzorci su zatim ispirani 96 % alkoholom i destilovanom vodom. Po ispiranju, uzorci su potapani u 0,05 % rastvor Li_2CO_3 da bi se dobila jasno definisana bela masa i obezbojena siva masa. Potom su uzorci ispirani destilovanom vodom i stavljeni u 0,5 % rastvor Cresyl violet (engl.) tokom 10 minuta da bi se obojila jedra ćelija sive mase. Posle bojenja sa Cresyl violet pločice sa uzorcima su ispirane u destilovanoj vodi, dehidratirane u rastućim koncentracijama (96 % i 100 %) alkohola, prosvetljene ksilolom, pokrivene i posmatrane pod mikroskopom. Digitalni snimci preseka tkiva su napravljeni na fotomikroskopu Leica DM40000B LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka). Morfometrijska analiza površine polja demijelinizacije na lumbosakralnim presecima KM vršena je pomoću ImageJ 1.49 i opcije *Set Measurements/Area*. Na presecima je izmerena površina bele mase KM i površine demijelinizovanih polja u beloj masi.

Rezultat je prikazan kao procenat površine mijelinizovane bele mase KM. Kvantifikacija mijelinizovanih i demijelinizovanih područja je vršena na pet nasumično izabranih preseka po pacovu.

3.4.4. Ultrastrukturalna analiza ćelija i tkiva

Ćelijska internalizacija GKT, stepen demijelinizacije i oštećenje aksona analizirani su pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM). Ćelije kultivisane *in vitro* su odlepljene od podloge, prebačene u odgovarajuće epruvete, centrifugirane (500 g, 5 minuta na 22 °C), oprane dva puta sa 1 ml PBS i centrifugirane na manjoj brzini (200 g, 10 minuta na 22 °C). Nakon toga dobijeni ćelijski talog je fiksiran u 3% glutaraldehidu tokom 24 h. Zatim su ćelijski talozi isprani kakodilatnim puferom tokom 30 minuta, dodatno fiksirani osmijum tetroksidom (1 h), ponovo isprani kakodilatnim puferom i ostavljeni u uranil acetatu preko noći na +4 °C. Sutradan su uzorci dehidrirani alkoholima rastuće koncentracije i propilenoksidom, a zatim ukalupljeni u epoksidne smole (*Epoxy Embedding Medium kit, 45345*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Dobijeni kalupi su sečeni na ultramikrotomu *Leica UltraCut UCT* (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka). Prvo su sečeni semi-tanki isečci debljine 500 nm i obojeni toluidinplavim da bi se izabrao mali deo uzorka za ultratanke isečke (70 nm). Ultratanke isečci su stavljeni na bakarne mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom, i analizirani transmisionim elektronskim mikroskopom *Morgagni 268D* (FEI, Hillsboro, OR, SAD). Limfni čvorovi i KM eksperimentalnih životinja su nakon izolacije stavljeni u 3 % glutaraldehid, a dalja fiksacija i priprema je vršena prema već pomenutom protokolu. Morfometrijskom analizom TEM preseka lumbosakralnog dela KM je utvrđen procenat mijelinizovanih, nemijelinizovanih očuvanih aksona i oštećenih aksona sa izmenjenom morfologijom i oštećenim organelama u aksoplazmi. Na ovaj način je analizirano dvadeset nasumično izabranih polja po lumbosakralnom preseku KM (20-40 nervnih vlakana po vidnom polju, uveličanje 4400×) po pacovu.

3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE I PROTOČNA CITOFLUORIMETRIJA

Protočna citofluorimetrija (engl., *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) je metoda koja se koristi kako bi se identifikovale, izdvojile i okarakterisale različite ćelijske populacije na osnovu veličine, morfologije i ekspresije membranskih i intracelularnih markera. U cilju ispitivanja uticaja GKT na različite subpopulacije mononuklearnih ćelija iz drenirajućeg limfnog čvora i tkiva KM primenjena je FACS analiza. Fenotipska karakterizacija mononuklearnih ćelija izvršena je na osnovu ekspresije površinskog markera T limfocita (CD3), kao i unutarćelijske ekspresije proinflamatornih citokina (IFN- γ , IL-17) i anti-inflamatornog citokina IL-10.

3.5.1. Detekcija membranskih i unutarćelijskih antigena mononuklearnih ćelija

Za potrebe eksperimenta, 5×10^5 ćelija izolovanih iz drenirajućeg limfnog čvora (7. dan posle imunizacije – d.p.i.) odnosno KM (14. d.p.i.) je resuspendovano u 400 μ l medijuma i stimulirano forbol miristat acetatom (PMA) (400 ng/ml) i jonomicinom (800 ng/ml) tokom 4 h na 37 °C. Nakon stimulacije je dodavan inhibitor oslobađanja proteina, tzv. Goldži blok Brefeldin A (5 μ M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Stimulisane ćelije su obeležene monoklonskim anti-CD3 (marker T limfocita) antitelom i odgovarajućim izotipskom kontrolom. Antitela korišćena u eksperimentima i njihove koncentracije/razblaženja navedeni su u Tabeli 1.

Tabela 1. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju ćelija

Antitelo	Proizvođač	Koncentracija (mg/ml)	Razblaženje	Obeleživač
Anti-pacovsko CD3	BD Pharmingen	0,5	1:500	FITC
Anti-pacovsko IgG3, κ IC	BD Pharmingen	0,5	1:10	FITC

FITC – fluorescein izotiocijanat

Nakon inkubacije sa CD3 antitelom (30 minuta na +4 °C) ćelije su fiksirane 2 % paraformaldehidom 15 minuta na sobnoj temperaturi, oprane u PBS i čuvane na +4 °C do permeabilizacije. Za permeabilizaciju i unutarćelijsko bojenje je korišćen pufer za permeabilizaciju (2 % FCS, 0,1 % Triton i 0,1 % BSA u PBS). Ćelije su inkubirane u permeabilizacionom puferu 30 minuta na +4 °C u prisustvu anti-IFN- γ , anti-IL-17, i anti IL-10 antitela i odgovarajućih izotipskih kontrola (Tabela 2.). Nakon permeabilizacije, ćelije su isprane (centrifugirane 3 minuta na 800 g) dva puta u puferu za permeabilizaciju i finalno resuspendovane u 300 μ l PBS. Obojene ćelije su brojane na protočnom citofluorimetru FACS Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka), a dobijeni rezultati su analizirani pomoću Diva softvera.

Tabela 2. Antitela korišćena za detekciju unutarćelijskih citokina

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

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

3.6. ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE GENA

Relativna ekspresija određenih gena u ispitivanim ćelijama je određivana korišćenjem kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja (engl., *Quantitative Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR), gde se količina

amplifikovane komplementarne DNK (cDNK) detektuje tokom PCR reakcije u realnom vremenu. Prethodno se iz ispitivanih ćelija izoluje RNK koja se reverznom transkripcijom prevede u cDNK. Za razliku od klasičnog PCR gde se količina umnoženih gena određuje na kraju reakcije, u jednoj vremenskoj tački, qRT-PCR metodom se količina umnoženih gena određuje u realnom vremenu nakon svakog ciklusa tokom reakcije, primenom fluorescentnih markera (fluorescentnih boja ili DNK proba sa fluoroforama).

3.6.1. Izolacija RNK

Uzorci (5×10^6 ćelija), su lizirani u 500 μ l reagensa za izolaciju ukupne RNK (engl., *Total RNA Isolation Kit*) (Metabion, Planegg, Nemačka). Zatim, u svaki uzorak je dodavano po 100 μ l hloroforma i nakon 10 minuta na +4 °C je vršeno centrifugiranje (12000 g, 15 minuta, +4 °C). Na izdvojenu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK je nalivena ista zapremina izopropanola kako bi se istaložila dobijena RNK. Nakon mešanja vodene faze i izopropanola, uzorci su držani na sobnoj temperaturi 30 minuta a potom centrifugirani (12000 g, 15 minuta, +4 °C). Istaložena RNK je ispirana sa 1 ml 75 % etanola i centrifugirana (7500 g, 5 minuta, +4 °C). Dobijeni precipitati su sušeni i rastvarani u 10 μ l demineralizovane vode. Merenjem apsorbance na 260 nm je određivana koncentracija izolovane ukupne RNK, a stepen njene čistoće je ispitivan na talasnoj dužini 280 nm (spektrofotometar *GeneQuant pro*) (Amersham, Velika britanija) koja odgovara maksimalnoj apsorbanci aromatičnih amino kiselina. (odnos A_{260nm}/A_{280nm} između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru).

3.6.2. Reverzna transkripcija

Prevođenje ukupne izolovane RNK u komplementarnu DNK (cDNK) je vršeno reakcijom reverzne transkripcije. Zapremina uzorka koja sadrži 1 μ g rastvorene RNK je do 13 μ l dopunjena demineralizovanim vodom. U svaki uzorak je dodato po 1,5 μ l

master miksa - 1 sačinjenog od 1 μ l heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 0,5 μ l 100 mM smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD). Ovako pripremljeni uzorci su stavljeni u već zagrejan blok aparata (*Mastercycler Gradient*) (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na +70 °C. Nakon prvog ciklusa, uzorci su izvađeni i hlađeni na ledu (2 minuta), posle čega je u svaki uzorak dodato po 4,5 μ l master miksa - 2 smeše sačinjene od 0,5 μ l inhibitora RNaze (40 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 4 μ l koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (*5x reaction buffer*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD). Zatim, je u svaki uzorak dodato po 1 μ l (200 U/ μ l) reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (*RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD) i uzorci su vraćeni u termalni blok kako bi se započela reverzna transkripcija, što je prikazano u Tabeli 3. Kako bi se proverilo prisustvo kontaminacije, svaki uzorak je imao i negativnu kontrolu koja je sadržala sve reagense osim uzorka RNK. Uzorci cDNK su do izvođenja kvantitativnog PCR čuvani na +4 °C.

Tabela 3. Prikaz ciklusa tokom reverzne transkripcije

Ciklus	Temperatura	Trajanje
1	70 °C	10 minuta
2	25 °C	15 minuta
3	42 °C	1 sat
4	70 °C	10 minuta
5	95 °C	3 minuta
6	4 °C	do qPCR

3.6.3. Kvantitativni PCR (qRT-PCR)

Kvantitativni qRT-PCR je korišćen za analizu relativne ekspresije gena za pro-inflamatorne i anti-inflamatorne citokine, kao i transkripcionih faktora. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bunara za kvantitativni PCR (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Reakciona

smeša koja je nalivana u bunare se sastojala od 5 μ l koncentrovanog komercijalnog master-miksa (*2x TaqMan Gene Expression Master Mix*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) i 1 μ l odgovarajućih prajmera. Na reakcionu smešu je dodavano po 4 μ l cDNK odgovarajućeg uzorka razblaženog 10 puta (20 μ l cDNK uzorka dobijenog u reverznoj transkripciji u 180 μ l demineralizovane vode). Svi uzorci su nalivani i dalje analizirani u duplikatu. Preko ploča je prelepljivan adhezivni film kako bi se sprečilo uparavanje uzoraka (*MicroAmp Optical Adhesive Film*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Uslovi amplifikacije su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Protokol amplifikacije uzoraka tokom qPCR metode

Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
	50 °C	2 minuta
	95 °C	10 minuta
↕ 40X	95 °C	15 sekundi
	60 °C	1 minut

Dobijena srednja vrednost Ct (engl., *threshold cycle*) kontrolnog (engl., *housekeeping*) gena je oduzeta od Ct vrednosti gena od interesa da bi se dobile Δ Ct vrednosti, pa je relativna ekspresija gena određena kao $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su predstavljeni u odnosu na vrednosti koje su dobijene u kontrolnim grupama koje su arbitrarno preračunata na 1.

3.6.4. Prajmeri i probe

Za potrebe qRT-PCR reakcije su korišćeni komercijalni eseji koji su za svaki pojedinačni gen sadržavali specifične prajmere i TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD). Finalne koncentracije prajmera i ispitivanih gena za sve eseje bile su 900 nM, a odgovarajućih proba 200 nM. Za umnožavanje i detektovanje cDNK za sve gene korišćene su oligonukleotidne smeše koje su sadržavale probe obeležene sa FAM. Kataloški brojevi svih eseja navedeni su u tabeli 5.

Tabela 5. Prajmeri i probe korišćeni u PCR reakciji

	Gen	Kataloški broj		Gen	Kataloški broj
1.	IFN-γ	Rn00594078_m1	6.	TNF	Rn99999017_m1
2.	T-bet	Rn01461633_m1	7.	IL-1	Rn00580432_m1
3.	IL-17A	Rn01757168_m1	8.	GM-CSF	Rn01456850_m1
4.	RORγt	Rn01533717_g1	9.	RN18S1	Hs03928985_g1
5.	IL-10	Rn00563409_m1			

3.7. IMUNOBLOT ANALIZA

Imunoblot je metoda za analizu ekspresije i aktivnosti proteina dobijenih liziranjem ćelija ili tkiva. Nakon izolacije i denaturacije, proteini se razdvajaju na osnovu molekulske mase pomoću elektroforeze na poliakrilamidnom gelu. Detekcija proteina zasniva se na međusobnoj interakciji određenog proteina sa specifičnim antitelom na površini membrane.

3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Tkiva drenirajućih limfnih čvorova i lumbosakralnog dela KM su homogenizovana i lizirana u RIPA puferu za liziranje (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP-40 i 0,25% Na-deoxycholat) u koji je dodat 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil florid), 1 mM Na-vanadat, 10 mM NaF i koktel inhibitora proteaza (20 μ l/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Uzorci su inkubirani na +4 °C 30 minuta, nakon čega su centrifugirani (14000 g, 15 minuta, +4°C), a izdvojeni supernatanti pokupljeni i dalje analizirani. Koncentracija ukupnih proteina u lizatima tkiva je određivana metodom po Bradfordu (140). Ukratko, prisustvo proteina je detektovano primenom Coomassie Brilliant Blue G-250 boje koja se u kiseloj sredini (u prisustvu proteina) menja iz crvene u plavu. Koncentracija proteina je merena na čitaču za mikrotitarske ploče na 570 nm. Intenzitet razvijene plave boje je direktno srazmeran koncentraciji proteina u uzorku. Razblaženje uzoraka u rastvoru 1x koncentrovane boje

Coomassie Brilliant Blue G-25 je iznosilo 1:1000. Kao standard proteina korišćen je BSA u koncentracijama od 5-25 µg/ml. Na osnovu poznatih koncentracija standarda izračunate su koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima.

3.7.2. Kvantifikacija ekspresije i aktivnosti proteina

Određena zapremina ukupnog tkivnog ekstrakta je kuvana 5 minuta na +100 °C sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (2 % SDS, 10 % glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002 % bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8). Proteini su denaturisani na +100 °C i obloženi negativno naelektrisanim molekulima SDS iz pufera. Prisustvo 2-merkaptotanola u puferu sprečava formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Na taj način, elektroforetsko razdvajanje proteina je izvršeno na osnovu razlika u molekulskim masama. Ispitivana je koncentracija aktivnih, fosforilisanih formi mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) koje regulišu apoptozu (SAPK/JNK, ERK1/2, p38) i proteina koji učestvuju u signalnom putu autofagije (AMPK, Akt, mTOR), kao i ekspresija proteina ključnih za odvijanje samog procesa autofagije (LC3-II, p62). U bunare poliakrilamidnog gela su sipane jednake koncentracije proteina (od 10 µg do 50 µg, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje proteina (4 % akrilamid/0,14 % bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10 % akrilamid/0,34 % bisakrilamid ili 12 % akrilamid/0,41 % bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8). Za ubrzanje polimerizacije gelova korišćeni su 0,05 % amonijumpersulfat i 0,033 % TEMED. Pufer za elektroforezu se sastojao od 192 mM glicina, 0,1 % SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Elektroforetsko razdvajanje je vršeno pri konstantnom naponu. Do izlaska iz gela za sabijanje proteina primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina napon je povećan na 200 V. Uzorci su se kretali kroz gel do izlaska bromfenol plavo boje sa gela. Na svaki gel je nanet i marker koji predstavlja smešu referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-250 kDa) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Posle završene elektroforeze proteini sa gela su preneti na nitrocelulozne membrane *Hybond C* (GE

Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) pomoću aparature za polusuvi transfer *TE 70 Semi-dry transfer unit* (Life Sciences, Tewksbury, SAD). Nitrocelulozne membrane, gelovi i visoko absorbujući filter papir su potapani u pufer za transfer (192 mM glicin, 20 % metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) i postavljeni u aparaturu za transfer sledećim redosledom: sloj filter papira, membrana, gel i sloj filter papira. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi kako bi pod dejstvom struje konstantne jačine (0,45 mA/membrani) negativno naelektrisani proteini putovali sa gela ka membrani. Nakon transfera (90 minuta), membrane su na sobnoj temperaturi inkubirane 60 minuta u 5 % rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) koji je sadržao 0,05 % Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST), kako bi se blokirala mesta nespecifičnog vezivanja proteina. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim zečijim primarnim antitelom preko noći na temperaturi od +4 °C uz blago mešanje, kako bi se antitela vezivala za odgovarajuće proteinske epitope. Primarna antitela su razblaživana u rastvoru za blokiranje u odnosu 1:750 (anti-fosfo/total SAPK/JNK, anti-fosfo/total ERK1/2, anti-fosfo/total p38, anti-fosfo/total AMPK, anti-fosfo/total Akt, anti-fosfo/total mTOR, anti-LC3B, anti-p62) i 1:2000 za anti- β -Aktin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD). Nakon 3 ispiranja u TBST, membrane su inkubirane u rastvoru za blokiranje sa anti-zečijim IgG, konjugovanim sa peroksidazom rena (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), 75 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, membrane su ponovo isprane 3 puta u TBST i prelivane sa supstratom za peroksidazu rena. Peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, razgrađuje H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Oslobođeni kiseonik reaguje sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata i dolazi do emisije fotona. Nastala svetlost je očitana u *Image Lab* programu u kome su dalje obrađeni dobijeni rezultati. Koncentracija fosforilisanih (enzimski aktivnih) proteina je izražena u odnosu na signal odgovarajućih nefosforilisanih formi, dok je koncentracija nefosforilisanih proteina (LC3-II, p62) izražena u odnosu na signal β -aktina. Dobijeni rezultati su predstavljeni u odnosu na netretiranu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

3.8. KULTIVISANJE ČELIJA *IN VITRO*

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje limfocita korišćen je medijum RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa 2 % pacovskog seruma. Suspenzije limfocita su dobijene iz cervikalnih limfnih čvorova neimunizovanih ili drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova DA soja. Ćelijska linija OLN93 je dobijena ljubaznošću prof. Markusa Kipa (Institut za Neuroanatomiju, Medicinski fakultet, Ahen, Nemačka). Ćelije su održavane u medijumu za kultivaciju ćelija DMEM (engl., *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), koji sadrži 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) koji je prethodno inkubiran 30 minuta na 56 °C u cilju inaktivacije komponenti sistema komplementa, 1 % glutamina, 1 % natrijum piruvata i 1 % penicilina/streptomicina (sve Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Primarna ćelijska kultura oligodendrocita, izolovana iz mozga pacova DA soja je održavana u DMEM medijumu uz dodatak 20 % inaktiviranog konjskog seruma (engl., *Horse Serum*, HS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), insulina (5 µg/ml), natrijum selenita (30 nM), transferina (50 µg/ml), hidrokortizona (20 µg/ml) i FBS (1 mg/ml). Primarna ćelijska kultura neurona, izolovana iz moždanog tkiva pacova DA soja, kao i PC12 ćelijska linija, dobijena ljubaznošću dr. Andrijane Klajn (Institut za Molekularnu Genetiku i Genetičko Inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Srbija), gajene su u DMEM medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (4,5 g/L), 10 % HS (engl., *Horse Serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 5 % FCS (engl., *Fetal Clone III serum*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD), 1 % glutamina i 1 % penicilina/streptomicina. Sve ćelije su kultivisane u inkubatoru na 37 °C u atmosferi sa 5 % CO₂. U zavisnosti od eksperimentalnih potreba, ćelije su zasejavane u ploče sa ravnim dnom sa 96 bunara (za utvrđivanje ćelijskog vijabiliteta) i 12 bunara (za FACS analizu i kokultivaciju) ili u 60 i 100 mm Petrijeve šolje (Sarstedt, Ag&Co.Kg, Nümbrecht, Nemačka) za elektronsku mikroskopiju i pasažiranje. Broj ćelija je određivan bojenjem sa tripan-plavim (0,1 % u PBS) (BDSL, Velika Britanija) i brojanjem nebojenih (vijabilnih) ćelija pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk. Mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušenog integriteta ćelijske membrane) nisu brojane. U zavisnosti od potreba eksperimenta, ćelije su zasejavane u odgovarajućem broju.

3.8.1. Izolacija i uspostavljanje primarne kulture oligodendrocita pacova

Oligodendrociti su izolovani iz mozga pacova prema ustanovljenom protokolu (141). Pacovi visokosrodnog DA soja, starosti 2 dana, su anestezirani i dekapitovani, nakon čega su uzorci preneseni u laminarnu komoru radi daljih manipulacija. Sterilnim instrumentima moždano tkivo je oslobođeno iz lobanje i izolovana je bela masa mozga. Uklanjanje meningeja je vršeno u HEPES-*Earls Balanced Salt Solution* (HEPES-EBSS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Izolovana bela masa je usitnjena pomoću skalpela u HEPES-EBSS sa 0,25 % tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i DNK-azom (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Usitnjeno tkivo je inkubirano 45 minuta na 37 °C, na orbitalnoj mešalici (brzina 200). Tripsinizacija je prekinuta dodavanjem HEPES-EBSS sa 10 % FBS, a uzorci tkiva su oboreni centrifugiranjem na 415 g tokom 5 minuta. Talog je dalje resuspendovan u HEPES-EBSS sa 0,1 % DNK-aze, a homogenizacija nastavljen provlačenjem uzorka kroz nastavke pipeta različitih promera (od većeg ka manjem) dok se nije dobila homogena smeša koja je profiltrirana kroz Nitex-15 nylon filter. Dobijeni homogenat je centrifugiran 5 minuta na 415 g, a izdvojen talog dalje resuspendovan u 15 ml 0,9 M saharoze u HBSS (GIBCO) i centrifugiran 10 minuta na 750 g. Saharozni medijum, zajedno sa mijelinom je uklonjen, a izdvojen talog resuspendovan u 2 ml HEPES-EBSS i dobijena suspenzija nalivena na površinu rastvora 4 % BSA (engl., *Bovine Serum Albumin*) u HEPES-EBSS (tako da je ukupna zapremina 12 ml). Diskontinuirani gradijent (0,3 %/0,4 %) je centrifugiran 7 min na 200 g, pri čemu je formiran talog oligodendrocita i astrocita koji je resuspendovan u medijumu i zasejan u Petri šolju. Čelije su preko noći ostavljene u inkubatoru sa 5 % CO_2 na 37 °C kako bi se sutradan odvojio medijum sa primarnim oligodendrocitima, dok su astrociti ostali adherirani za podlogu. Za potrebe određivanja vijabiliteta, oligodendrociti su potom zasejavani u ploče sa 96 bunara (8000 ćelija/bunaru).

3.8.2. Izolacija i uspostavljanje primarne kulture neurona pacova

Neuroni su iz mozga pacova izolovani prema ustanovljenom protokolu (142). Ukratko, pacovi DA soja, stari 6-8 dana su anestezirani ketaminom i dekapitovani,

nakon čega su u laminarnoj komori u sterilnim uslovima pomoću sterilnih instrumenata otvorene lobanje i izolovano moždano tkivo. Mali mozgovi su u hladnom HBSS medijumu očišćeni od okolnog tkiva, meningea i krvnih sudova. Usitnjeno tkivo malog mozga je centrifugirano 5 minuta na 200 g, a dobijeni talog tkiva je dalje inkubiran u 1 ml 0,25 % tripsina i DNK-aze 15 minuta na 37 °C. Tripsinizacija je prekinuta dodavanjem hladnog HBSS sa 10 % FBS. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 200 g, a talog homogenizovan u 1 ml DNK-aze provlačenjem kroz Pasterove pipete različitih promera (od većeg ka manjem). Nakon homogenizacije, u suspenziju je dodat hladan HBSS i uzorci su centrifugirani 15 minuta na 400 g. Supernatant je uklonjen, a dobijeni talog resuspendovan u DMEM medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (4.5 g/L), 10 % HS, 5 % FCS, 1 % glutamina i 1 % penicilina/streptomicina. Za potrebe određivanja vijabiliteta, primarni neuroni su zasejani u ploče sa 96 bunara (10000 ćelija/bunaru).

3.8.3. Izolacija mononuklearnih ćelija

Za potrebe izolovanja mononuklearnih ćelija iz zdravih i bolesnih životinja u induktivnoj fazi bolesti su nakon žrtvovanja izvađeni cervikalni (zdrave životinje) i drenirajući (imunizovane životinje, 7. d.p.i.) limfni čvorovi koji su potom potiskivani kroz sterilnu najlonsku mrežicu u PBS. Dobijena ćelijska suspenzija je centrifugirana (500 g, 5 minuta) a izdvojeni talog resuspendovan u RPMI-1640 medijumu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) obogaćenom sa 2 % pacovskog seruma. Mononuklearne ćelije su izolovane iz KM imunizovanih pacova na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.). Nakon žrtvovanja, životinje su perfundovane sterilnim PBS rastvorom u cilju uklanjanja ćelija krvi iz KM (pre svega eritrocita). Tkivo KM je homogenizovano protiskivanjem kroz sterilnu najlonsku mrežicu u PBS. Dobijeni homogenat je centrifugiran 2 minuta na 700 g, a izdvojeni talog je dalje resuspendovan u 40 % Perkolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i zatim nalivan na 70 % Perkol kako bi se napravio gustinski gradijent Perkola neophodan za izdvajanje mononuklearnih ćelija. Nakon centrifugiranja (800 g, 60 minuta), na granici dva gustinski različita sloja Perkola se uočava beličasti prsten mononuklearnih ćelija KM koji je sakupljan i dva puta ispiran (900 g, 5 minuta) od

ostataka Perkola u RPMI-1640 medijumu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) obogaćenom sa 2 % pacovskog seruma.

3.9. ISPITIVANJE EFEKTA GKT NA ĆELIJAMA

3.9.1. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija

U cilju ispitivanja efekta GKT na komercijalnim ćelijskim linijama, OLN93 (8000 ćelija/bunaru) i PC12 (10000 ćelija/bunaru) ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara za adherentne ćelije i tretirane različitim koncentracijama GKT (0,015 mg/ml – 0,5 mg/ml). Kontrolne ćelija nisu tretirane sa GKT. Nakon 24 h su određivani vijabiliteti MTT testom, a na osnovu dobijenih rezultata za dalje eksperimente je odabrana najveća koncentracija GKT koja nije bila citotoksična.

3.9.2. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija u prisustvu aktiviranih T limfocita

Ćelijske linije OLN93 i PC12 su ko-kultivisane sa limfocitima pacova u *Corning Transwell 3460 System* pločama sa 12 bunara (Life Sciences, Tewksbury, MA, SAD). OLN93 (1.5×10^5) i PC12 (3.5×10^5) ćelije su zasejavane na dno bunara za adherentne ćelije, dok su limfociti (1×10^6) zasejavani u plastične inserte sa permeabilnom membranom (pore dijametra 0,4 μm) koji se postavljaju iznad bunara. Netretirane ćelije i ćelije tretirane sa GKT (100 $\mu\text{g/ml}$, 2 h pre ko-kultivacije) su inkubirane sa nestimulisanim limfocitima ili sa limfocitima stimulisanim mitogenom T-ćelija, konkanavalinom A (ConA, 5 $\mu\text{g/ml}$). Vijabilitet ćelija je određen MTT testom nakon 48 h. Koncentracija GKT (100 $\mu\text{g/ml}$) korišćena u ovom eksperimentu izabrana je na osnovu prethodnih eksperimenata (odjeljak 3.9.1.) u kojima je pokazano da je ovo maksimalna koncentracija GKT koja nije toksična za OLN93 i PC12 ćelije.

3.9.3. Ispitivanje efekta GKT na ekspresiju gena za medijatore inflamacije u limfocitima stimulisanim sa ConA

Limfociti izolovani iz cervikalnih limfnih čvorova pacova (5×10^6) su zasejavani u ploče za suspenzije sa 12 bunara. Kontrolni (netretirani) limfociti su inkubirani u čistom medijumu, dok su preostale ćelije tretirane sa ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) u prisustvu ili odsustvu GKT ($100 \mu\text{g/ml}$) tokom 8 h. Nakon inkubacije, sadržaj pojedinačnih bunara je centrifugiran (500 g , 5 minuta), a na talog izdvojenih limfocita je nalivano po $500 \mu\text{l}$ trizola radi izolacije RNK za qRT-PCR. Supernatanti dobijeni ConA stimulacijom limfocita tokom 24 h su dalje korišćeni za eksperimente (odjeljak 3.9.4.).

3.9.4. Ispitivanje efekta GKT na vijabilitet oligodendrocita i neurona u prisustvu supernatanta ConA stimulisanih limfocita

OLN93 ćelije (8000 po bunaru), PC12 ćelije (10000 po bunaru), primarni oligodendrociti (8000 po bunaru) i neuroni (10000 po bunaru) su zasejavani u ploče sa 96 bunara. Ćelije su inkubirane sa GKT ($50 \mu\text{g/ml}$) tokom 2 h, a potom tretirane sa 25 % supernatantom dobijenim od nestimulisanih ili limfocita stimulisanih sa ConA (odjeljak 3.9.3.). Nakon 24 h, određivani su vijabiliteti ćelija MTT testom.

3.9.5. Ispitivanje ćelijskog vijabiliteta

Vijabilitet ćelija je ispitivan MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) testom koji sa zasniva na redukciji MTT od strane mitohondrijalnih dehidrogenaza živih ćelija, pri čemu nastaje formazan ljubičaste boje. Nakon završetka tretmana, sadržaj bunara u pločama za kultivaciju ćelija je odliven i u bunare je nalivan MTT rastvor ($0,5 \text{ mg/ml}$) u odgovarajućoj zapremini ($200 \mu\text{l}$ za ploče sa 12 bunara, odnosno $50 \mu\text{l}$, za ploče sa 96 bunara). Nakon inkubacije od 1 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sadržaj bunara je odliven, a ćelije lizirane sa DMSO koji rastvara formazan. Intenzitet apsorbance je očitao na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene

ljubičaste boje i odgovarajuća vrednost absorbance srazmerni su broju živih ćelija. Rezultati su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na netretirane kontrole za koje je vijabilitet arbitrarno preračunat na 100 %.

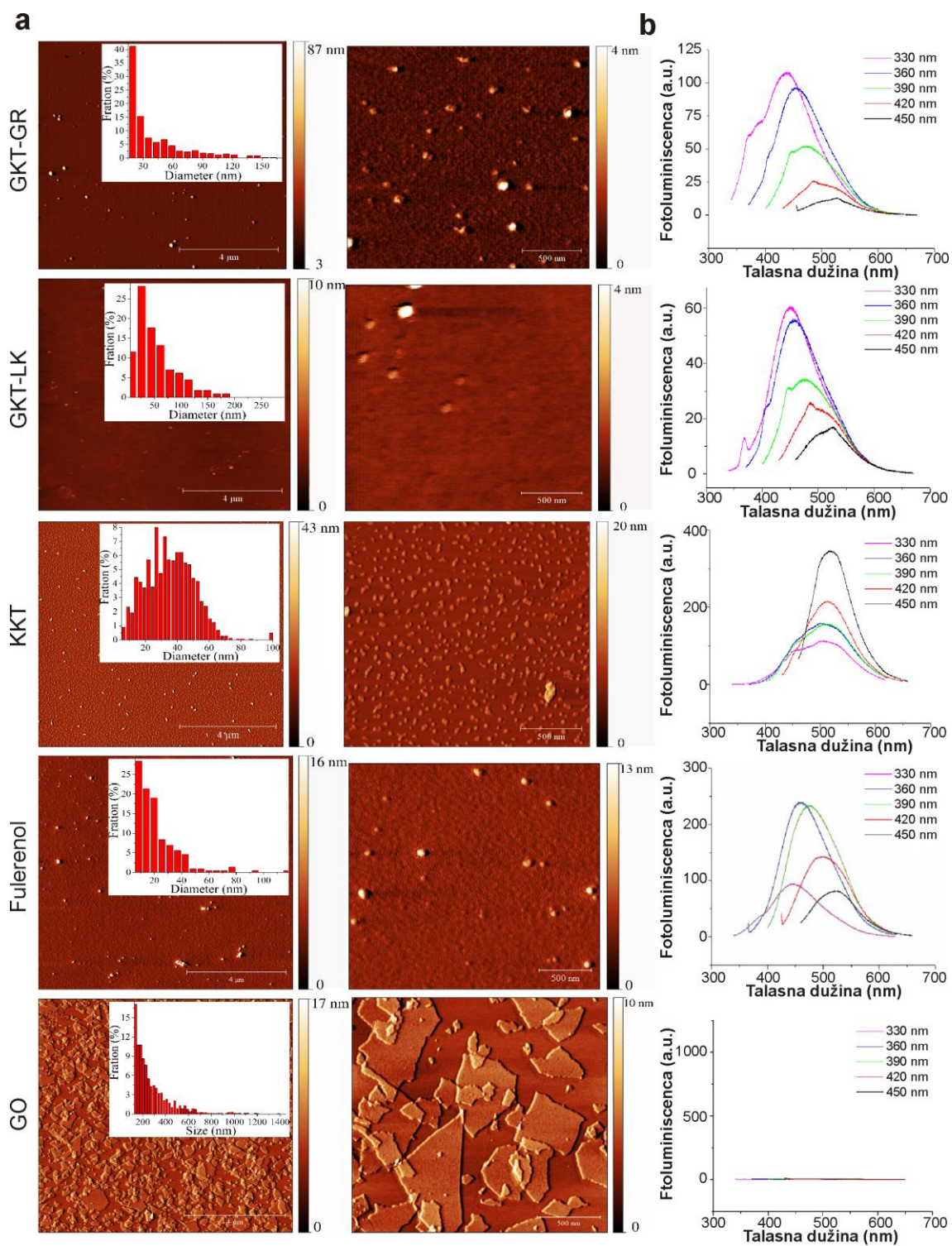
3.10. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ili iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu su predstavljeni kao srednje vrednosti (SV) \pm standardna devijacija (SD). U pojedinim priložima prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta izabranog od nekoliko ponovljenih eksperimenata sa sličnim ishodom. Za procenu značajnosti razlika nezavisnih uzoraka korišćen je Studentov t-test, jednosmerna analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey testom ili Chi-square test. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERIZACIJA UGLJENIČNIH NANOČESTICA

Nakon pripreme grafenskih kvantnih tačaka sintetisanih elektrohemijom oksidacijom grafita (GKT-GR), termalnom dekompozicijom limunske kiseline (GKT-LK), fulerenola, KKT i GO, opisane u poglavlju Materijal i Metode, izvršeno je ispitivanje njihovih fizičko-hemijskih karakteristika. Mikroskopijom atomskih sila analizirano je po 100 nanočestica iz svake grupe da bi se dobili podaci o njihovoj veličini i morfologiji. Grafenske kvantne tačke su sintetisane termalnom dekompozicijom limunske kiseline, koja spada u „bottom up“ metode i elektrohemijom oksidacijom grafita, koja spada u „top-down“ metode. GKT-GR i GKT-LK imaju oblik diska i slične dimenzije. Prosečan prečnik GKT-GR iznosio je oko 40 nm a GKT-LK oko 50 nm, dok je visina obe vrste GKT odgovarala jednoslojnom grafenu (1 nm). KKT su bile manjih dimenzija i morfologije koja je varirala od diskoidne do sferične, sa prečnikom od približno 35 nm i visinom 6 nm. Čestice fulerenola bile su sferičnog oblika, bočnih dimenzija od približno 20 nm i prosečne visine oko 13 nm, dok su čestice GO bile nepravilnog oblika, prečnika oko 300 nm i sačinjene pretežno od monosloja grafena (1 nm) (Slika 3). Za ispitivanje fotoluminiscentnih svojstava, uzorci su pobuđivani svetlošću različitih talasnih dužina (330, 360, 390, 420 i 450 nm) (Slika 3). Analizom PL spektara pokazano je da GKT-GR i GKT-LK imaju najveći intenzitet fotoluminiscencije u plavom delu spektra, pri ekscitaciji sa talasnom dužinom od 330 nm. Povećanjem ekscitatornih talasnih dužina dolazi do pomeranja emisionih spektara ka većim talasnim dužinama. KKT ostvaruju najveći intenzitet luminiscencije pri ekscitaciji sa talasnom dužinom od 450 nm, dok fulerenoli imaju najveći intenzitet luminiscencije pri ekscitaciji sa talasnom dužinom od 360 nm. Slično GKT-GR i GKT-LK, primenom većih ekscitatornih talasnih dužina povećavala se i talasna dužina emisioni spektara. Za razliku od ostalih ugljeničnih nanočestica, GO ne emituje svetlost pri pobudi sa talasnim dužinama u opsegu od 330 do 450 nm.



Slika 3. Karakterizacija ugljeničnih nanočestica. Prikazane su slike dobijene AFM mikroskopijom (a) i fotoluminiscentni spektri (b) GKT sintetisanih elektrohemijom oksidacijom grafita (GKT-GR), GKT sintetisanih termalnom dekompozicijom limunske kiseline (GKT-LK), KKT, fulerenola i GO.

XPS analizom ugljeničnih nanočestica je ispitivana zastupljenost sp^2/sp^3 veza i prisustvo kiseoničnih funkcionalnih grupa (Tabela 6). Dobijeni rezultati ukazuju na najviši stepen uređenosti u kristalnoj rešetki GKT-GR (odnos $sp^2/sp^3 > 2$), zatim slede GKT-LK (odnos $sp^2/sp^3 = 1$), dok u strukturi KKT, fulerenola i GO dominiraju sp^3 veze. Ispitivane ugljenične nanočestice se međusobno razlikuju i u zastupljenosti kiseoničnih grupa - GKT-GR i KKT imaju značajno manje C-O grupa u odnosu na ostale nanočestice, najniži procenat C=O je zabeležen kod GO, dok GKT-GR karakteriše odsustvo O-C=O funkcionalnih grupa.

Tabela 6. XPS analiza ugljeničnih nanočestica.

Uzorak	GKT-GR (%)	GKT-LK (%)	KKT (%)	Fulerenol (%)	GO (%)
C1s sp^2	58,8	33,5	31,1	20,6	23,2
C1s sp^3	27,7	34,6	37,8	55,1	35,7
C1s C-O	8,4	19,6	7,3	15,1	33,7
C1s C=O	5,1	6,3	13,7	7,9	1,4
C1s O-C=O	0,0	5,8	8,9	1,2	3,9

Dobijene vrednosti zeta potencijala (Tabela 7), koji predstavlja meru naelektrisanja površine čestica, ukazuju na elektrohemijsku stabilnost suspenzija. Niske vrednosti zeta potencijala mogu da budu posledica povećanja negativnog naelektrisanja usled deprotonizacije karboksilnih funkcionalnih grupa. U skladu sa time, najviša vrednost zeta potencijala kod GKT-GR se može pripisati odsustvu karboksilnih funkcionalnih grupa.

Tabela 7. Vrednosti zeta potencijala.

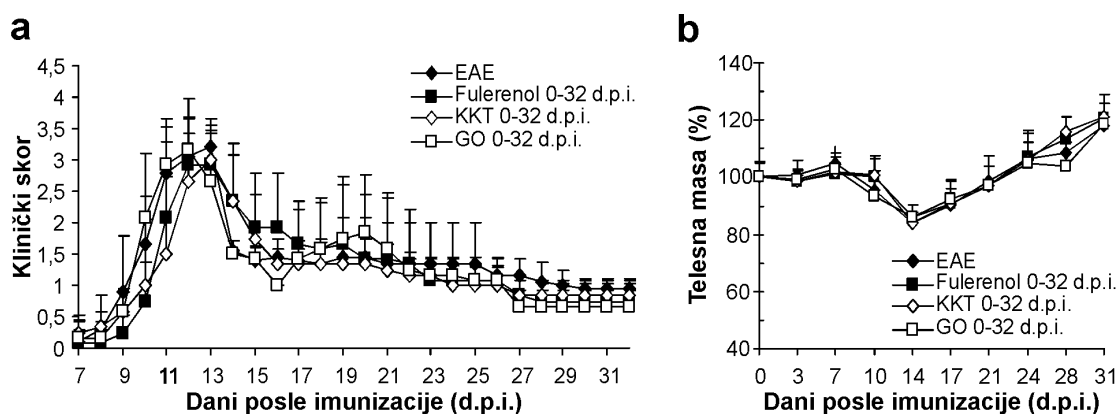
Uzorak	Zeta potencijal (mV)
GKT-GR	$-14,0 \pm 2,0$
CKT-LK	$-26,3 \pm 3,6$
KKT	$-25,6 \pm 3,6$
Fulerenol	$-31,0 \pm 5,0$
GO	$-29,3 \pm 2,3$

4.2. ISPITIVANJE UTICAJA TRETMANA UGLJENIČNIM NANOČESTICAMA NA KLINIČKI TOK EAE

Intraperitonealna aplikacija različitih ugljeničnih nanočestica nije pokazala akutnu toksičnost kod eksperimentalnih životinja, niti je izazvala efekte koji bi mogli da interferiraju sa evaluacijom kliničkih simptoma EAE.

4.2.1. KKT, fulerenol i GO ne utiču na klinički tok EAE

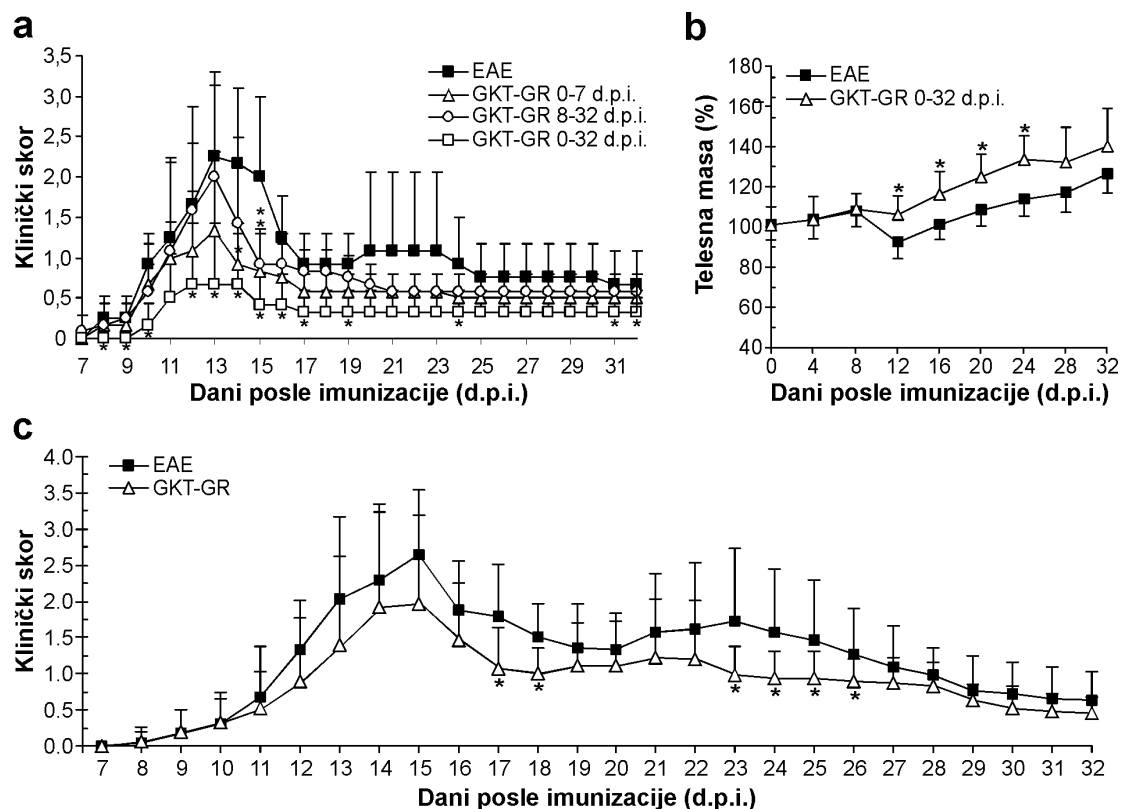
Svakodnevna intraperitonealna aplikacija KKT, fulerenola i GO tokom 32 dana od imunizacije nije dovela do značajnih promena u kliničkom toku EAE (Slika 4a) i telesnoj masi ispitivanih životinja (Slika 4b). Pošto tretman pomenutim nanočesticama nije uticao na klinički tok bolesti, one nisu korišćene u daljim ispitivanjima.



Slika 4. KKT, fulerenol i GO ne utiču na klinički tok EAE. Pacovi imunizovani homogenatom KM u kompletnom Frojndovom adjuvansu (n=8 po grupi) su tretirani svaki dan intraperitonealnom injekcijom PBS (kontrolna grupa), odnosno fulerenola, KKT, ili GO (10 mg/kg). Klinička slika je evaluirana svakodnevno, a rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$.

4.2.2. GKT smanjuju kliničke simptome EAE

Za razliku od ostalih ugljeničnih nanočestica, GKT sintetisane elektrohemijском oksidacijom grafita (GKT-GR) značajno su smanjile kliničke simptome EAE (Slika 5a). Najbolji efekat je postignut u grupi kojoj su GKT-GR aplikovane svakodnevno, tokom cele bolesti, dok je slabije protektivno dejstvo zapaženo u grupama koje su primale GKT-GR tokom induktivne faze bolesti (0-7. d.p.i.), kao i tokom efektorske faze i faze oporavka (8-32. d.p.i.). U skladu s tim, aplikacija GKT-GR tokom svih faza bolesti (0-32 d.p.i.) značajno je odložila početak bolesti i smanjila kumulativni klinički skor i najveći klinički skor u odnosu na kontrolnu EAE grupu, dok davanje GKT-GR tokom induktivne i efektorske faze nije dovelo do promena u ovim parametrima (Tabela 8). Poznato je da je razvoj EAE praćen smanjenjem telesne mase, što je zabeleženo i u ovom slučaju. Blaža klinička slika životinja tretiranih sa GKT-GR korelirala je sa značajno manjim gubitkom telesne mase u odnosu na kontrolnu eksperimentalnu grupu, što potvrđuje protektivno dejstvo GKT-GR tretmana (Slika 5b). Iako je pojava relapsa u ovom modelu niska, u kontrolnoj EAE grupi je zapažena njihova pojava tokom faze oporavka. Kako bismo ispitali da li GKT-GR utiču na pojavu relapsa, sproveden je eksperiment sa većim grupama životinja ($n=20$). U grupi kojoj je aplikovan tretman od pojave prvih kliničkih znakova bolesti zabeležena je znatno niža učestalost relapsa (5 %, odnosno 1 od 20 životinja) u odnosu na kontrolnu EAE grupu (35 %, odnosno 7 od 20 životinja; $p < 0,05$) (Slika 5c).

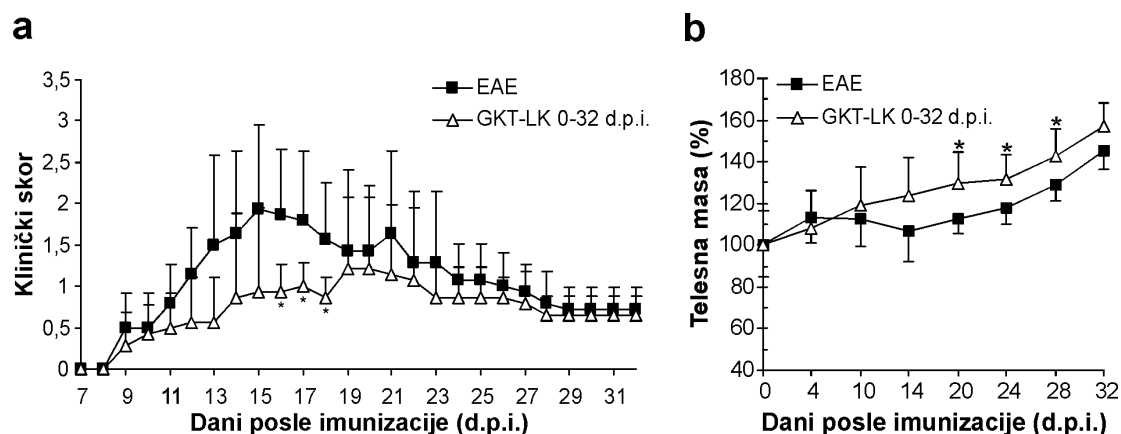


Slika 5. GKT-GR ublažavaju klinički tok EAE. Pacovi imunizovani homogenatom KM u kompletnom Frojndovom adjuvansu ($n=8$ po grupi) su tretirani svakodnevno intraperitonealnom injekcijom PBS (kontrolna grupa) ili GKT-GR (10 mg/kg) tokom induktivne (0-7. d.p.i.), efektorske/faze oporavka (8-32. d.p.i.) i tokom svih faza bolesti (0-32. d.p.i.). Klinička slika je evaluirana svakodnevno, a telesna masa je merena na svakih 4-5 dana. Rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (* $p<0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu EAE grupu).

Tabela 8. GKT-GR smanjuju kliničke parametre EAE. Pacovi imunizovani homogenatom KM u kompletnom Frojndovom adjuvansu ($n=8$ po grupi) su tretirani svakodnevno sa PBS (kontrolna grupa), ili GKT-GR (10 mg/kg) tokom induktivne (0-7. d.p.i.), efektorske/faze oporavka (8-32. d.p.i.) i tokom svih faza bolesti (0-32. d.p.i.). Klinička slika je evaluirana svakodnevno, a rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (* $p<0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu EAE grupu).

	Dan početka EAE	Kumulativni klinički skor	Najveći klinički skor
EAE	$9,00 \pm 1,10$	$28,80 \pm 13,80$	$2,42 \pm 0,86$
GKT-GR 0-7. d.p.i.	$9,33 \pm 1,03$	$15,50 \pm 2,96^*$	$1,58 \pm 0,79^*$
GKT-GR 8-32. d.p.i.	$9,83 \pm 1,86$	$19,08 \pm 6,15$	$2,17 \pm 0,90$
GKT-GR 0-32. d.p.i.	$10,8 \pm 0,84^*$	$10,20 \pm 8,01^*$	$0,75 \pm 0,69^*$

Slično rezultatima dobijenim sa GKT-GR, svakodnevna aplikacija GKT sintetisanih termalnom dekompozicijom limunske kiseline (GKT-LK) je statistički značajno smanjila simptome EAE u efektorskoj fazi bolesti (Slika 6a) i sprečila gubitak telesne mase imunizovanih životinja (Slika 6b).



Slika 6. Tretman sa GKT-LK ublažava klinički tok EAE (a) dok značajan efekat na telesnu masu nije uočen (b). Pacovi imunizovani homogenatom KM u kompletnom Frojndovom adjuvansu (n=8 po grupi) su tretirani svakodnevno intraperitonealnom injekcijom PBS (kontrolna grupa) ili GKT-LK (10 mg/kg). Klinička slika je evaluirana svakodnevno, a telesna masa je merena na svakih 4-5 dana. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu EAE grupu).

U skladu sa tim zapaženo je statistički značajno smanjenje kumulativnog kliničkog skora kod životinja tretiranih sa GKT-LK u odnosu na kontrolnu EAE grupu (Tabela 9). Međutim, iako je u grupi životinja tretiranih sa GKT-LK bio prisutan trend odlaganja početka bolesti kao i sniženja najveće kliničkog skora, ove razlike nisu dostigle statističku značajnost (Tabela 9).

Tabela 9. Tretman sa GKT-LK ublažava kliničke parametre EAE. Pacovi imunizovani homogenatom kičmene moždine u kompletnom Frojndovom adjuvansu (n=8 po grupi) su tretirani svakodnevno sa PBS (kontrolna grupa) ili GKT-LK (10 mg/kg). Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD, gde *p<0,05 označava statističku značajnost razlike EAE kontrole u odnosu na tretiranu eksperimentalnu grupu (tretman GKT-LK.)

	Dan početka EAE	Kumulativni klinički skor	Najveći klinički skor
EAE	9,7 ± 1,3	28,0 ± 7,1	2,6 ± 0,8
GKT-LK 0-28. d.p.i.	11,3 ± 3,3	19,0 ± 5,8*	1,6 ± 1,0

Prema tome, zbog veće efikasnosti u EAE modelu u daljim eksperimentima su korišćene GKT dobijene elektrohemijском oksidacijom grafitnih elektroda (GKT-GR – u daljem tekstu GKT).

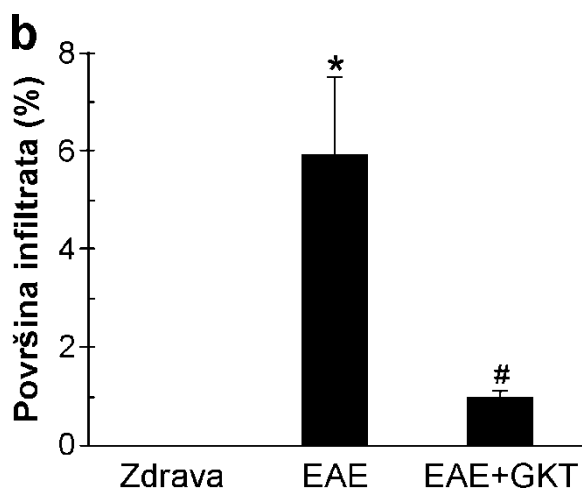
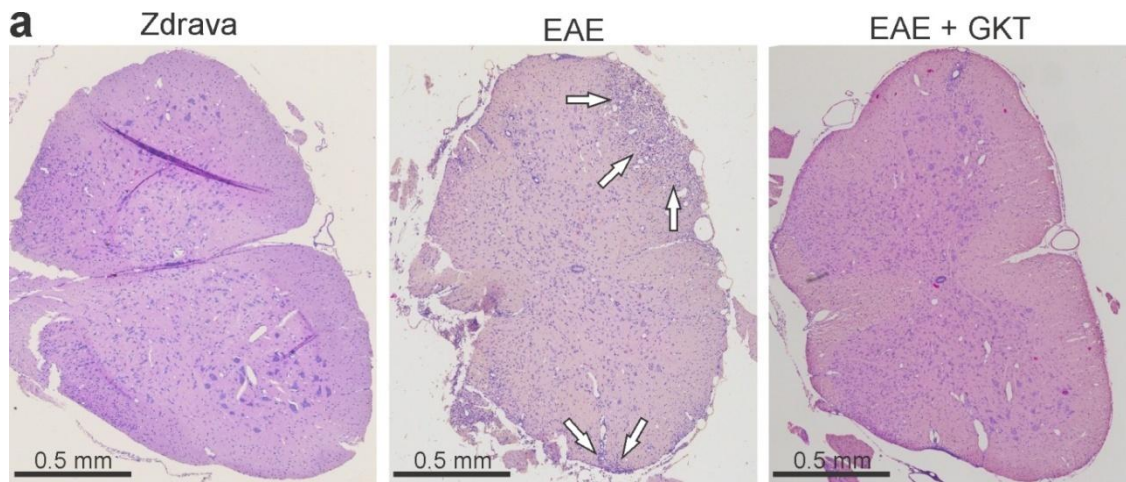
4.3. ISPITIVANJE UTICAJA GKT NA PROMENE U CNS TOKOM EAE

Kao što je u prethodnom poglavlju pokazano, od svih ispitanih ugljeničnih nanočestica jedino GKT odlažu pojavu i smanjuju intenzitet kliničkih simptoma EAE. Pošto infiltracija autoreaktivnih limfocita u tkivo CNS dovodi do apoptoze neurona i oligodendrocita i demijelinizacije u EAE (143, 144), želeli smo da ispitamo da li je blaža klinička slika u korelaciji sa uticajem GKT na navedene promene.

4.3.1. GKT smanjuju limfocitnu infiltraciju CNS u EAE

Za razliku od zdravih, neimunizovanih životinja koje nisu imale limfocitne infiltrate u CNS, mikroskopskom analizom lumbosakralnih preseka KM uzorkovanih na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.) uočeno je prisustvo subpijalnih i perivaskularnih mononuklearnih infiltrata u kontrolnoj EAE grupi (Slika 9a). Kod životinja koje su tretirane sa GKT broj i veličina mononuklearnih infiltrata bili su smanjeni u odnosu na

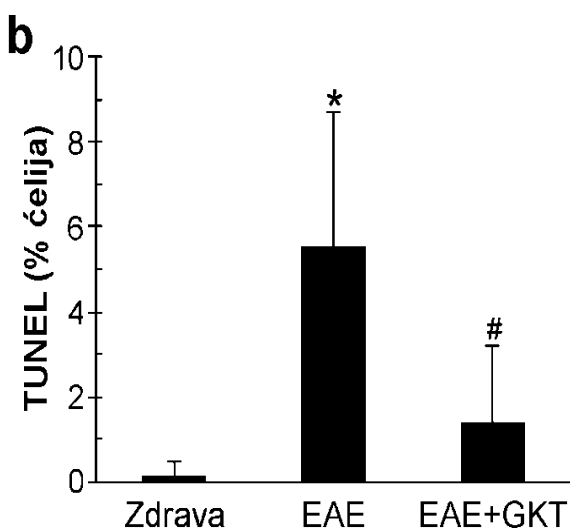
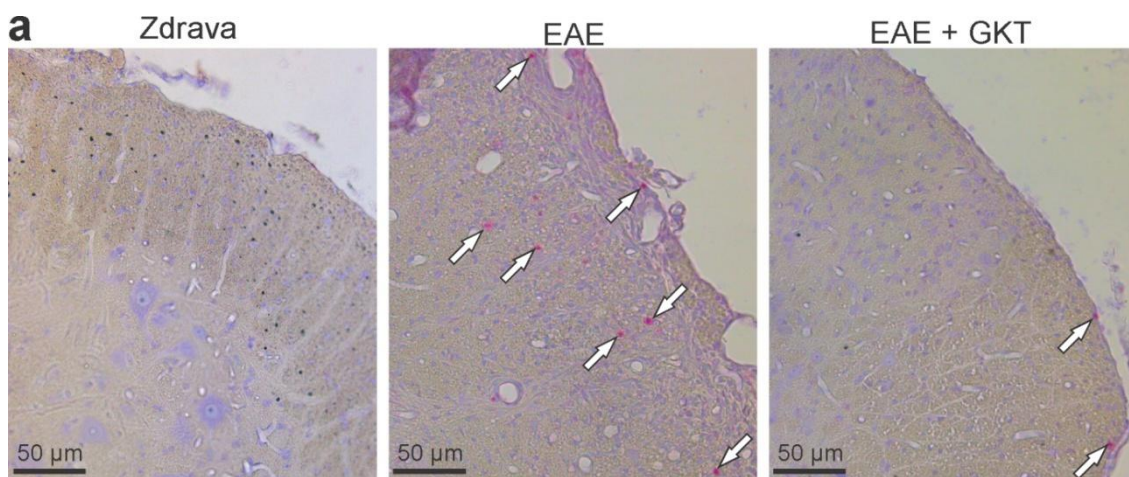
kontrolnu EAE grupu, što je potvrđeno i statističkom analizom razlika u površini mononuklearnih infiltrata između ove dve grupe (Slika 9b). Dakle, GKT smanjuju nakupljanje mononuklearnih infiltrata u CNS imunizovanih pacova.



Slika 9. GKT smanjuju limfocitnu infiltraciju CNS u EAE. Lumbosakralni preseki KM zdravih (n=5) i životinja u vrhuncu bolesti (14. d.p.i.) tretiranih sa PBS (EAE) (n=5) i GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT) (n=5) obojeni su hematoxilin-eozinom (a). Strelice na reprezentivnim mikrografijama pokazuju limfocitne infiltrate. Površina mononuklearnih infiltrata kvantifikovana je morfometrijskom analizom (b). Rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$, (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na zdravu grupu; # $p < 0,05$ se odnosi na EAE grupu).

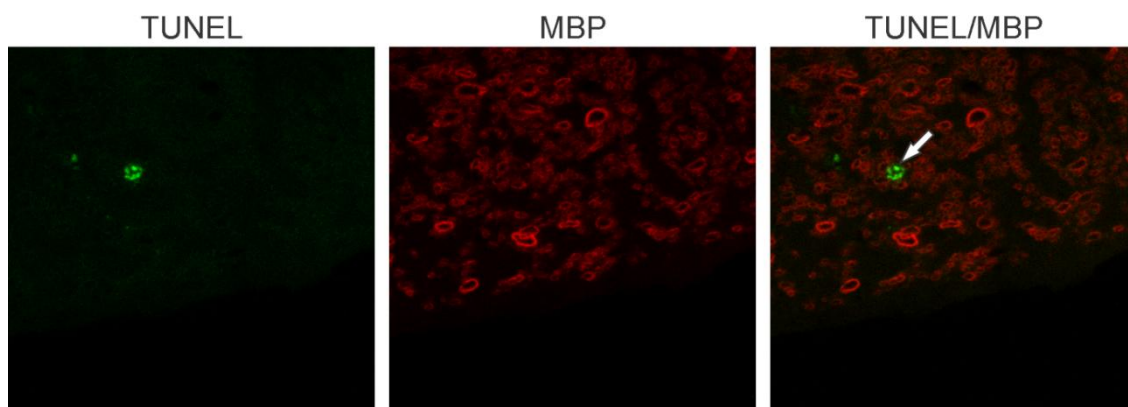
4.3.2. Tretman GKT smanjuje procenat apoptotičnih ćelija u KM tokom EAE

Korišćenjem TUNEL eseja koji detektuje fragmentisanu DNK pokazano je značajno povećanje apoptotičnih TUNEL+ ćelija sa crveno obojenim jedrom u kontrolnoj EAE grupi u odnosu na zdrave životinje. U EAE grupi životinja koje su tretirane sa GKT procenat TUNEL+ ćelija je značajno manji u odnosu na EAE kontrolnu grupu ($p < 0,05$) (Slika 10a), što je potvrđeno morfometrijskom analizom (Slika 10b). Mali broj TUNEL+ jedara lokalizovanih subprijalno verovatno pripada leukocitima, dok je većina TUNEL+ jedara locirana unutar bele mase KM.



Slika 10. GKT smanjuju broj apoptotičnih ćelija u CNS životinja obolelih od EAE. Lumbosakralni delovi KM su prikupljeni od zdravih ($n=5$) i životinja u vrhuncu bolesti (14. d.p.i.) tretiranih sa PBS (EAE) ($n=5$) i GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT) ($n=5$). (TUNEL bojenjem je utvrđeno prisustvo apoptotičnih ćelija koje su na reprezentativnim mikrofografijama označene strelicama (a), a razlika u njihovom broju je statistički analizirana (b). Rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na zdravu grupu, a # $p < 0,05$ u odnosu na EAE grupu).

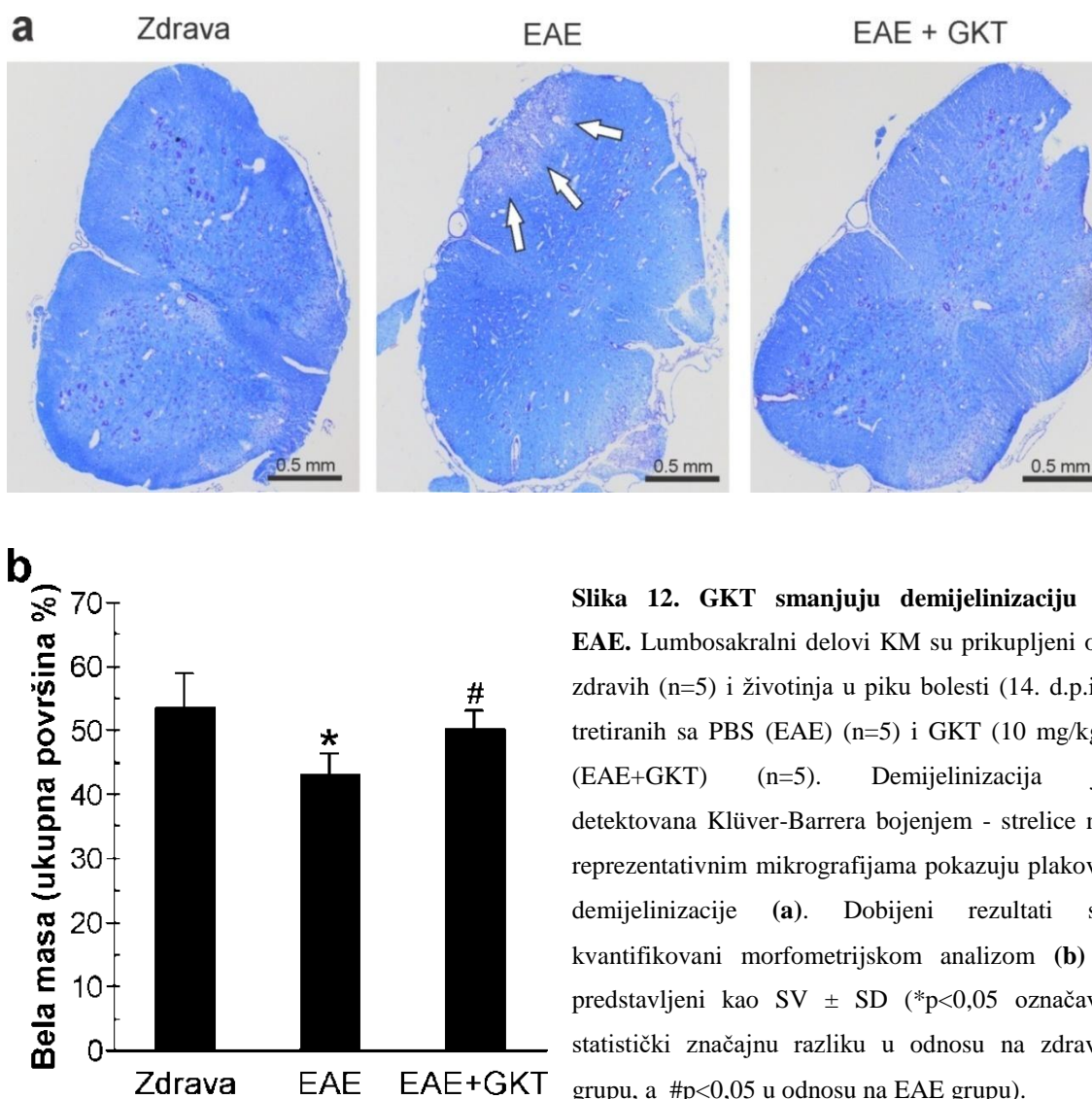
Kako bismo identifikovali apoptotične ćelije prisutne u beloj masi KM bolesnih životinja, vršeno je dvostruko TUNEL/MBP bojenje. MBP antitelo se vezuje za MBP koji je prisutan u mijelinskom omotaču aksona. Nakon preklapanja obojenih preseka, TUNEL+ jedra se kolokalizuju sa MBP+ strukturama (Slika 11), što ukazuje da su apoptotične ćelije uglavnom oligodendrociti.



Slika 11. Oligodendrociti su dominantna populacija apoptotičnih ćelija u CNS životinja sa EAE. Lumbosakralni preseki KM prikupljeni u vrhuncu bolesti (14. d.p.i.) od životinja tretiranih sa PBS (n=5) su podvrgnuti dvostrukom TUNEL/MBP bojenjem. Strelica na reprezentativnim mikrografijama pokazuje TUNEL+ jedro u MBP+ oligodendrocytu.

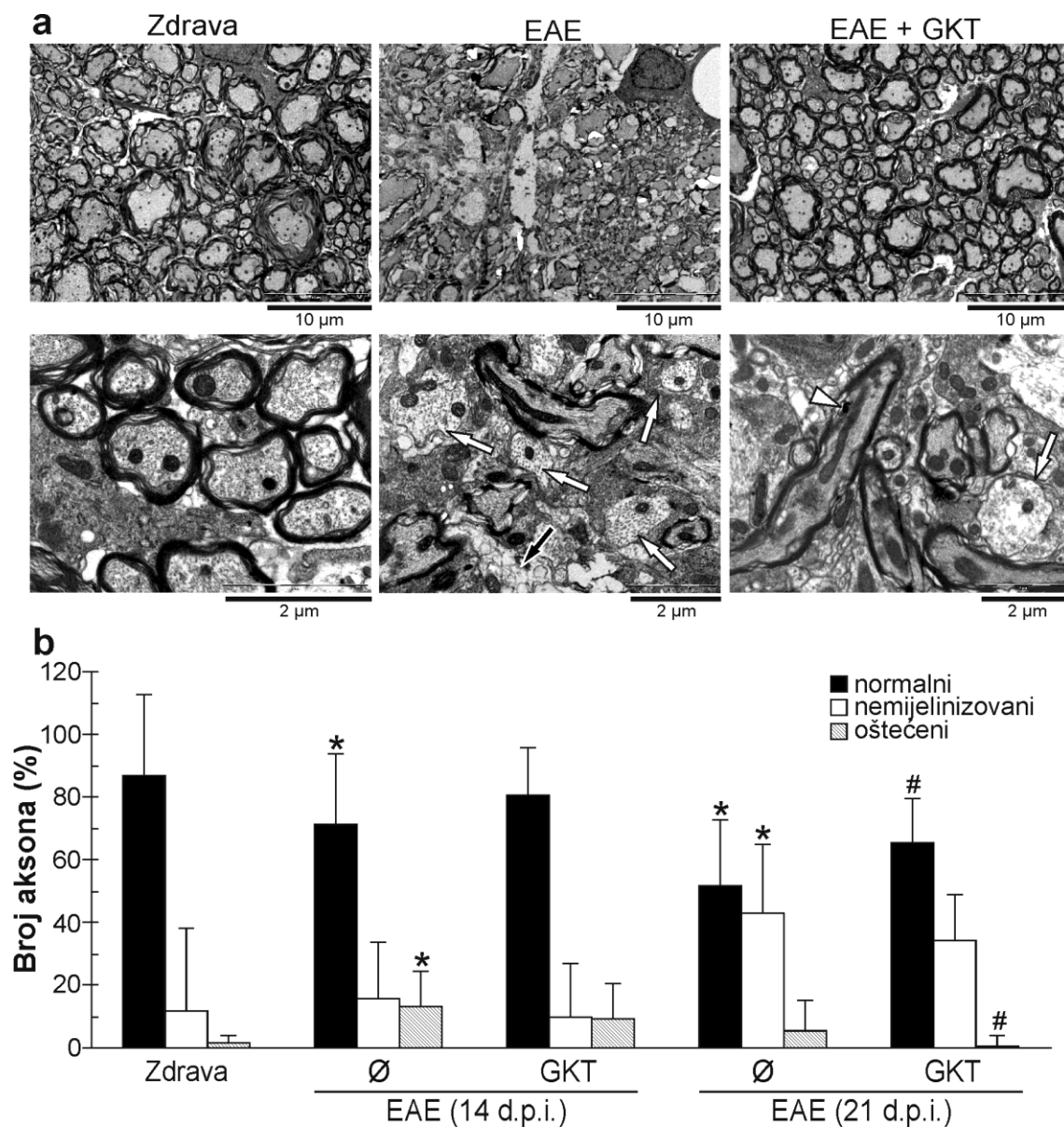
4.3.3. GKT smanjuju demijelinizaciju u EAE

Klüver-Barrera bojenjem lumbosakralnih preseka KM kontrolne EAE grupe u vrhuncu bolesti (14.d.p.i.) se jasno uočavaju prosvetljenja (označena strelicama) koja odgovaraju demijelinizacionim plakovima, a koja su odsutna u GKT tretmanu, kao i kod zdravih životinja (Slika 12a). Smanjenje demijelinizacije posle tretmana sa GKT potvrđeno je morfometrijskom analizom histoloških preseka (Slika 12b).



Slika 12. GKT smanjuju demijelinizaciju u EAE. Lumbosakralni delovi KM su prikupljeni od zdravih (n=5) i životinja u piku bolesti (14. d.p.i.) tretiranih sa PBS (EAE) (n=5) i GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT) (n=5). Demijelinizacija je detektovana Klüver-Barrera bojenjem - strelice na reprezentativnim mikrografijama pokazuju plakove demijelinizacije (a). Dobijeni rezultati su kvantifikovani morfometrijskom analizom (b) i predstavljeni kao $SV \pm SD$ (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na zdravu grupu, a # $p < 0,05$ u odnosu na EAE grupu).

Za preciznije utvrđivanje demijelinizacije, kao i ultrastrukturnih morfoloških promena u tkivu KM, korišćena je TEM (Slika 13a). U poređenju sa mijelinizovanim aksonima, očuvanim neurofilamentima i mikrotubulima u aksoplazmi zdravih životinja, kod kontrolne EAE grupe se zapaža prisustvo nemijelinizovanih aksona. Štaviše, na elektromikrografijama su prisutni oštećeni aksoni sa narušenom arhitekturom aksoplazme, elektronski gustim organelama, kao i izmenjenim mitohondrijama sa kondenzovanim matriksom i oštećenim ili potpuno odsutnim mitohondrijalnim kristama. Sa druge strane, u odnosu na EAE kontrolnu grupu, životinje tretirane sa GKT imaju znatno manje nemijelinizovanih i oštećenih aksona i mitohondrija (Slika 13a). Morfometrijskom analizom elektromikrografija je pokazano da kod životinja u kontrolnoj EAE grupi u 14. i 21. d.p.i. dolazi do demijelinizacije i oštećenja aksona, što dovodi do smanjenja broja normalnih aksona u odnosu na zdrave životinje ($p < 0,05$). GKT smanjuju procenat oštećenih i povećavaju procenat normalnih aksona u 21. d.p.i. ($p < 0,05$) (Slika 13b). Dakle, pojava demijelinizacije, kao i posledično oštećenje aksona koje se javlja kod imunizovanih životinja je značajno smanjeno kod životinja tretiranih sa GKT.



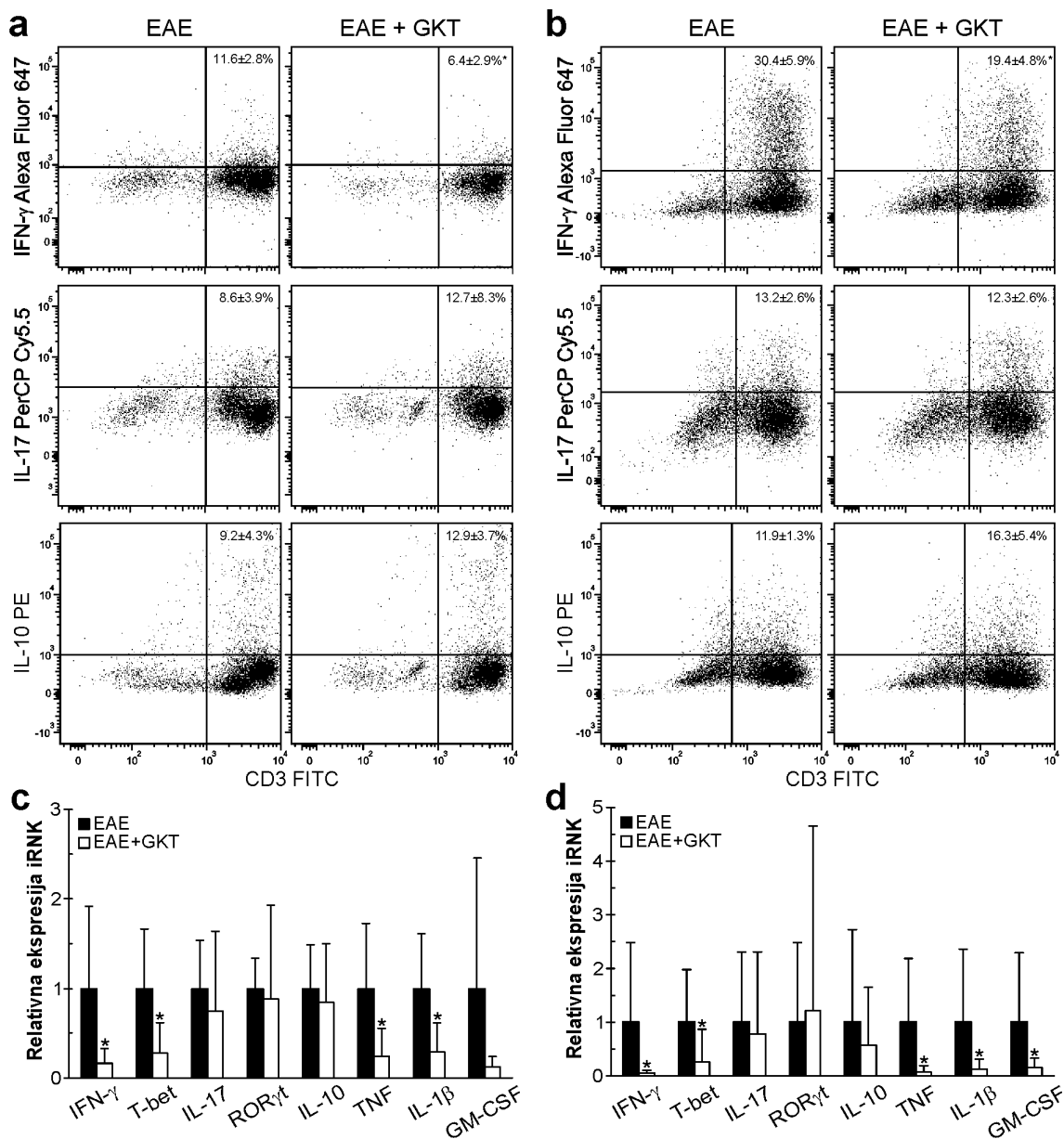
Slika 13. GKT smanjuju demijelinizaciju i oštećenje aksona u EAE. Demijelinizacija je ispitana TEM metodom u lumbosakralnim presecima KM zdravih i imunizovanih životinja tretiranih sa PBS (EAE) i GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT) u 14. d.p.i. (**a**, **b**) i 21 d.p.i. (**b**). Prikazane su reprezentativne elektromikrografije (gornji red - manje uveličanje, donji red - veće uveličanje). Bele strelice pokazuju demijelinizaciju, crne strelice oštećenje mijelina, a beli trouglići na GKT (**a**). Dobijeni rezultati su kvantifikovani morfometrijskom analizom (**b**) i predstavljeni su kao $SV \pm SD$ ($n=5$ po grupi; $*p<0,5$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na zdravu grupu, a $\#p<0,05$ u odnosi na EAE grupu).

4.4. MOLEKULARNI MEHANIZMI DEJSTVA GKT NA ČELIJE IMUNSKOG SISTEMA TOKOM INDUKTIVNE I EFEKTORSKE FAZE EAE

4.4.1. GKT smanjuju proinflamatorni i Th1 odgovor u EAE

Tokom induktivne i efektorske faze bolesti dolazi do aktivacije autoreaktivnih T ćelija na periferiji, a zatim do njihove reaktivacije antigen prezentujućim ćelijama u CNS. Primenom protočne citofluorimetrije i qRT-PCR ispitana je ekspresija Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-17), proinflamatornih (TNF, IL-1, GM-CSF) i anti-inflamatornih citokina (IL-10), kao i Th1 (T-bet) i Th17 (ROR- γ t) transkripcionih faktora u limfocitima CNS infiltrata i drenirajućih limfnih čvorova.

Dvostrukim bojenjem izolovanih limfocita metodom protočne citofluorimetrije pokazano je da tretman sa GKT značajno smanjuje zastupljenost CD3⁺IFN- γ ⁺ T ćelija u obe populacije izolovanih limfocita, u odnosu na kontrolnu EAE grupu. Promena u procentualnoj zastupljenosti CD3⁺IL-10⁺ i CD3⁺IL-17⁺ između GKT tretiranih i kontrolnih EAE životinja nije zabeležena. (Slika 14a i 14b). Tretman sa GKT je takođe značajno smanjio ekspresiju iRNK za IFN- γ i njegov transkripcioni faktor T-bet u limfocitima drenirajućih limfnih čvorova i CNS infiltrata. Antiinflamatorno dejstvo GKT potvrđeno je smanjenjem ekspresije iRNK za TNF, IL-1 β i GM-CSF u mononuklearnom infiltratu KM, dok je u limfocitima izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora bila smanjena ekspresija iRNK za TNF i IL-1 β (Slika 14c i 14d). S druge strane, tretman sa GKT nije uticao na ekspresiju iRNK za IL-17 i njegov transkripcioni faktor ROR- γ t, kao ni na ekspresiju antiinflamatorng citokina IL-10. Dakle, na molekularnom nivou GKT svoje protektivno dejstvo u EAE ostvaruju smanjenjem Th1 ćelijskog odgovora tokom induktivne i efektorske faze bolesti.

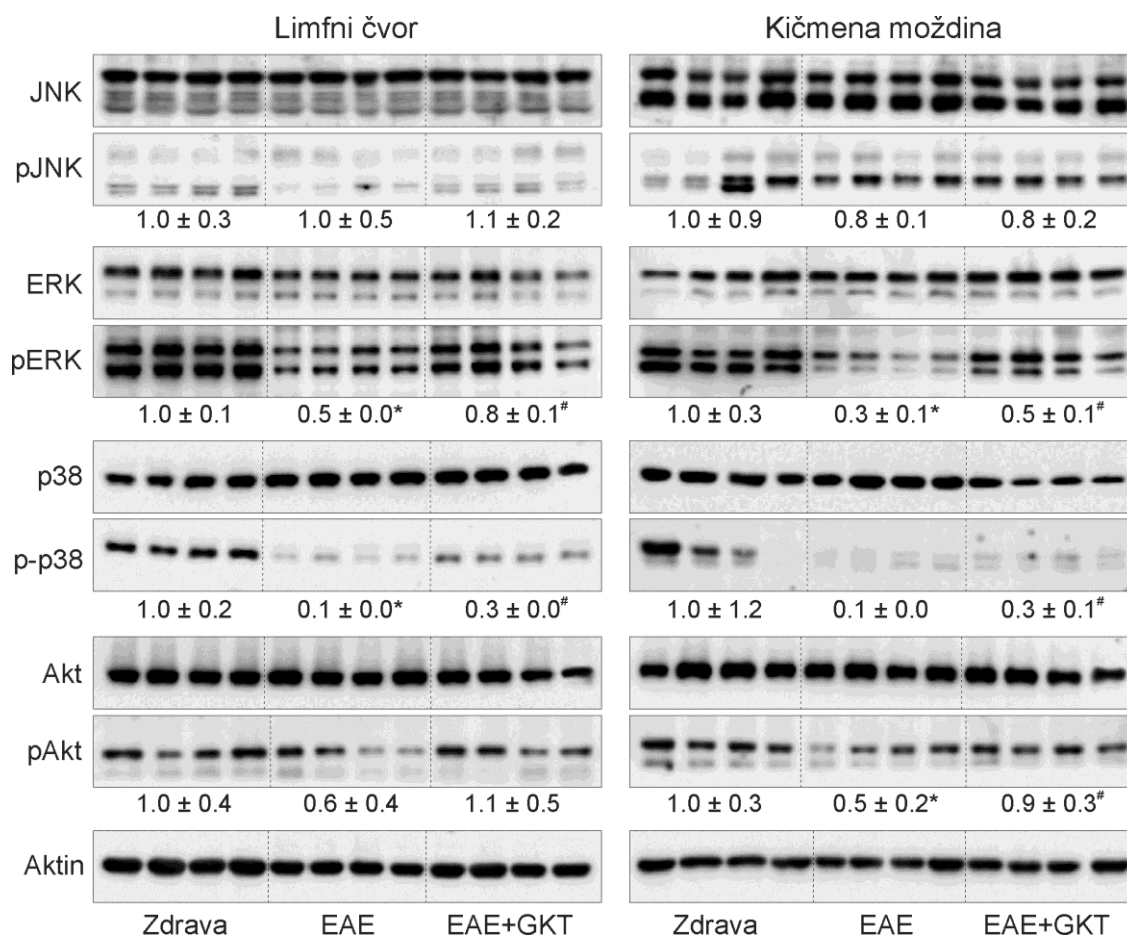


Slika 14. GKT smanjuju proinflamatorni i Th1 odgovor u EAE. Limfociti izolovani iz drenirajućeg limfnog čvora (7. d.p.i.) (**a, c**) i KM (14. d.p.i.) (**b, d**) su prikupljeni od imunizovanih životinja tretiranih sa PBS (EAE) i GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT). Procentualna zastupljenost limfocitnih subpopulacija je analizirana protočnom citofluorimetrijom (**a, b**), a rezultati su predstavljeni u gornjem desnom kvadrantu tačkastih dijagrama. Ekspresija iRNA za različite citokine je analizirana qRT-PCR metodom (**c, d**) a rezultati su prikazani kao relativna promena u odnosu na EAE grupu (n=5 po grupi; *p<0,05).

4.4.2. GKT povećavaju aktivnost MAPK i Akt signalnih puteva u EAE

Familija mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) i kinaza Akt učestvuju u regulaciji ćelijske smrti, urođene i stečene imunosti i neuroinflamacije (85, 86). Zbog toga smo želeli da ispitamo da li tretman sa GKT utiče na aktivaciju Akt i proteina MAPK familije (ERK, p38 MAPK i JNK) u limfocitima u induktivnoj fazi EAE, kao i u tkivu CNS u efektorskoj fazi bolesti.

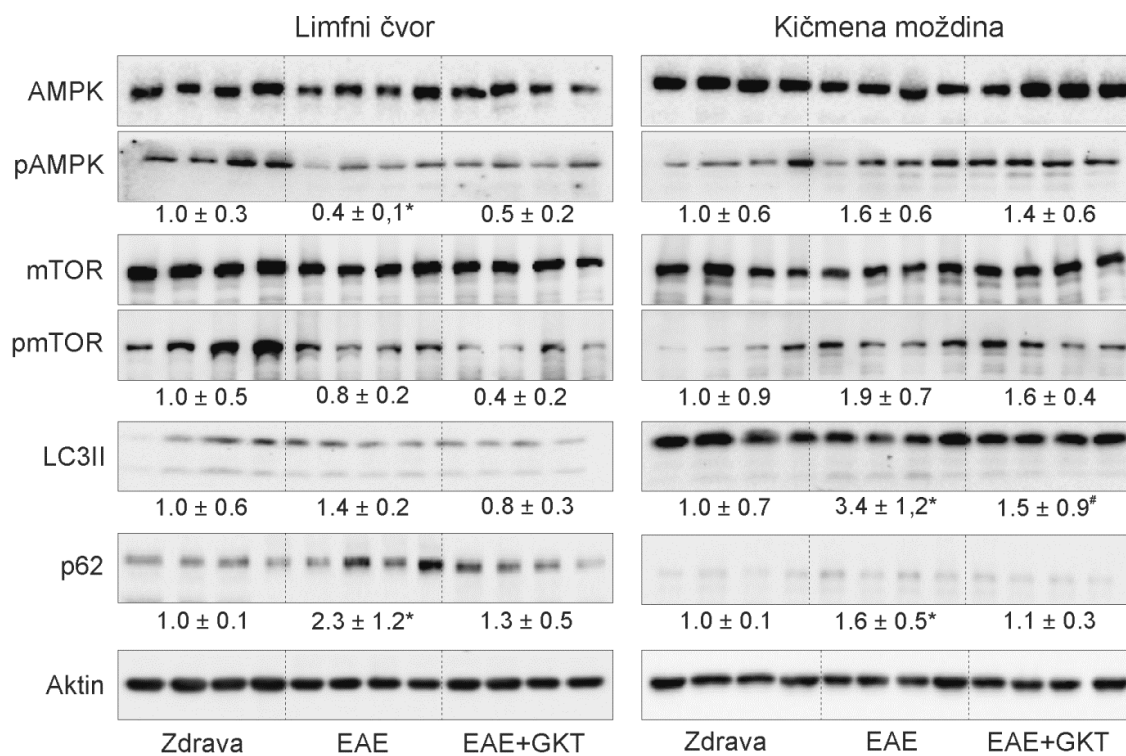
Tokom induktivne faze bolesti, u tkivu drenirajućih limfnih čvorova nisu zapažene promene u aktivaciji JNK i Akt između ispitivanih grupa. Međutim, aktivacija ERK i p38 bila je značajno snižena kod kontrolnih EAE životinja u odnosu na grupu zdravih životinja. Tretman sa GKT doveo je do statistički značajnog povećanja fosforilacije ERK i p38 MAPK u odnosu na kontrolnu EAE grupu. Slično rezultatima dobijenim u induktivnoj fazi bolesti, aktivnost JNK se nije menjala u tkivu KM u efektorskoj fazi bolesti, dok je aktivacija ERK i Akt bila značajno snižena kod kontrolnih EAE životinja u odnosu na zdrave životinje. Iako aktivacije p38 MAPK nije bila značajno promenjena, primećen je jasan trend njenog smanjenja. Takođe, kao i tokom induktivne faze bolesti zabeležen je značajan porast aktivnosti ERK, p38 MAPK i Akt u KM životinja tretiranih sa GKT u odnosu na kontrolnu EAE grupu (Slika 15). Dakle, protektivno dejstvo GKT u EAE korelira sa povećanjem aktivnosti ERK/p38 MAPK i Akt u ćelijama imunskog sistema i CNS.



Slika 15. GKT povećavaju aktivnost MAPK i Akt signalnih puteva u EAE. Drenirajući limfni čvorovi (7. d.p.i.) (n=4) i lumbosakralni delovi KM (14. d.p.i.) (n=4) su prikupljeni od kontrolne EAE grupe i grupe koja je tretirana sa GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT). Od zdravih životinja su uzeti cervikalni limfni čvorovi (n=4) i lumbosakralni delovi KM (n=4). Imunoblot metodom je analizirana fosforilacija JNK, p38 MAPK, ERK i Akt. Rezultati denzitometrije su prikazani ispod blotova kao SV ± SD, (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na zdrave životinje; #p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na EAE grupu).

4.4.3. GKT modulišu autofagiju u EAE

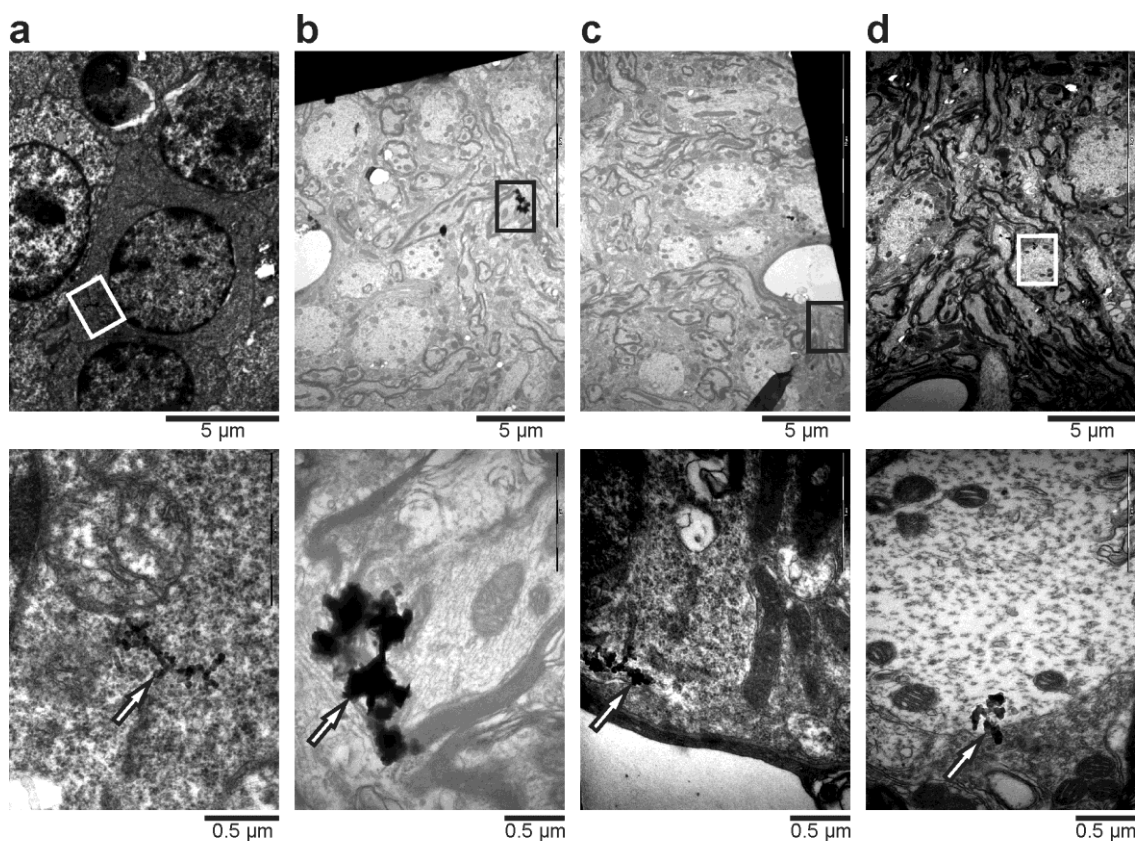
Aktivnost antigen prezentujućih ćelija i T limfocita je regulisana i autofagijom koja potencira prezentovanje antigena od strane antigen prezentujućih ćelija i posledičnu aktivaciju T limfocita (113). Takođe je pokazano da autofagija reguliše produkciju proinflamatornih citokina (145). U cilju ispitivanja uticaja GKT na autofagiju u EAE analizirana je ekspresija proteina ključnih za formiranje u funkciju autofagozoma (LC3-II i p62), odnosno signalnih proteina koji regulišu indukciju autofagije (AMPK i mTOR) (Slika 16). U tkivu drenirajućeg limfnog čvora u induktivnoj fazi bolesti, kao i u homogenatu KM u efektorskoj fazi bolesti uočena je pojačana konverzija LC3-I u marker autofagozoma LC3-II ($p < 0,05$ u KM), koja je bila praćena značajnim povećanjem koncentracije p62, koji vezuje i transportuje proteine namenjene za razgradnju u autofagozome. Povišena koncentracija p62 u EAE ukazuje ili na blokadu autofagije i posledično smanjenje razgradnju p62 u autofagozomima, ili na indukciju autofagije praćenu povećanom ekspresijom p62 na nivou transkripcije. Sa druge strane, u tretmanu sa GKT je uočeno smanjenje nivoa LC3-II ($p < 0,05$ u KM) i trend smanjenja nivoa p62 u ispitivanim tkivima u odnosu na kontrolnu EAE grupu. Ovi rezultati su konzistentni sa indukcijom autofagije i pojačanom razgradnjom p62, ali i sa inhibicijom autofagije usled inhibicije LC3-I-LC3-II konverzije i transkripcione blokade p62. Analizom ekspresije regulatora autofagije AMPK i mTOR, u EAE grupi uočeno je smanjenje aktivacije (fosforilacije) AMPK i mTOR u limfnom čvoru, dok je u homogenatu KM uočen trend povećanja aktivnosti AMPK i mTOR u odnosu na zdrave životinje. U tretmanu sa GKT nije bilo značajne promene aktivnosti AMPK i mTOR u odnosu na EAE grupu. Tokom indukcije autofagije, povećana aktivnost AMPK, kao glavnog energetskeg senzora koji aktivira kataboličke procese, uglavnom je praćena smanjenjem aktivnosti mTOR kao glavnog inhibitora autofagije. Kako aktivnost AMPK i mTOR u EAE i EAE+GKT grupi nije bila regulisana na ovaj način, najverovatnije je da primećene promene u autofagiji nisu zavisile od AMPK-mTOR signalnog puta.



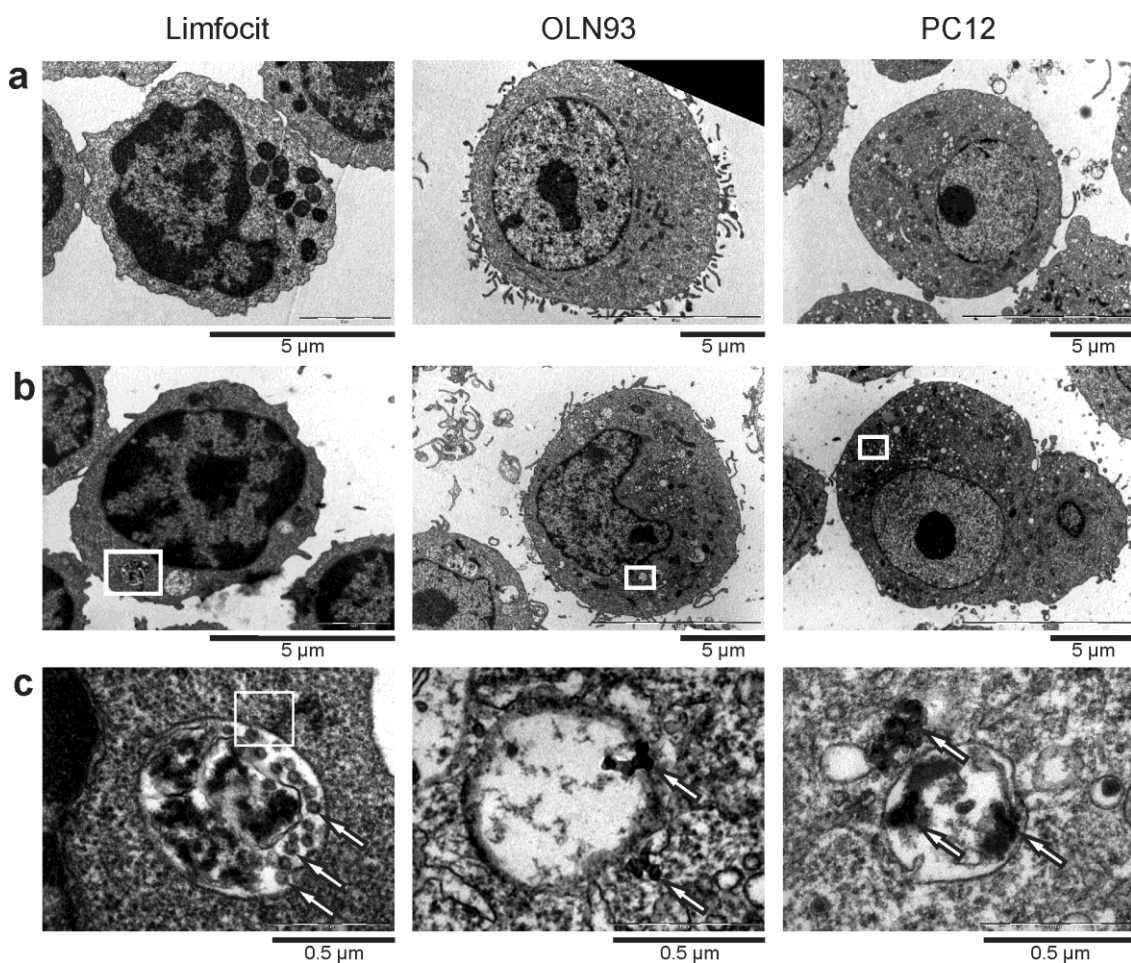
Slika 16. Efekat GKT na autofagiju u EAE. Drenirajući limfni čvorovi (7. d.p.i.) (n=4) i lumbosakralni delovi KM (14. d.p.i.) (n=4) su prikupljeni od kontrolne EAE grupe i grupe koja je tretirana sa GKT (10 mg/kg) (EAE+GKT). Od zdravih životinja su uzeti cervikalni limfni čvorovi (n=4) i lumbosakralni delovi KM (n=4). Imunoblot metodom je analizirana fosforilacija AMPK i mTOR, kao i ekspresija LC3-II i p62. Rezultati denzitometrije ispod blotova predstavljani su kao $SV \pm SD$, (*p<0,05 označava statističku značajnost razlike između zdrave grupe i EAE grupe; #p < 0,05 statistički značajnu razliku u odnosu na EAE grupu).

4.5. AKUMULACIJA GKT U TKIVIMA I ČELIJAMA IMUNSKOG I NERVENOG SISTEMA

Kako bismo bolje razumeli mehanizam delovanja GKT, primenom TEM smo ispitali njihovu sposobnost akumulacije u tkivu i ćelijama imunskog i centralnog nervnog sistema. Nakon sedmodnevnog tretmana (7. d.p.i.), zapažena je akumulacija GKT u limfocitima drenirajućeg limfnog čvora (Slika 17a), dok su nakon četrnaestodnevnog tretmana (14. d.p.i.) GKT bile prisutne i u mijelinu, glijalnim ćelijama i aksoplazmi neurona (14. d.p.i.) (Slika 17b-d). Ćelijska internalizacije GKT je pokazana i u *in vitro* uslovima. U limfocitima izolovanim iz cervikalnih limfnih čvorova zdravih životinja, OLN93 i PC12 ćelijama jasno se uočavaju aglomerati GKT (Slika 18).



Slika 17. Akumulacija GKT u tkivima imunskog i nervnog sistema *in vivo*. Drenirajući limfni čvorovi (n=3) (a) i KM (n=3) (b-d) su uzorkovani 7. i 14. d.p.i. od imunizovanih pacova tretiranih sa GKT (10 mg/kg). Akumulacija GKT je prisutna u limfocitima (a), mijelinskom omotaču (b), citoplazmi glijalne ćelije (c) i aksoplazmi neurona (d). Reprezentativne elektromikrografije (gornji panel-manje uveličanje; donji panel-veće uveličanje) ukazuju na unutarćelijsko prisustvo aglomeriranih GKT (strelice).



Slika 18. Čelijska internalizacija GKT *in vitro*. Limfociti izolovani iz cervikalnih limfnih čvorova neimunizovanih životinja, OLN93 i PC12 ćelije su inkubirane 24 h sa GKT (100 µg/ml). Reprezentativne elektromikrografije prikazuju kontrolne ćelije (**a**) i prisustvo GKT nakon tretmana (**b**-manje uveličanje; **c**-veće uveličanje). GKT aglomerati (strelice) u autofagolizozomima limfocita, klatrinskim vezikulama i citoplazmi OLN93 i PC12 ćelija.

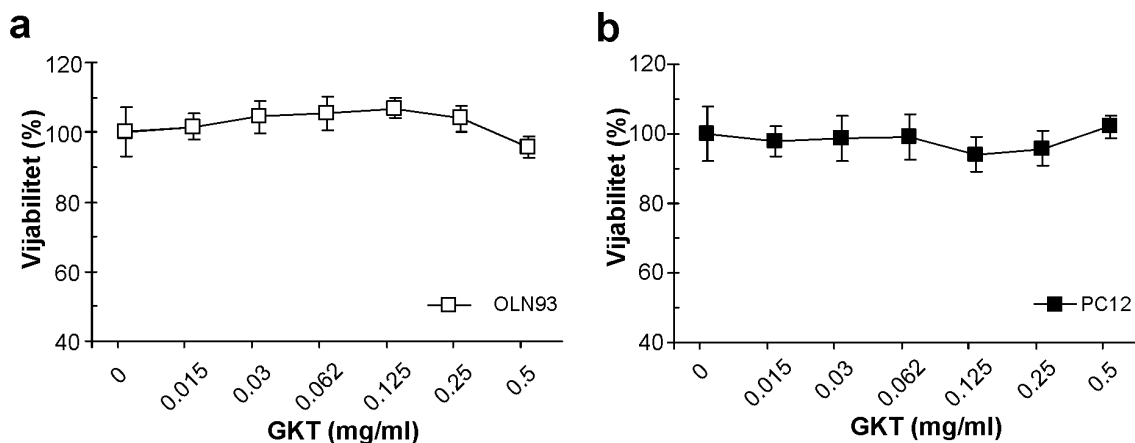
4.6. CITOPROTEKTIVNO DEJSTVO GKT *IN VITRO*

U cilju analize mehanizama neuroprotektivnog dejstva GKT, u narednim eksperimentima ispitana je njihova sposobnost da zaštite neurone i oligodendrocite od oštećenja izazvanog imunskim ćelijama u *in vitro* uslovima. U tom cilju korišćene su ćelijske linije oligodendrocita i neurona (OLN93 i PC12), kao i primarne ćelijske oligodendrocita i neurona pacova DA soja. Ispitivan je uticaj GKT na njihov vijabilitet u prisustvu aktiviranih ćelija imunskog sistema, kao i njihovih solubilnih faktora.

Takođe, ispitan je i uticaj GKT na produkciju medijatora inflamacije od strane aktiviranih limfocita.

4.6.1. GKT nisu citotoksične za OLN93 i PC12 ćelije

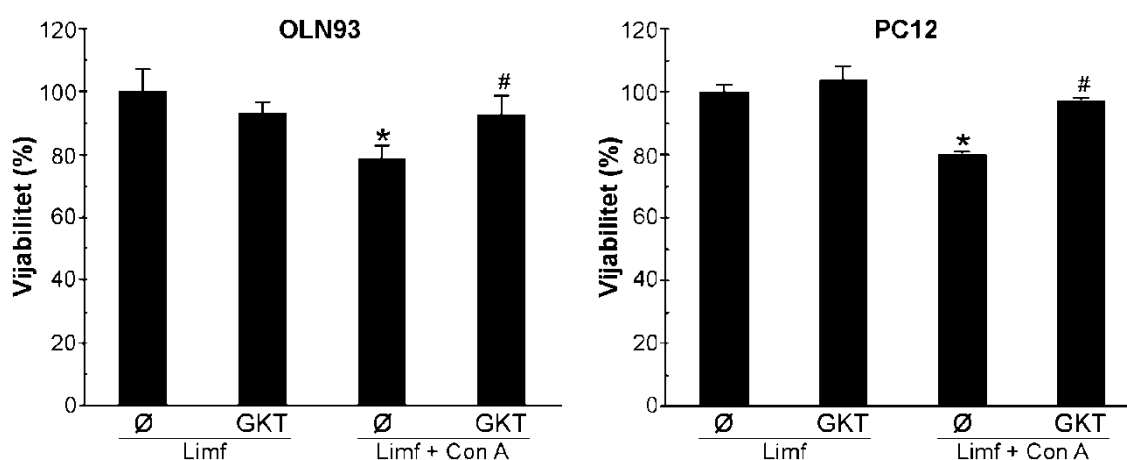
Više istraživačkih grupa je pokazalo da GKT nisu citotoksične za različite tipove ćelija (32, 33), Međutim, u skladu sa ciljevima našeg istraživanja, želeli smo da ispitamo da li, i u kojoj meri, GKT primenjene u širokom opsegu koncentracija (0,015-0,5 mg/ml) utiču na vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija. Merenjem aktivnosti mitohondrijlnih dehidrogenaza je pokazano da tretman sa GKT nije uticao na vijabilitet ispitanih ćelija (Slika 19a i b). Dobijeni rezultati potvrđuju da GKT nemaju citotoksičan efekat na OLN93 i PC12 ćelijskim linijama.



Slika 19. GKT ne utiču na vijabilitet OLN93 (a) i PC12 (b) ćelija. Ćelije su inkubirane sa GKT (0,015-0,5 mg/ml) tokom 24 h. Vijabilitet ćelija meren je MTT testom, a reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta prikazani su kao SV \pm SD triplikata.

4.6.2. GKT štite oligodendrocite i neurone od oštećenja izazvanog T limfocitima

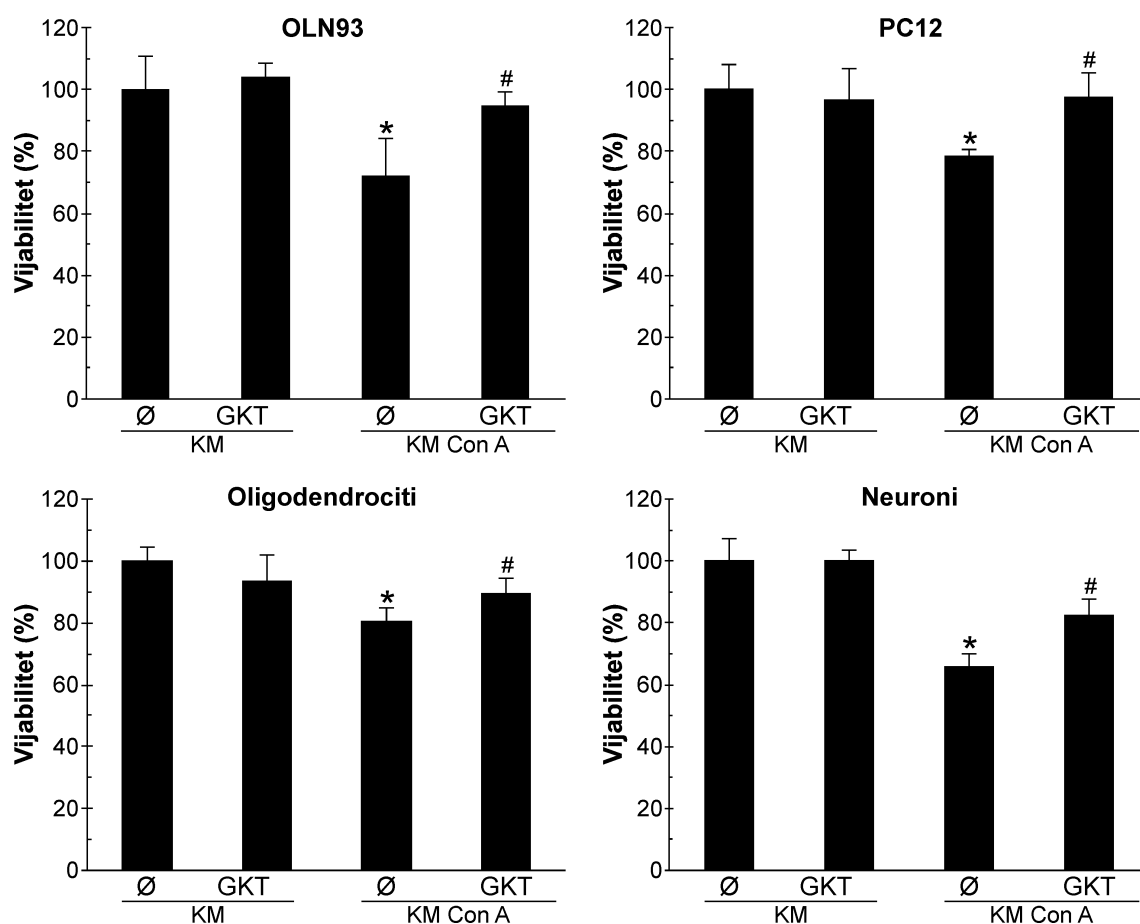
Kako bismo ispitali da li akumulirane GKT mogu da zaštite ćelije od oštećenja izazvanog medijatorima inflamacije, OLN93 i PC12 ćelije su kokultivisane sa T limfocitima koji su stimulisani mitogenom konkavalinom A (ConA). U odsustvu GKT, ConA stimulisani limfociti su statistički značajno smanjili vijabilitet OLN93 i PC12 ćelija. Međutim, prethodna inkubacija sa GKT je značajno smanjila citotoksično dejstvo aktiviranih limfocita na OLN93 i PC12 ćelijama (Slika 20).



Slika 20. GKT štite OLN93 i PC12 ćelije od citotoksičnosti ConA stimulisanih limfocita. OLN93 i PC12 ćelije su inkubirane bez (\emptyset) ili sa GKT (100 mg/ml) 2 h pre dodavanja nestimuliranih ili limfocita stimuliranih sa ConA (5 μ g/ml) (Limf+ConA). Nakon 48 h je ispitan vijabilitet ćelija MTT testom i reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta prikazani su kao SV \pm SD triplikata (* p <0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # p <0.05 u odnosu na ConA stimulaciju).

Da bismo ispitali da li GKT svoje protektivno dejstvo ostvaruju direktno, na nivou ćelija CNS ili indirektno, modulacijom funkcije limfocita, korišćeni su medijumi sakupljeni od nestimuliranih i ConA stimuliranih limfocita DA pacova. Za razliku od medijuma dobijenog od nestimuliranih limfocita, medijum sakupljen od ConA stimuliranih limfocita je statistički značajno smanjio vijabilnost ispitivanih ćelija. Prethodna inkubacija sa GKT je statistički značajno povećala preživljavanje OLN93 i

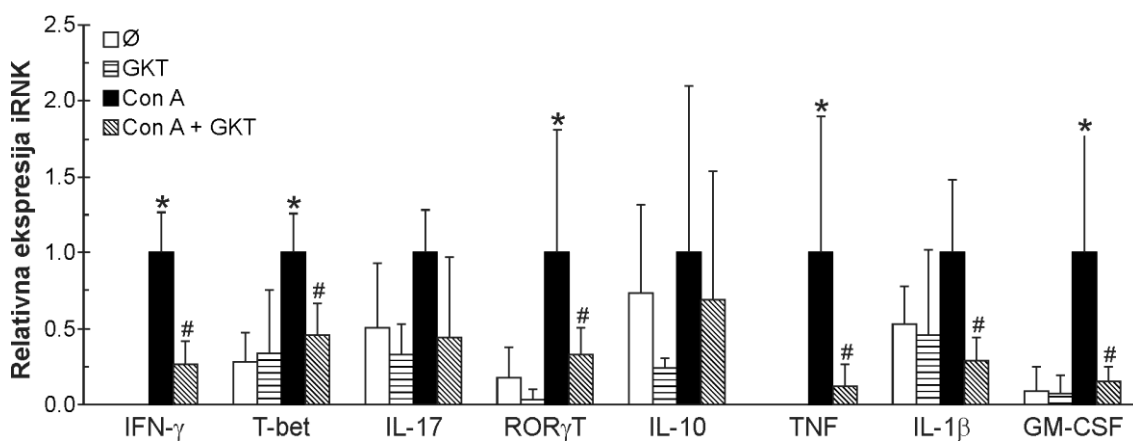
PC12 ćelija, kao i na primarnim ćelijskim kulturama oligodendrocita/neurona (Slika 21).



Slika 21. GKT štite oligodendrocite i neurone od citotoksičnosti ConA stimuliranih limfocita. OLN 93 ćelije, PC12 ćelije, primarni oligodendrociti i neuroni su inkubirani bez (Ø) ili sa GKT (100 mg/ml) 2 h pre dodavanja kondicioniranog medijuma iz kultura limfocita stimuliranih (KM ConA) ili ne (KM) sa ConA (5µg/ml). Nakon 48 h je ispitan vijabilitet ćelija i reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta prikazani su kao $SV \pm SD$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na KM ConA).

Na kraju je pokazano da sam tretman izolovanih limfocita sa GKT nije doveo do značajnih promena u ekspresiji iRNK za medijatore inflamacije u nestimuliranim limfocitima. Međutim, ekspresija iRNK za medijatore Th1 ćelijskog odgovora (IFN- γ i T-bet) i Th17 transkripcioni faktor ROR- γ t, kao i proinflamatorne citokine TNF, GM-CSF i IL-1 β bila je povišena kod ConA stimuliranih limfocita, dok je tretman sa GKT

značajno smanjio njihovu ekspresiju (Slika 22). GKT su takođe smanjile i ekspresiju iRNK za IL-17 u ConA-stimulisanim limfocitima, ali razlika nije dostigla statističku značajnost ($p = 0.061$). Ovi *in vitro* rezultati ukazuju na to da GKT ostvaruju direktno protektivno dejstvo na ćelijama nervnog sistema, dok istovremeno smanjuju produkciju proinflamatornih citokina od strane aktiviranih ćelija imunskog sistema.



Slika 22. GKT smanjuju ekspresiju proinflamatornih medijatora u leukocitima stimulisanim sa ConA. Leukociti izolovani iz cervikalnih limfnih čvorova DA pacova ($n=4$) su inkubirani bez (\emptyset) ili sa GKT (50 mg/ml) 2 h pre dodavanja ConA (ConA+GKT). Tretman sa ConA je trajao 8 h. Ekspresija iRNK je merena qRT-PCR metodom, a rezultati su prikazani kao relativna promena u odnosu na ConA stimulisane leukocite (* $p<0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na nestimulisane leukocite, a # $p<0,05$ u odnosu na ConA stimulisane leukocite).

5. DISKUSIJA

Ugljenične nanočestice predstavljaju dobre kandidate za primenu u biološkim sistemima zahvaljujući niskoj toksičnosti, velikoj biokompatibilnosti, dobroj rastvorljivosti, brzom i jeftinom sintezi (30). Biološki efekti ugljeničnih i drugih nanočestica zavise od njihovih fizičko-hemijskih osobina, na koje u velikoj meri utiče način sinteze. Imunomodulatorna svojstva ugljeničnih nanočestica poput fulerena, GO, karbonskih nanotuba i GKT su ispitivana u različitim studijama (51-56) U našoj studiji, od svih ispitivanih ugljeničnih nanočestica jedino su GKT značajno smanjile kliničke simptome EAE. Iako je pokazano da derivat fulerena bogat karboksilnim funkcionalnim grupama (ABS-75) ima protektivno dejstvo u EAE modelu (51), fulerenol u našoj studiji nije uticao na klinički tok bolesti. Razlike u biološkim svojstvima ovih derivata fulerena mogu poticati od razlika u zastupljenosti i vrsti funkcionalnih grupa, kao i razlika u korišćenom eksperimentalnom modelu. Sa druge strane, veličina nanočestica bitno utiče na njihova biološka svojstva, pa tako odsustvo efekta velikih čestica GO na klinički tok bolesti može da bude posledica njihovog otežanog ulaska u ćeliju (15, 25). U skladu s tim, nanočestice manjih dimenzija i pozitivnog naelektrisanja znatno brže i u većem broju ulaze u ćelije (146, 147), što je jasno pokazano na primeru GKT manjih dimenzija (24 nm) koje lakše ulaze u ćeliju u odnosu na veće GKT (66 nm) (56). Oblik nanočestica takođe utiče na njihove biološke efekte, što bi moglo da bude razlog zašto više sferične KKT, za razliku od diskoidnih GKT, nisu imale efekt na EAE. Značaj funkcionalnih grupa i naelektrisanja na biološka svojstva nanočestica je pokazan i na primeru fotohemijske redukcije GKT kojom je smanjen broj karboksilnih grupa i povećan broj sp^2 domena. Ovako dobijene GKT sa smanjenim negativnim površinskim naelektrisanjem i većim stepenom uređenosti kristalne rešetke lakše ulaze u ćelije i nemaju citotoksičan efekat (148). U skladu sa tim, bolji terapijski efekat GKT dobijenih elektrohemijskom oksidacijom grafita u ovoj studiji se može objasniti višom vrednošću zeta potencijala zbog manjeg broja karboksilnih grupa podložnih deprotonizaciji, kao i većom zastupljenošću sp^2 veza u odnosu na GKT dobijene termalnom dekompozicijom limunske kiseline.

GKT su imale slabije protektivno dejstvo ako su aplicirane selektivno tokom efektorske faze EAE, što ukazuje na to da GKT sprečavaju aktivaciju autoreaktivnih limfocita na periferiji tokom induktivne faze bolesti, kao i njihovu reaktivaciju u CNS tokom efektorske faze bolesti. Iako se selekcija potencijalnih lekova za terapiju MS uglavnom zasniva na njihovoj sposobnosti da inhibiraju EAE ako su aplikovane posle pojave prvih simptoma bolesti, naši rezultati ne umanjuju opravdanost potencijalne terapijske primene GKT u MS. Naime, u tom kontekstu ne treba zanemariti efekat GKT na aktivaciju limfocita tokom induktivne faze bolesti, jer se pojava relapsa kod MS pacijenata vezuje upravo za aktivaciju naizgled „uspavanih” (neaktivnih) T limfocita u perifernoj krvi (149). To je u skladu sa sposobnošću GKT da značajno smanje učestalost relapsa u EAE modelu u našoj studiji. Pojava relapsa i remisije kod pacijenata koji boluju od MS korelira za smanjenom, odnosno povećanom učestalošću Treg ćelija (83). Pokazano je da GKT u *in vitro* uslovima indukuju nastanak tolerogenih dendritskih ćelija koje stimulišu diferencijaciju Treg subpopulacije (56), što može biti jedan od mehanizama njihovog dejstva na smanjenje relapsa u našoj studiji. Takođe, pojava relapsa kod pacijenata sa MS je značajno redukovana smanjenjem migracije limfocita iz perifernih limfnih organa primenom fingolimoda ili redukovanjem permeabilnosti krvno-moždane barijere primenom natalizumaba (150). Pošto su GKT u našoj studiji značajno smanjile limfocitnu infiltraciju CNS, to bi takođe moglo da doprinese smanjenju učestalosti relapsa u EAE modelu.

U lezijama CNS kod pacijenata obolelih od MS *post mortem* je pokazana povišena ekspresija iRNK za markere Th1 i Th17 ćelija, za koje se pretpostavlja da imaju ključnu ulogu u demijelinizaciji (151). U skladu s tim, EAE može da se indukuje pasivnim transferom jedne od navedenih ćelijskih subpopulacija (Th1 ili Th17) (152). Iako se proteklih godina intenzivno proučava uloga Th17 odgovora u MS i EAE, ne treba zanemariti ključnu ulogu Th1 ćelija u imunopatogenezi ovih bolesti (153). Značaj IFN- γ u indukciji EAE su potvrdili Dungan i saradnici koji su korišćenjem IFN- γ *knockout* miševa odložili pojavu prvih kliničkih znakova bolesti (87). Slično tome, u našim eksperimentima, sposobnost GKT da suprimiraju ekspresiju IFN- γ i Th1 transkripcionog faktora T-bet korelirala je sa odloženim početkom bolesti i blažom kliničkom slikom. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatima gde je pokazano da GKT smanjuju sposobnost humanih dendritskih ćelija da usmere *in vitro* T ćelijski odgovor u

Th1 pravcu (56). Inhibicija Th1 ćelijskog odgovora posredstvom GKT je takođe pokazana na modelu autoimunskog hepatitisa, gde su GKT smanjile broj $CD4^{+}IFN-\gamma^{+}$ i $CD8^{+}IFN-\gamma^{+}$ T ćelija u tkivu jetre, kao i koncentraciju IFN- γ u serumu miševa tretiranih sa ConA (55). Iako su Lees i saradnici pokazali da je incidenca EAE niža kod IL-17 *knockout* miševa (154), u našoj studiji odložen početak bolesti i blaža klinička slika u tretmanu GKT nisu bile asocirane sa inhibicijom Th17 odgovora. Izostanak efekta GKT na Th17 ćelijski odgovor se može bar delimično objasniti inhibitornim efektom IFN- γ na polarizaciju Th17 ćelija. Naime, Berghmans i saradnici su pomoću neutrališućeg anti IFN- γ antitela povećali broj ćelija koje produkuju IL-17 u EAE, a sličan fenomen bio je prisutan i kod IFN- γ *knockout* miševa (155). Takođe, isti efekat su pokazali Momčilović i saradnici na kulturi ConA stimuliranih limfocita (156). Pored direktnog inhibitornog efekta, IFN- γ svoj efekat ostvaruje i indirektno, preko dendritskih ćelija stimulacijom produkcije IL-27 koji inhibira Th17 odgovor (157). S druge strane, postoje podaci da Th1 i Th17 odgovor sinergizuju u nastanku i progresiji EAE (152), tako da bi inhibicija jednog tipa T ćelijskog odgovora, u ovom slučaju Th1, mogla da bude dovoljna za supresiju EAE.

Th1 ćelije pored IFN- γ proizvode i proinflamatorni citokin TNF (81), a IFN- γ i IL-17 indukuju produkciju proinflamatornih citokina u makrofagima, dendritskim ćelijama i mikroglijji, što stimuliše inflamaciju i oštećenje CNS u EAE (48, 77). Prisustvo TNF u moždanim lezijama MS pacijenata se povezuje sa Th1 odgovorom (158), što je u skladu s našim rezultatima da je inhibicija Th1 odgovora od strane GKT praćena smanjenjem produkcije TNF. Pored TNF, u nastanku organ specifične autoimunosti i EAE učestvuje i GM-CSF koga sekretuju T limfociti u odgovoru na TNF i IL-1 (159). Iako se GM-CSF i IL-1 β uglavnom smatraju citokinima Th17 odgovora (48, 83), postoje studije koje govore u prilog ekspresije GM-CSF u Th1 ćelijama (152), što korelira sa sposobnošću GKT da suprimiraju ekspresiju ovog citokina u našoj studiji. Pored TNF i GM-CSF, GKT su značajno smanjile i ekspresiju IL-1 β , pa se može zaključiti da anti-inflamatorna aktivnost predstavlja značajnu komponentu njihovog protektivnog dejstva u EAE. Poznato je da proinflamatorni citokini kao što je TNF povećavaju permeabilnost krvno-moždane barijere, što omogućava ulazak encefalitogenih T ćelija u CNS (76) i korelira sa pojavom prvih kliničkih znakova EAE (160-162), kao i sa težinom bolesti tokom akutne faze bolesti (163). Dakle, sposobnost

GKT da inhibiraju *in vitro* i *in vivo* gensku ekspresiju i produkciju klasičnih proinflamatornih citokina TNF i IL-1 β u našoj studiji mogla bi da bude osnovni mehanizam kojim GKT smanjuju infiltraciju encefalitogenih ćelija u CNS imunizovanih životinja. U skladu sa njihovim antiinflamatornim dejstvom, GKT su značajno neutralisale gubitak telesne mase na vrhuncu bolesti, koji je delimično posledica anoreksije izazvane inflamacijom (164). Ostaje da se ispita da li GKT pored smanjenja sekrecije proinflamatornih citokina možda mogu i direktnim dejstvom na krvno-moždanu barijeru ili leukocite da smanje ekstravazaciju imunskih ćelija i posledičnu neuroinflamaciju.

Pored inhibicije Th1 i proinflamatornog odgovora *in vivo*, pokazali smo da GKT smanjuju ekspresiju iRNK za markere Th1 odgovora (IFN- γ i T-bet) i inflamacije (TNF, IL-1 β , GM-CSF) i u limfocitima stimulisanim *in vitro* T ćelijskim mitogenom ConA. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnom studijom u kojoj su GKT inhibirale Th1 odgovor ConA-stimuliranih mišijih splenocita (55). Takođe, smanjena ekspresija medijatora Th1 ćelijskog odgovora (IFN- γ , IL-12) i proinflamatornih citokina (IL-1 β , LT- α , IL-6 i IL-8) pokazana je i na humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi stimuliranim fitohemaglutininom (56). Za razliku od rezultata dobijenih u *in vivo* uslovima, GKT primenjene *in vitro* značajno su smanjile ekspresiju iRNK Th17 transkripcionog faktora ROR- γ t, dok je smanjenje ekspresije iRNK za IL-17 bilo na granici statističke značajnosti. Jedno od objašnjenja veće osetljivosti Th17 ćelija na tretman GKT *in vitro* može biti da se u *in vitro* uslovima postiže mnogostruko veća lokalna koncentracija GKT. Takođe se postavlja pitanje da li je antiinflamatorno dejstvo GKT posledica inhibicije T ćelija ili GKT mogu i direktno da deluju na makrofage, dendritske ćelije ili mikrogliju i spreče njihovu proinflamatornu aktivnost. U prilog drugoj pretpostavci govore rezultati da GKT direktno inhibiraju proinflamatornu funkciju humanih dendritskih ćelija (56). Suprotno našim rezultatima, pokazano je da GKT mogu da imaju i proinflamatorno dejstvo povećanjem indukcije p38 MAPK/NF κ B-zavisne produkcije TNF, IL-1 i IL-8 u monocitnoj leukemijskoj ćelijskoj liniji *in vitro* (57). Ova razlika može da bude posledica različitog načina sinteze koji određuju fizičko hemijska svojstva nanočestica, kao i razlika između transformisanih u odnosu na netransformisane ćelije.

Inflamacija CNS u EAE dovodi do apoptoze oligodendrocita i posledične demijelinizacije (144), koja je povezana sa progresijom bolesti nezavisno od vrste i soja životinja koje se koriste za indukciju EAE (59, 67). U skladu s tim, naši rezultati dvostrukog TUNEL/MBP bojenja pokazali su da pretežno oligodendrociti umiru apoptozom u tkivu CNS tokom EAE, kao i da GKT značajno smanjuju demijelinizaciju i broj apoptotičnih ćelija u KM imunizovanih pacova. Gubitak oligodendrocita prisutan je i u akutnim lezijama pacijenata koji su oboleli od MS, u kojima čak 40 % apoptotičnih ćelija predstavljaju oligodendrociti (165). Apoptozu oligodendrocita indukuje uglavnom TNF vezujući se za svoj receptor (TNFR1) (166, 167), dok je citotoksično dejstvo IFN- γ pokazano na oligodendrocitnim progenitorskim ćelijama, ali ne i na diferenciranim oligodendrocitima (168). Dakle, inhibicija produkcije TNF i IFN- γ predstavlja važan mehanizam njihovog anti-apoptotskog dejstva u našoj studiji. Pored direktnog citotoksičnog efekta, medijatori inflamacije aktiviraju mikrogliju koja produkuje kiseonične i azotne reaktivne vrste koje su toksične za oligodendrocite (81, 143, 144). Usled visoke metaboličke aktivnosti oligodendrocita dolazi do nagomilavanja toksičnih produkata metabolizma, koji u kombinaciji sa visokim nivoom intracelularnog gvožđa i niskom koncentracijom glutaciona čine ove ćelije osetljivim na oksidativna oštećenja (169). S druge strane, apoptoza autoreaktivnih T limfocita je takođe opisana na mestu demijelinizacije (170, 171), što doprinosi smanjenju limfocitnih infiltrata i ograničava progresiju bolesti. Ovo je u skladu sa našim rezultatima koji pokazuju TUNEL+ jedra lokalizovana subpialno, koja verovatno pripadaju apoptotičnim limfocitima. Dakle, potrebna je detaljnija analiza uticaja GKT na apoptozu različitih tipova ćelija da bi se jasnije razumeo mehanizam njihovog protektivnog dejstva u EAE.

Demijelinizacija indukovana inflamacijom dovodi do metaboličke disfunkcije i povećane osetljivosti ogoljenih aksona na neurotoksične medijatore (144), pa dolazi do oštećenja i smanjene provodljivosti neurona unutar CNS (59). Oštećenje neurona u EAE potvrđuju naši rezultati TEM analize koji pored demijelinizacije pokazuju i narušenu arhitekturu aksoplazme i oštećenje mitohondrija u neuronima bolesnih životinja. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da nakon aktivne imunizacije DA pacova dolazi do oštećenja aksona koje korelira sa težinom EAE (143, 172), a gubitak neurona zapažen je i u ranoj fazi bolesti (173). Takođe, oštećenje

mitochondrija je detektovano u oligodendrocitima i aksonima u CNS lezijama kod pacijenata obolelih od MS (174). U skladu sa njihovim antiinflamatornim i anti-Th1 efektom, GKT su značajno smanjile procenat oštećenih i nemijelinizovanih aksona u KM imunizovanih pacova. Međutim, s obzirom na to da naši rezultati pokazuju da se GKT akumuliraju i u ćelijama imunskog sistema i u ćelijama CNS, postavlja se pitanje da li je njihovo protektivno dejstvo isključivo posledica antiinflamatorne i anti-Th1 aktivnosti ili i direktnog citoprotektivnog efekta u kome intracelularno prisustvo GKT štiti oligodendrocite i neurone od toksičnih medijatora neuroinflamacije. U korist prve pretpostavke govore podaci da aktivirana mikroglija (78) u sadejstvu sa limfocitima dovodi do oštećenja u CNS (59), kao i da Th1 i Th17 limfociti proizvode proinflamatorne citokine koji dovode do oštećenja i apoptoze oligodendrocita (80). U skladu sa tim, Popović i saradnici su pokazali da sekretovani medijatori aktiviranih limfocita imaju citotoksično dejstvo na ćelije CNS *in vitro* (175), što je potvrđeno i u našoj studiji na OLN93 i primarnim oligodendrocitima, kao i na PC12 i primarnim neuronima. GKT su smanjile produkciju medijatora inflamacije u ConA-aktiviranim limfocitima, kao i njihovu citotoksičnu aktivnost prema oligodendrocitima i neuronima u modelu *in vitro* kokultivacije. Takođe, inkubacija sa GKT značajno je smanjila smrt oligodendrocita i neurona izazvanu kondicioniranim medijumom ConA-stimuliranih limfocita koji nije sadržao ćelije. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da GKT štite oligodendrocite i neurone indirektno, inhibicijom produkcije toksičnih medijatora inflamacije, ali i direktno, intracelularnom akumulacijom i posledičnom interferencijom sa indukcijom ćelijske smrti. Imajući u vidu ulogu oksidativnog stresa u smrti oligodendrocita indukovanoj proinflamatornim citokinima (176), prethodno opisana antioksidativna aktivnost GKT (30) mogla bi da bude jedan od mehanizama njihovog direktnog protektivnog dejstva na ćelije CNS.

Poznato je da signalni putevi MAPK i Akt učestvuju u regulaciji urođene i stečene imunosti (85, 177), kao i u procesima neuroinflamacije i posledičnog oštećenja tkiva CNS (178). Uloga MAPK u diferencijaciji T ćelijskih subpopulacija pokazana je u brojnim studijama. Tako, ERK1 *knockout* miševi imaju povećanu produkciju IFN- γ (179) i osetljiviji su na indukciju EAE (180), što je u skladu sa našim rezultatima gde je aktivnost ERK bila smanjena u limfnim čvorovima EAE pacova, dok je inhibicija Th1 odgovora korelirala sa sposobnošću GKT da aktiviraju ERK. Imunizacija pacova

homogenatom KM u našoj studiji takođe je dovele do inhibicije p38 MAPK u limfnim čvorovima, koja je bila delimično neutralisana GKT tretmanom, dok značajnih promena u fosforilaciji Akt nije bilo. Slično, GKT su u *in vitro* uslovima aktivirale p38 MAPK u T ćelijskoj liniji Jurkat (55) i monocitnoj ćelijskoj liniji THP-1 (57). Međutim, iako je aktivacija p38 MAPK neophodna za diferencijaciju Th17 ćelija (181) i prisutna u Th1 ćelijama (182), Th17 odgovor je bio nepromenjen, a Th1 odgovor snižen u GKT tretmanu u našoj studiji. Dakle, ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu aktivacije ERK u supresiji Th1 odgovora od strane GKT, kao i na to da modulacija p38 MAPK i Akt verovatno ne učestvuje u ovom efektu.

Pored uloge u imunskom odgovoru, MAPK i Akt signalni putevi su uključeni u diferencijaciju i preživljavanje ćelija nervnog sistema. Pored toga što ERK i Akt predstavljaju važan deo protektivnog odgovora ćelije na različite oblike stresa (183), aktivacija ERK1/2 u progenitorskim ćelijama oligodendrocita pospešuje mijelinizaciju kod miševa (127), a brojne studije povezuju aktivnost PI3K/Akt signalnog puta sa povećanom mijelinizacijom (128, 184, 185). Takođe, p38 MAPK učestvuje u kontroli aktivnosti Švanovih ćelija i formiranju mijelina (186), kao i u proliferaciji i sazrevanju prekursorskih oligodendrocita (187, 188). Imajući u vidu i podatke o protektivnoj ulozi p38 MAPK, ERK i Akt u neuronima i oligodendrocitima u EAE (184, 189, 190), možemo zaključiti da bi aktivacija ovih kinaza od strane GKT mogla da doprinese smanjenju demijelinizacije i apoptoze ćelija CNS u našoj studiji. Prethodne studije su pokazale da reaktivne kiseonične vrste inhibiraju PI3K/Akt/mTOR signalni put (191-193), tako da je moguće da antioksidativna aktivnost GKT (21, 30, 31) delimično učestvuje u aktivaciji Akt u tkivu CNS tokom EAE. S druge strane, oksidativni stres aktivira MAPK signalni put (194), pa aktivacija p38 MAPK i ERK najverovatnije nije bila posledica antioksidativnog dejstva GKT.

Pored apoptoze oligodendrocita, kao patomorfološkog supstrata demijelinizacije, analizirano je i prisustvo autofagije u EAE, kao i uticaj GKT na autofagiju. Autofagija, je neophodna za razvoj, homeostazu i preživljavanje makrofaga, neutrofila i limfocita, a učestvuje i u regulaciji inflamacije i aktivaciji autoreaktivnih limfocita (113). Međutim, uloga autofagije u MS za sada nije dovoljno razjašnjena, tako da se ne zna da li autofagija u MS dovodi do ćelijske smrti ili je deo endogenog neuroprotektivnog

odgovora (113). Tako, autofagija indukovana mTOR inhibitorom rapamicinom je smanjila limfocitnu infiltraciju CNS, demijelinizaciju i oštećenje neurona u EAE kod miševa (122). S druge strane, uloga autofagije u promociji inflamacije u skladu je sa povišenom ekspresijom Atg5 u autoreaktivnim T limfocitima EAE miševa, kao i MS pacijenata u fazi relapsa i u *post mortem* uzorcima moždanih lezija (195). Međutim, i pored povišene ekspresije Atg5 u T ćelijama periferne krvi MS pacijenata, Paunović i saradnici nisu detektovali promene u aktivnosti autofagije u odnosu na zdrave ispitanike (196). U prilog kompleksnom odnosu između inflamacije i autofagije govore podaci da Th1 citokini indukuju autofagiju, dok je Th2 citokini inhibiraju (145). Takođe, inhibicija autofagije dovodi do aktivacije inflamazoma i proteolitičke obrade i sekrecije IL-1 β i IL-18 tokom inflamatornog stresa (197). Nath i saradnici su pokazali da je aktivnost induktora autofagije AMPK smanjena u splenocitima, limfnom čvoru i različitim T ćelijskim subpopulacijama (CD4, CD8 i Treg) EAE miševa, pri čemu su AMPK α 1 $^{-/-}$ splenociti nakon stimulacije antigenom produkovali više IFN- γ u odnosu na WT (engl., *wild type*) ćelije (198). U našoj studiji, smanjena aktivnost AMPK u limfnim čvorovima bila je povezana sa povećanjem nivoa selektivnog supstrata autofagije p62, što govori u prilog blokade autofagije tokom induktivne faze bolesti. Povišen nivo p62, kao i LC3-II, koji se takođe razgrađuje u autofagolizozomima, detektovan je i u tkivu CNS u efektorskoj fazi bolesti. Pošto je autofagija neophodna za uklanjanje oštećenih proteina i mitohondrija koje se smatraju glavnim generatorom oksidativnog stresa (123, 129), može se pretpostaviti da je inhibicija autofagije jedan od mehanizama oštećenja CNS u EAE. GKT su smanjile akumulaciju p62 i LC3-II u tkivu CNS, što ukazuje na njihovu sposobnost da indukuju autofagiju i tako stimulišu razgradnju ovih proteina, i to mehanizmima koji su nezavisni od modulacije AMPK-mTOR signalnog puta. Prethodno je pokazano da GKT aktivacijom autofagije promovišu diferencijaciju tolerogenih dendritskih ćelija i tako smanjuju polarizaciju Th1 i Th17 ćelija (56). Dakle, aktivacija autofagije mehanizmima koji ne zavise od modulacije AMPK-mTOR signalnog puta bi mogla značajno da doprinese supresiji Th1 odgovora i smanjenju oštećenja CNS u EAE modelu. S druge strane, treba imati u vidu da povišena ekspresija p62 može da bude i posledica transkripcione aktivacije autofagije (116) što, uz analizu ćelijskih populacija imunskog sistema i CNS u kojima GKT modulišu autofagiju tokom EAE, ostaje da se ispita u budućim istraživanjima.

TEM analiza u našoj studiji je pokazala da su GKT, u skladu sa njihovim imunomodulatornim i neuroprotektivnim dejstvom u EAE, bile efikasno internalizovane od strane ćelija imunskog sistema i CNS. Poznato je da nanočestice prečnika do 100 nm ulaze u ćeliju, dok one manjih dimenzija ulaze u jedro (40 nm) i prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (35 nm) (49, 50). U zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih svojstava, nanočestice ulaze u ćeliju fagocitozom, pinocitozom, kao i nespecifičnom ili receptorom posredovanom endocitozom (49). Da ugljenične nanočestice imaju sposobnost prolaska kroz biološke membrane pokazano je na primeru ugljeničnih nanotuba. Mehanizam ulaska u ćeliju zavisi od funkcionalnih grupa na njihovoj površini, veličine i broja slojeva. Tako, jednoslojne ugljenične nanocevi ulaze u ćeliju pasivnim transferom, a višeslojne nanocevi endocitozom (199). Sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru pokazano je *in vivo* (200), kao i u odgovarajućem *in vitro* modelu (199). Dugotrajna aplikacija ugljeničnih nanočestica dovodi do njihove akumulacije u organizmu (36, 38, 201). Tako su aglomerati GKT prisutni u citoplazmi limfocita, kao i u ćelijama glije i neuronima. Akumulacija GKT u tkivima nameće pitanje njihove toksičnosti i izlučivanja iz organizma, koje može predstavljati prepreku u potencijalnoj terapijskoj primeni. Akumulirane u jetri i slezini miševa, GKT ne ispoljavaju toksične efekte i lako se izlučuju iz organizma (36, 38). Štaviše, dugotrajna aplikacija GKT u dozi od 20 mg/kg nije ispoljila toksičan efekat na miševima (202). Pokazano je da Kupferove ćelije jetre i makrofagi slezine i pluća mogu da fagocituju GKT (203), koje se dalje razgrađuju verovatno uz pomoć mijeloperoksidaze (204). U njihovu razgradnju mogu biti uključeni i lizosomalni enzimi koji su prisutni u mikrogliji i neuronskim produžecima (205, 206), dok manje nanočestice mogu biti eliminisane putem urina. Sposobnost ulaska GKT u ćelije je pokazana i na primeru različitih ćelijskih linija, kao što su A549, MCF-7 i HeLa, gde su GKT korišćene kao probe za bioimidžing (148, 207, 208). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da se GKT u EAE verovatno internalizuju endocitozom. Za razliku od Wu i saradnika koji ukazuju na endocitozu posredovanu kaveolama (147), aglomerati GKT su bili prisutni u klatrinskim vezikulama i citoplazmi, dok su se u limfocitima GKT nalazile u vezikulama koje po svojoj strukturi i sadržaju liče na autofagolizosome. Slično limfocitima, prisustvo GKT je detektovano u vezikulama dendritskih ćelija koje po svojoj strukturi liče na autofagosome i autofagolizosome (56). GKT nisu detektovane u nukleusu, što potvrđuje

prethodne rezultate (147). Dodatno, naši rezultati ukazuju da intracelularna akumulacija GKT ne utiče na vijabilitet ćelija. Slični rezultati su dobijeni i u prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da GKT nisu bile citotoksične za U251 ćelije (32), humane neuronske stem ćelije (33) i progenitorske kardiomiocyte (209). Da GKT ne utiču na vijabilnost i proliferativni kapacitet stem ćelija pokazao je Yang sa svojim saradnicima (201). Sposobnost akumulacije GKT u tkivima, i ćelijama imunskog sistema može biti u korelaciji sa njihovom sposobnošću da modulišu tok EAE.

Rezultati ove doktorske disertacije jasno pokazuju da GKT, za razliku od ostalih isptivanih nanočestica, imaju antiinflamatorno i neuroprotektivno dejstvo u imunski posredovanom oštećenju CNS u EAE modelu. Imajući u vidu biokompatibilnost, odsustvo toksičnosti i dobar farmakokinetički profil GKT, ovi rezultati podržavaju njihovo dalje ispitivanje u terapiji neuroinflamatornih bolesti kao što je MS.

6. ZAKLJUČCI:

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Tretman GKT značajno ublažava kliničke simptome EAE i redukuje pojavu relapsa, što je posledica smanjenja inflamacije, demijelinizacije i oštećenja neurona u CNS.
- Celularni mehanizmi terapijskog dejstva GKT u EAE uključuju inhibiciju Th1 odgovora i direktnu zaštitu oligodendrocita i neurona od citotoksičnosti proinflamatornih medijatora, što na molekularnom nivou korelira sa aktivacijom MAPK i Akt signalnih puteva, kao i modulacijom autofagije.

7. REFERENCE:

1. Zhang B-T, Zheng X, Li H-F, Lin J-M. Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: A review. *Anal Chim Acta*. 2013;784:1-17.
2. Garg R, Dutta NK, Choudhury NR. Work Function Engineering of Graphene. *Nanomaterials*. 2014;4:267-300.
3. Injac R, Prijatelj M, Strukelj B. Fullerenol nanoparticles: toxicity and antioxidant activity. *Methods Mol Biol*. 2013;1028:75-100.
4. Djordjevic A, Srdjenovic B, Seke M, Petrovic D, Injac R, Mrdjanovic J. Review of Synthesis and Antioxidant Potential of Fullerenol Nanoparticles. *J Nanomater*. 2015;2015:15.
5. Ahmed W, Elhissi A, Dhanak V, Subramani K. Chapter 18 - Carbon nanotubes: Applications in cancer therapy and drug delivery research. In: Subramani K, Ahmed W, editors. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry (Second Edition)*: William Andrew Publishing; 2018. p. 371-89.
6. Teradal NL, Jelinek R. Carbon Nanomaterials in Biological Studies and Biomedicine. *Adv Healthc Mater*. 2017;6:1700574.
7. Cha C, Shin SR, Annabi N, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering. *ACS Nano*. 2013;7:2891-7.
8. Ambrosi A, Chua CK, Bonanni A, Pumera M. Electrochemistry of graphene and related materials. *Chem Rev*. 2014;114:7150-88.
9. Mouras S, Hamm A, Djurado D, Cousseins JC. Synthesis of first stage graphite intercalation compounds with fluorides. *Re Chem Miner*. 1987;24:572.
10. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, i sar. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 2004;306:666-9.
11. Chen F, Gao W, Qiu X, Zhang H, Liu L, Liao P, i sar. Graphene quantum dots in biomedical applications: Recent advances and future challenges. *Front Lab Med*. 2017;1:192-9.
12. Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. *Nat Mater*. 2007;6:183-91.

13. Sydlik SA, Jhunjhunwala S, Webber MJ, Anderson DG, Langer R. In vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano*. 2015;9:3866-74.
14. Silvestrov PG, Efetov KB. Quantum dots in graphene. *Phys Rev Lett*. 2007;98:016802.
15. Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, i sar. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett*. 2011;200:201-10.
16. Zhang X, Yin J, Peng C, Hu W, Zhu Z, Li W, i sar. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*. 2011;49:986-95.
17. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*. 2004;22:47-52.
18. Shen J, Zhu Y, Yang X, Li C. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chem Commun*. 2012;48:3686-99.
19. Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ, Chen P. Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small*. 2015;11:1620-36.
20. Sk MA, Ananthanarayanan A, Huang L, Lim KH, Chen P. Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. *J Mater Chem C*. 2014;2:6954-60.
21. Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ, Chen P. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *Small*. 2015;11:1620-36.
22. Ray SC, Saha A, Jana NR, Sarkar R. Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application. *J Phys Chem C*. 2009;113:18546-51.
23. Hu S-L, Niu K-Y, Sun J, Yang J, Zhao N-Q, Du X-W. One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. *J Mater Chem*. 2009;19:484-8.
24. Farshbaf M, Davaran S, Rahimi F, Annabi N, Salehi R, Akbarzadeh A. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46:1331-48.
25. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, i sar. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*. 2010;4:3181-6.

26. Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, *i sar.* Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res Lett.* 2011;6:8.
27. Wang S, Chen Z-G, Cole I, Li Q. Structural evolution of graphene quantum dots during thermal decomposition of citric acid and the corresponding photoluminescence. *Carbon.* 2015;82:304-13.
28. Liu JH, Yang ST, Wang H, Chang Y, Cao A, Liu Y. Effect of size and dose on the biodistribution of graphene oxide in mice. *Nanomedicine.* 2012;7:1801-12.
29. Yang X, Zhang X, Liu Z, Ma Y, Huang Y, Chen Y. High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide. *J Phys Chem C.* 2008;112:17554-8.
30. Chong Y, Ge C, Fang G, Tian X, Ma X, Wen T, *i sar.* Crossover between Anti- and Pro-oxidant Activities of Graphene Quantum Dots in the Absence or Presence of Light. *ACS Nano.* 2016;10:8690-9.
31. Ristic BZ, Milenkovic MM, Dakic IR, Todorovic-Markovic BM, Milosavljevic MS, Budimir MD, *i sar.* Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots. *Biomaterials.* 2014;35:4428-35.
32. Markovic ZM, Ristic BZ, Arsićin KM, Klisic DG, Harhaji-Trajkovic LM, Todorovic-Markovic BM, *i sar.* Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials.* 2012;33:7084-92.
33. Shang W, Zhang X, Zhang M, Fan Z, Sun Y, Han M, *i sar.* The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale.* 2014;6:5799-806.
34. Yang ST, Wang X, Wang H, Lu F, Luo PG, Cao L, Mezziani MJ, *i sar.* Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.* 2009, 113:18110-18114.
35. Zhao QL, Zhang ZL, Huang BH, Peng J, Zhang M, Pang DW. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem Commun.* 2008;7:5116-8.
36. Abdullah Al N, Lee JE, In I, Lee H, Lee KD, Jeong JH, *i sar.* Target delivery and cell imaging using hyaluronic acid-functionalized graphene quantum dots. *Mol Pharm.* 2013;10:3736-44.
37. Yang ST, Cao L, Luo PG, Lu F, Wang X, Wang H, *i sar.* Carbon dots for optical imaging in vivo. *J Am Chem Soc.* 2009;131:11308-9.
38. Huang X, Zhang F, Zhu L, Choi KY, Guo N, Guo J, *i sar.* Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. *ACS Nano.* 2013;7:5684-93.

39. Grebowski J, Kazmierska P, Krokosz A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *Biomed Res Int.* 2013;2013:751913.
40. Xu J-Y, Su Y-Y, Cheng J-S, Li S-X, Liu R, Li W-X, i sar. Protective effects of fullereneol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon.* 2010;48:1388-96.
41. Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R21-6.
42. Bogdanovic G, Kojic V, Dordevic A, Canadanovic-Brunet J, Vojinovic-Miloradov M, Baltic VV. Modulating activity of fullerol C60(OH)22 on doxorubicin-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2004;18:629-37.
43. Mroz P, Tegos GP, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci.* 2007;6:1139-49.
44. Dragojevic-Simic V, Jacevic V, Dobric S, Djordjevic A, Bokonjic D, Bajcetic M, i sar. Anti-inflammatory activity of fullereneol c 60 (oh) 24 nano-particles in a model of acute inflammation in rats. *Dig J Nanomater Bios.* 2011;6.
45. Jiang T, Sun W, Zhu Q, Burns NA, Khan SA, Mo R, i sar. Furin-mediated sequential delivery of anticancer cytokine and small-molecule drug shuttled by graphene. *Adv Mater.* 2015;27:1021-8.
46. Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, i sar. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res.* 2008;1:203-12.
47. Mendes RG, Bachmatiuk A, Büchner B, Cuniberti G, Rummeli MH. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms. *J Mater Chem B.* 2013;1:401-28.
48. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:393-407.
49. Rauch J, Kolch W, Laurent S, Mahmoudi M. Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. *Chem Rev.* 2013;113:3391-406.
50. Dawson KA, Salvati A, Lynch I. Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:84-5.
51. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, i sar. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2008;118:1532-43.

52. Hirai T, Yoshioka Y, Udaka A, Uemura E, Ohe T, Aoshima H, i sar. Potential Suppressive Effects of Two C60 Fullerene Derivatives on Acquired Immunity. *Nanoscale Res Lett.* 2016;11:449.
53. Dudek I, Skoda M, Jarosz A, Szukiewicz D. The Molecular Influence of Graphene and Graphene Oxide on the Immune System Under In Vitro and In Vivo Conditions. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016;64:195-215.
54. Qu C, Wang L, He J, Tan J, Liu W, Zhang S, i sar. Carbon nanotubes provoke inflammation by inducing the pro-inflammatory genes IL-1beta and IL-6. *Gene.* 2012;493:9-12.
55. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, Simovic Markovic B, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, i sar. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. *ACS Nano.* 2014;8:12098-109.
56. Tomic S, Janjetovic K, Mihajlovic D, Milenkovic M, Kravic-Stevovic T, Markovic Z, i sar. Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells. *Biomaterials.* 2017;146:13-28.
57. Qin Y, Zhou ZW, Pan ST, He ZX, Zhang X, Qiu JX, i sar. Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology.* 2015;327:62-76.
58. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis.* 2008;67 Suppl 3:iii56-60.
59. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:182-91.
60. Ercolini AM, Miller SD. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. *J Immunol.* 2006;176:3293-8.
61. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 2006;1:1810-9.
62. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 2006;1:1952-60.
63. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:904.
64. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med.* 1933;58:39.

65. Höflich KM, Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, i sar. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Res.* 2016;1650:125-33.
66. Delarasse C, Smith P, Baker D, Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology.* 2013;140:456-64.
67. Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 2018;96:1021-42.
68. Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell.* 1993;72:551-60.
69. Olivares-Villagómez D, Wang Y, Lafaille JJ. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1998;188:1883-94.
70. Waldner H, Whitters MJ, Sobel RA, Collins M, Kuchroo VK. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3412-7.
71. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 2003;197:1073-81.
72. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol.* 2010;11:628-34.
73. Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest.* 2006;116:2385-92.
74. Legroux L, Arbour N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10:528-46.
75. Barten DM, Ruddle NH. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1994;51:123-33.
76. Mony JT, Khoroshii R, Owens T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:187.

77. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:545-58.
78. Peterson LK, Fujinami RS. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;184:37-44.
79. Tse HY, Skundric DS, Cruikshank WW, Montgomery PC, Lisak RP. Immunopathology of CD4+ T Cell-Mediated Autoimmune Responses to Central Nervous System Antigens: Role of IL-16. *J Immunol Clin Res.* 2013;1:1006.
80. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173-89.
81. Duffy SS, Lees JG, Moalem-Taylor G. The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult Scler Int.* 2014;2014:285245.
82. Waxman SG, Craner MJ, Black JA. Na⁺ channel expression along axons in multiple sclerosis and its models. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:584-91.
83. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:1-11.
84. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421:744-8.
85. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:391-403.
86. Rincón M, Flavell RA, Davis RA. The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1328-37.
87. Dungan LS, McGuinness NC, Boon L, Lynch MA, Mills KH. Innate IFN-gamma promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. *Eur J Immunol.* 2014;44:2903-17.
88. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2004;200:79-87.
89. Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* 2011;585:3747-57.

90. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, i sar. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996;156:5-7.
91. Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 2008;57:115-20.
92. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010;20:4-12.
93. Chen J, Yao B, Li C, Shi G. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon.* 2013;64:225-9.
94. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, i sar. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012;151:289-303.
95. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, i sar. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2008;452:773-6.
96. O'Connor RA, Malpass KH, Anderton SM. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;179:958-66.
97. Koutrolos M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:163.
98. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:325-38.
99. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:324-37.
100. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, i sar. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol.* 2011;12:295-303.
101. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7:65-74.
102. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, i sar. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264.
103. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.

104. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278:7320-6.
105. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res.* 2015;2:12.
106. Joshi VD, Kalvakolanu DV, Cross AS. Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis1. *FEBS Lett.* 2003;555:180-4.
107. Bozic B, Rozman B. Apoptosis and Autoimmunity. *EJIFCC.* 2006;17:69-74.
108. Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf KL, Kramer B, et al. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2001;21:6214-20.
109. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001;7:115-21.
110. Muller S, Brun S, Rene F, de Seze J, Loeffler JP, Jeltsch-David H. Autophagy in neuroinflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2017;16:856-74.
111. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297:F244-F56.
112. Keller CW, Lunemann JD. Autophagy and Autophagy-Related Proteins in CNS Autoimmunity. *Front Immunol.* 2017;8:165.
113. Liang P, Le W. Role of autophagy in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurosci Bull.* 2015;31:435-44.
114. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med.* 2003;9:65-76.
115. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.
116. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy.* 2014;10:431-41.
117. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009; 452:181-97.
118. Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2017;176:55-62.

119. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:722-37.
120. Bhattacharya A, Parillon X, Zeng S, Han S, Eissa NT. Deficiency of autophagy in dendritic cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem.* 2014;289:26525-32.
121. Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8495160.
122. Feng X, Hou H, Zou Y, Guo L. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017;17:95-103.
123. Mukhopadhyay P, Eid N, Abdelmegeed M, Sen A. Interplay of Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Their Role in Tissue Injury of the Heart, Liver, and Kidney. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 2090813.
124. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.
125. Nakahara J, Aiso S, Suzuki N. Autoimmune versus oligodendroglipathy: the pathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010;58:325-33.
126. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354:942-55.
127. Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci.* 2012;32:8855-64.
128. Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, i sar. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci.* 2008;28:7174-83.
129. Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35:615-21.
130. Jovanovic SP, Syrgiannis Z, Markovic ZM, Bonasera A, Kepic DP, Budimir MD, i sar. Modification of Structural and Luminescence Properties of Graphene Quantum Dots by Gamma Irradiation and Their Application in a Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:25865-74.
131. Sriram S, Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2005;58:939-45.

132. Major EO, Yousry TA, Clifford DB. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy and risks associated with treatments for multiple sclerosis: a decade of lessons learned. *Lancet Neurol.* 2018;17:467-80.
133. Buc M. New biological agents in the treatment of multiple sclerosis. *Bratisl Lek Listy.* 2018;119:191-7.
134. Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G. Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull.* 2010;95:79-104.
135. Kokubo K, Shirakawa S, Kobayashi N, Aoshima H, Oshima T. Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fullerene as a single nanoparticle. *Nano Res.* 2010;4:204-15.
136. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* 1958;80:1339.
137. Nečas D, Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics.* 2012;10:181-8.
138. Biran V, Joly LM, Heron A, Vernet A, Vega C, Mariani J, et al. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Exp Neurol.* 2006;199:103-12.
139. Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1953;12:400-3.
140. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
141. Vick RS, Chen SJ, DeVries GH. Isolation, culture, and characterization of adult rat oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 1990;25:524-34.
142. Loers G, Makhina T, Bork U, Dorner A, Schachner M, Kleene R. The interaction between cell adhesion molecule L1, matrix metalloproteinase 14, and adenine nucleotide translocator at the plasma membrane regulates L1-mediated neurite outgrowth of murine cerebellar neurons. *J Neurosci.* 2012;32:3917-30.
143. Das A, Guyton MK, Butler JT, Ray SK, Banik NL. Activation of calpain and caspase pathways in demyelination and neurodegeneration in animal model of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7:313-20.
144. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol.* 2010;225:9-17.
145. Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med.* 2017;6:24.

146. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, i sar. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11613-8.
147. Wu C, Wang C, Han T, Zhou X, Guo S, Zhang J. Insight into the cellular internalization and cytotoxicity of graphene quantum dots. *Adv Healthc Mater*. 2013;2:1613-9.
148. Sun H, Wu L, Gao N, Ren J, Qu X. Improvement of photoluminescence of graphene quantum dots with a biocompatible photochemical reduction pathway and its bioimaging application. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5:1174-9.
149. Fransson ME, Liljenfeldt LS, Fagius J, Totterman TH, Loskog AS. The T-cell pool is anergized in patients with multiple sclerosis in remission. *Immunology*. 2009;126:92-101.
150. Fujii C, Kondo T, Ochi H, Okada Y, Hashi Y, Adachi T, i sar. Altered T cell phenotypes associated with clinical relapse of multiple sclerosis patients receiving fingolimod therapy. *Sci Rep*. 2016;6:35314.
151. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, i sar. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002;8:500-8.
152. Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*. 2010;5:e15531.
153. O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, i sar. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008;181:3750-4.
154. Lees JR, Iwakura Y, Russell JH. Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. *J Immunol*. 2008;180:8066-72.
155. Berghmans N, Nuyts A, Uyttenhove C, Van Snick J, Opdenakker G, Heremans H. Interferon-gamma orchestrates the number and function of Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31:575-87.
156. Momcilovic M, Miljkovic Z, Popadic D, Markovic M, Savic E, Ramic Z, i sar. Methylprednisolone inhibits interleukin-17 and interferon-gamma expression by both naive and primed T cells. *BMC Immunol*. 2008;9:47.

157. Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN-gamma limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11495-500.
158. Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD. Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med*. 1995;181:607-17.
159. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:533-44.
160. Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, Biron KE, Reickmann P, Jefferies WA, et al. Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *J Neuroimmunol*. 2010;229:180-91.
161. Paterson PY, Koh CS, Kwaan HC. Role of the clotting system in the pathogenesis of neuroimmunologic disease. *Fed Proc*. 1987;46:91-6.
162. Leibowitz S, Kennedy L. Cerebral vascular permeability and cellular infiltration in experimental allergic encephalomyelitis. *Immunology*. 1972;22:859-69.
163. Fabis MJ, Scott GS, Kean RB, Koprowski H, Hooper DC. Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5656-61.
164. Pollak Y, Ovadia H, Goshen I, Gurevich R, Monsa K, Avitsur R, et al. Behavioral aspects of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2000;104:31-6.
165. Dowling P, Husar W, Menonna J, Donnenfeld H, Cook S, Sidhu M. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci*. 1997;149:1-11.
166. Hövelmeyer N, Hao Z, Kranidioti K, Kassiotis G, Buch T, Frommer F, et al. Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2005;175:5875-84.
167. Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, Kilianek L, Raine CS, Selmaj K. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain*. 2005;128:2675-88.
168. Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T. MEK-ERK signaling is involved in interferon- γ -induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem*. 2006;281:20095-106.
169. Juurlink BH. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:151-66.

170. Reichardt HM, Luhder F. The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Curr Pharm Des.* 2012;18:4453-64.
171. Zettl UK, Mix E, Zielasek J, Stangel M, Hartung HP, Gold R. Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro. *Cell Immunol.* 1997;178:1-8.
172. Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R. Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp Neurol.* 2006;197:373-85.
173. Vogt J, Paul F, Aktas O, Muller-Wielsch K, Dorr J, Dorr S, i sar. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 2009;66:310-22.
174. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2008;131:1722-35.
175. Popovic M, Stanojevic Z, Tosic J, Isakovic A, Paunovic V, Petricevic S, i sar. Neuroprotective arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neurochem.* 2015;135:125-38.
176. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J Neurochem.* 2011;116:508-21.
177. Zhang Y, Wang X, Yang H, Liu H, Lu Y, Han L, i sar. Kinase AKT controls innate immune cell development and function. *Immunology.* 2013;140:143-52.
178. Pollak L, Hanoch T, Rabey MJ, Seger R. Infectious inflammation of the CNS involves activation of mitogen-activated protein kinase and AKT proteins in CSF in humans. *Neurol Sci.* 2005;26:324-9.
179. Agrawal A, Dillon S, Denning TL, Pulendran B. ERK1^{-/-} mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;176:5788-96.
180. Nekrasova T, Shive C, Gao Y, Kawamura K, Guardia R, Landreth G, i sar. ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2005;175:2374-80.
181. Noubade R, Kremontsov DN, Del Rio R, Thornton T, Nagaleekar V, Saligrama N, i sar. Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 2011;118:3290-300.

182. Rincon M, Enslin H, Raingeaud J, Recht M, Zapton T, Su MS, i sar. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.* 1998;17:2817-29.
183. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012;40:139-46.
184. Kumar S, Patel R, Moore S, Crawford DK, Suwanna N, Mangiardi M, i sar. Estrogen receptor beta ligand therapy activates PI3K/Akt/mTOR signaling in oligodendrocytes and promotes remyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2013;56:131-44.
185. Narayanan SP, Flores AI, Wang F, Macklin WB. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci.* 2009;29:6860-70.
186. Fragoso G, Robertson J, Athlan E, Tam E, Almazan G, Mushynski WE. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene expression associated with Schwann cell myelination. *Exp Neurol.* 2003;183:34-46.
187. Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, de Vries H. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol Cell Neurosci.* 2000;15:314-29.
188. Fragoso G, Haines JD, Roberston J, Pedraza L, Mushynski WE, Almazan G. p38 mitogen-activated protein kinase is required for central nervous system myelination. *Glia.* 2007;55:1531-41.
189. Rajendran R, Giraldo-Velasquez M, Stadelmann C, Berghoff M. Oligodendroglial fibroblast growth factor receptor 1 gene targeting protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis through ERK/AKT phosphorylation. *Brain Pathol.* 2018;28:212-24.
190. Diem R, Hobom M, Maier K, Weissert R, Storch MK, Meyer R, i sar. Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci.* 2003;23:6993-7000.
191. Cai Y, Wan Z, Sun T, Shi Y, Sun Y, Huang P, i sar. Diarylquinoline compounds induce autophagy-associated cell death by inhibiting the Akt pathway and increasing reactive oxygen species in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013;29:983-92.
192. Bruning A, Rahmeh M, Friese K. Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol.* 2013;7:1012-8.

193. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, i sar. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965.
194. Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-activated Protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? *J Signal Transduct*. 2011;2011:792639.
195. Alirezaei M, Fox HS, Flynn CT, Moore CS, Hebb AL, Frausto RF, i sar. Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis. *Autophagy*. 2009;5:152-8.
196. Paunovic V, Petrovic IV, Milenkovic M, Janjetovic K, Pravica V, Dujmovic I, i sar. Autophagy-independent increase of ATG5 expression in T cells of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2018;319:100-5.
197. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, i sar. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13:255-63.
198. Nath N, Khan M, Rattan R, Mangalam A, Makkar RS, de Meester C, i sar. Loss of AMPK exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis disease severity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386:16-20.
199. Kafa H, Wang JT, Rubio N, Venner K, Anderson G, Pach E, i sar. The interaction of carbon nanotubes with an in vitro blood-brain barrier model and mouse brain in vivo. *Biomaterials*. 2015;53:437-52.
200. Costa PM, Bourgognon M, Wang JT, Al-Jamal KT. Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. *J Control Release*. 2016;241:200-19.
201. Yang ST, Wang X, Wang H, Lu F, Luo PG, Cao L, i sar. Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*. 2009;113:18110-4.
202. Chong Y, Ma Y, Shen H, Tu X, Zhou X, Xu J, i sar. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*. 2014;35:5041-8.
203. Girish CM, Sasidharan A, Gowd GS, Nair S, Koyakutty M. Confocal Raman imaging study showing macrophage mediated biodegradation of graphene in vivo. *Adv Healthc Mater*. 2013;2:1489-500.
204. Kurapati R, Russier J, Squillaci MA, Treossi E, Menard-Moyon C, Del Rio-Castillo AE, i sar. Dispersibility-Dependent Biodegradation of Graphene Oxide by Myeloperoxidase. *Small*. 2015;11:3985-94.

205. Campuzano O, Castillo-Ruiz MM, Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. Decreased myeloperoxidase expressing cells in the aged rat brain after excitotoxic damage. *Exp Gerontol.* 2011;46:723-30.
206. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, i sar. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2004;90:724-33.
207. Dong Y, Chen C, Zheng X, Gao L, Cui Z, Yang H, i sar. One-step and high yield simultaneous preparation of single- and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black. *J Mater Chem.* 2012;22:8764.
208. Pan D, Guo L, Zhang J, Xi C, Xue Q, Huang H, i sar. Cutting sp² clusters in graphene sheets into colloidal graphene quantum dots with strong green fluorescence. *J Mater Chem.* 2012;22:3314.
209. Zhang M, Bai L, Shang W, Xie W, Ma H, Fu Y, i sar. Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *J Mater Chem.* 2012;22:7461.

BIOGRAFIJA

Jelena Tasić je rođena 27.04.1988. godine u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu biologija je završila 2010.godine, sa prosečnom ocenom 8,48 a master studije na studijskom programu molekularna biologija i fiziologija 2012. godine, sa prosečnom ocenom 9,05 na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine. Od decembra 2012. godine radi na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Naučno istraživački rad Jelene Tasić realizovan je kroz projekat finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije “Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja” (evidencioni broj III 41025, rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković). Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu aprila 2017. godine, Jelena Tasić je stekla izbor u zvanje Istraživač saradnik u oblasti Molekularne medicine.

Koautor je 8 radova u međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Jelena Tasić**

broj upisa **MM17/12**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u modelu neuroinflamacije kod pacova

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.7.2019.

Tasić Jelena

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Jelena Tasić**

Broj upisa **MM17/12**

Studijski program **molekularna medicina**

Naslov rada **Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u modelu neuroinflamacije kod pacova**

Mentor **prof. dr Aleksandra Isaković**

Potpisani **Jelena Tasić**

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.7.2019.

Tasić Jelena

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u modelu neuroinflamacije kod pacova

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

doktoranda

U Beogradu, 17.7.2019.

Potpis

Taric Jelenc

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.