

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Jana V. Blaževski

Ekspresija, produkcija i moguća uloga  
interleukina 10 i faktora nekroze tumora  
tokom eksperimentalnog autoimunskog  
encefalomijelitisa u pacova sojeva AO i DA

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

University of Belgrade

Faculty of Biology

Jana V. Blaževski

Expression, production and possible role of  
interleukin 10 and tumor necrosis factor  
during experimental autoimmune  
encephalomyelitis in AO and DA rats

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

**dr Miljana Momčilović**

viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

**dr Milena Kataranovski**

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

**dr Miljana Momčilović**

viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

**dr Marija Mostarica-Stojković**

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**dr Milena Kataranovski**

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta ON173035 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića.

Hvala,

mojoj mentorki dr Miljani Momčilović na strpljenju koje je imala dok me je učila osnovama eksperimentalnog rada, na razumevanju i pomoći u svim poteškoćama na koje smo nailazili tokom vremena, ali pre svega, hvala joj na prijateljskom stavu i iskrenosti kakvu je danas teško naći u poslovnom okruženju.

dr Đorđu Miljkoviću koji je najzaslužniji za moj naučni razvoj na svemu što me je naučio, kao i na nesebičnoj pomoći u svima fazama izrade ove teze.

dr Mariji Mostarici-Stojković na osmišljavanju koncepta ovog istraživanja i na savetima koji su bili od presudnog značaja tokom faze pisanja ove doktorske disertacije.

dr Mileni Kataranovski, profesorki koja je doprinela da još više zavolim imunologiju.

Hvala,

Filipu, koji je eksperimentalni deo ove disertacije uradio zajedno sa mnom.

Maloj Ivani, bez čije podrške ne bih uspela.

Tanji, velikoj Ivani, Tamari, Milici, Neli, Sanji, Mariji i Mirni na profesionalnim savetima i pomoći, kao i na tome što su doprinele da se osećam kao deo tima.

Neninim devojkama, na dobrom raspoloženju koje vlada u 66-ici.

Takođe, hvala i svim dragim ljudima koji su bili uz mene sve ove godine i koji su bili moj svakodnevni oslonac.

Ekspresija, produkcija i moguća uloga interleukina 10 i faktora nekroze tumora tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa u pacova sojeva AO i DA

## **Rezime**

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) sa autoimunskom patogenezom. Najčešće pogađa populaciju između 20-40 godina, češća je kod žena nego kod muškaraca, kao i u Evropi i Severnoj Americi u odnosu na druge delove sveta. Iako još uvek nije jasno definisan uzrok nastanka ove bolesti, smatra se da su u njenoj osnovi kompleksne interakcije između različitih gena i faktora sredine.

Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE) je najkorišćeniji animalni model MS-a. Indukuje se najčešće u glodarima i to imunizacijom, korišćenjem homogenata tkiva CNS-a, mijelina ili nekih od proteina mijelina koji se mešaju sa adjuvansom. Nakon imunizacije, CD4<sup>+</sup> T-ćelije specifične za antigen CNS-a proliferišu i diferenciraju se u drenirajućem limfnom čvoru, nakon čega dolazi do njihove migracije i širenja po celom organizmu. Deo ćelija specifičnih za antigene nervnog sistema odlazi u CNS, prolazi kroz krvno-moždanu barijeru i u perivaskularnom prostoru prepoznaje antigen za koji je specifičan. Nakon susreta sa antigenom T-ćelije bivaju reaktivirane, počinju da proizvode odgovarajuće citokine, aktiviraju lokalne ćelije i dalje privlače inflamatorne ćelije u CNS. Na ovaj način nastaje inflamatorna reakcija koja za posledicu ima uništavanje mijelinskog omotača, a u određenim slučajevima i aksona dovodeći tako do neurodegeneracije.

Citokini predstavljaju bitne medijatore svakog inflamatornog procesa. IL-10 je anti-inflamatorni citokin sa osnovnom ulogom u zaštiti tkiva i ograničavanju preteranog inflamatornog odgovora. Sa druge strane, TNF je predstavnik pro-inflamatorne grupe citokina koji ima ključnu ulogu medijatora akutne i hronične sistemske inflamatorne reakcije. Oba citokina su dosta proučavana u EAE modelu, gde se IL-10 u najširem smislu smatra protektivnim, dok se TNF uglavnom smatra štetnim i odgovornim za pojačavanje inflamatorne reakcije.

AO i DA pacovi se nalaze na suprotnim polovima podložnosti kada je indukovanje EAE-a u pitanju. AO pacovi predstavljaju soj visoko rezistentan na razvoj EAE-a, i ne razvijaju bolest čak ni u uslovima u kojima drugi rezistentni sojevi mogu da razviju EAE. Sa druge strane, DA pacovi su soj koji može da razvije bolest i korišćenjem blagih imunizacionih protokola. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio da se ispita doprinos IL-10, tipičnog anti-inflamatornog citokina i TNF, tipičnog pro-inflamatornog citokina podložnosti, odnosno rezistenciji na indukciju EAE-a, korišćenjem AO/DA modela sojnih razlika.

Metodološki, istraživanje je koncipirano tako da se na imunizovanim životinjama ispituju ekspresija i produkcija navedenih citokina i to prvo na periferiji a zatim u CNS-u. Za ispitivanja perifernog imunskog odgovora korišćeni su uglavnom drenirajući limfni čvorovi koji su vađeni iz životinja u induktivnoj fazi bolesti. Za ispitivanje imunskog odgovora u CNS-u iz životinja su vađene kičmene moždine u različitim fazama bolesti i pripremani su homogenati i infiltrati u kojima je ispitivana genska ekspresija i produkcija citokina. Takođe, iz drenirajućih limfnih čvorova, kao i iz infiltrata kičmene moždine izolovane su  $CD4^+$  ćelije koje se smatraju osnovnom patogenom populacijom odgovornom za nastanak EAE-a, i na njima je ispitivana ekspresija i produkcija citokina. Osnovne tehnike korišćene u ovom doktoratu bile su „real time“ RT PCR za ispitivanje genske ekspresije i ELISA za određivanje proteinske produkcije. Pored navedenog, još jedan bitan pravac istraživanja bio je i uticaj IL-10 i TNF na hemokin CXCL12, koji se u našoj laboratoriji pokazao kao veoma bitan protektivni molekul kada je razvoj EAE-a u pitanju. Za ova istraživanja korišćena je primarna astrocitna kultura, zato što su astrociti osnovni proizvođači CXCL12 u CNS-u.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da su i ekspresija i produkcija IL-10 veće u drenirajućim limfnim čvorovima DA u odnosu na AO pacove izolovanim u induktivnoj fazi bolesti, ali da ove razlike nema kada se iz njih izoluju  $CD4^+$  ćelije. Kada je TNF u pitanju, nije pokazana razlika između AO i DA pacova u ekspresiji i produkciji u drenirajućim limfnim čvorovima izolovanim u induktivnoj fazi bolesti, kao ni u  $CD4^+$  ćelijama izolovanim iz ovih organa.

Dalje, u homogenatima i infiltratima kičmene moždine, izolovanim na piku bolesti ekspresija i produkcija IL-10 bile su veće kod DA u odnosu na AO pacove. Takođe,

ekspresija IL-10 je bila veća u CD4<sup>+</sup> ćelijskoj populaciji izolovanoj iz infiltrata kičmene moždine kod DA pacova. Ovo je ukazalo da bi povišen IL-10 na piku bolesti kod DA pacova mogao da ima ulogu u otpočinjanju procesa oporavka kod ovih pacova, kao i da se povećanje njegove ekspresije dešava u CNS-u, te da je sam milje u kome se CD4<sup>+</sup> ćelije nađu nakon dospevanja u CNS odgovoran za ovaj fenomen.

Zanimljivo je da je za TNF dobijen obrnut obrazac ekspresije i produkcije. Naime, u homogenatima i infiltratima kičmene moždine izolovanim na piku bolesti ekspresija i produkcija TNF bila je veća kod AO u odnosu na DA pacove. Ovakav trend ekspresije je pokazan i u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine na piku bolesti. Iako se TNF smatra pro-inflamatornim citokinom, ovo istraživanje je pokazalo da njegova uloga u razvoju EAE-a nije tako jednostavna i jednostrana, s obzirom na njegov povišen nivo kod rezistentnog AO soja. Stoga, može se pretpostaviti da bi povišen nivo TNF mogao da bude jedan od faktora koji doprinose rezistenciji AO pacova na razvoj EAE-a.

Još jedan bitan rezultat ove disertacije je uticaj IL-10 i TNF na ekspresiju CXCL12 u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita. Naime, oba ova citokina su dovela do povećanja ekspresije CXCL12. Kako je pokazano da CXCL12 ima mnoge efekte koji ograničavaju i smanjuju neuroinflamaciju, ovaj rezultat bi mogao da se protumači kao mehanizam uz pomoć koga IL-10 dovodi do oporavka DA, odnosno jedan od načina na koji TNF dovodi do rezistencije AO pacova na indukciju EAE-a.

**Ključne reči:** eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, IL-10, TNF, CXCL12, centralni nervni sistem, CD4<sup>+</sup> ćelije, astrociti

**Naučna oblast:** biologija

**Uža naučna oblast:** imunobiologija

**UDK broj:** 616.8-003.99 : 577.27(043.3)

Expression, production and possible role of interleukin 10 and tumor necrosis factor during experimental autoimmune encephalomyelitis in AO and DA rats

## **Abstract**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) with a proposed autoimmune pathogenesis. It mainly affects population between 20-40 years of age, more often women in comparison to men. Also, it is more often in Europe and north America comparing to other parts of the world.. The cause of this disease is still not well defined, but it is thought to be complex interaction between genes and different environmental factors.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most commonly used MS animal model. It is mostly induced in rodents by using spinal cord homogenate, myelin or some of the myelin's proteins and mixing them with adjuvants. After the immunization antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells proliferate and differentiate in draining lymph nodes after which they migrate and spread all around the body. One part of the antigen specific cells goes to CNS, crosses blood-brain barrier and enters the perivascular space where it recognizes antigens which they are specific for. After encountering the antigens T cells are reactivated and they start producing cytokines, activate local cells and attract other inflammatory cells in to the CNS. This is how inflammatory reaction begins leading to destruction of myelin sheath or even axons in some cases, finally causing neurodegeneration.

Cytokines are important mediators of every inflammatory process. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine with a primary role in tissue protection and restriction of inflammatory response. On the other hand, TNF is a classical pro-inflammatory cytokine which mediates acute and chronic systemic inflammatory reaction. The role of both these cytokines has been well studied in EAE model, where IL-10 is considered to be protective while TNF is mostly thought of as deleterious and responsible for increasing the inflammatory reaction.



AO and DA rats are at the opposite poles when induction of EAE is considered. AO is a highly resistant rat strain that does not develop EAE even in the conditions in which other resistant strains are able to develop disease. On the other hand, DA rats can develop disease even when mild immunization protocols are used. Having in mind the above, the goal of this doctoral dissertation was to investigate the role of one typically anti-inflammatory cytokine such as IL-10 and one typically pro-inflammatory cytokine such as TNF in the susceptibility and resistance to the induction of EAE, using AO/DA model of strain differences.

Methodologically the idea behind this research was to use immunized rats to explore expression and production of the above mentioned cytokines, starting from the periphery and then moving to the CNS. To address the peripheral immune response draining lymph nodes were taken from the animals in the inductive phase of the disease, while for examining the immune response in the CNS spinal cords were taken from the animals in different stages of the disease. Spinal cord homogenates as well as cells infiltrating the spinal cord (infiltrates) were isolated and used to examine gene expression and cytokine production. Also CD4<sup>+</sup> cells, which are considered to be the main pathogenic population in the development of EAE, were isolated both from draining lymph nodes as well as from spinal cord infiltrates and used to determine cytokine expression and production. Basic techniques used in this dissertation were 'real time' RT PCR for the assessment of gene expression and ELISA for the assessment of protein production. Besides, another important goal of this research was to investigate the effect of IL-10 and TNF on CXCL12, a chemokine which was previously proven in our laboratory to be protective during the development of EAE. For this part of the research primary astrocytes were used, as they are major producers of CXCL12 in the CNS.

Results of this thesis showed that both expression and production of IL-10 were higher in the draining lymph nodes of DA in comparison to AO rats isolated at the inductive phase of the disease, but this difference was lost once CD4<sup>+</sup> cells were isolated from this tissue. As far as TNF is considered, there was no difference between AO and DA rats in its expression and production in the draining lymph nodes or in the CD4<sup>+</sup> cells isolated from this tissue in the inductive phase of the disease.

In the spinal cord homogenates and infiltrates isolated at the peak of the disease both expression and production of IL-10 were higher in DA in comparison to AO rats. Also IL-10 expression was higher in CD4<sup>+</sup> cells isolated from the spinal cord infiltrates of DA rats. This suggested that higher IL-10 level at the peak of the disease in DA rats could have a part in the beginning of the recovery process in these rats. Likewise, since this increase happens in the CNS we can speculate that the environment of the CNS to which CD4<sup>+</sup> cells arrive from the periphery is of great importance for this phenomenon.

It is interesting that different pattern of expression and production of TNF was observed. Namely, both in the spinal cord homogenates and infiltrates isolated at the peak of the disease expression and production of TNF were higher in AO comparing to DA rats. This was also true for CD4<sup>+</sup> cells isolated from the spinal cord infiltrates at the peak of the disease. Although TNF is generally considered a pro-inflammatory cytokine, this research shows that its role in the development of EAE is not so simple since higher level of this cytokine was observed in AO rats which are resistant to EAE induction. So, it can be presumed that higher TNF level can be one of the factors which contribute to the resistance of AO rats to the development of EAE.

Another important result from this thesis is the effect of IL-10 and TNF on the expression of CXCL12 in primary astrocytes, as both of these cytokines increased the expression of CXCL12. Since it was shown that CXCL12 has many effects which limit and down regulate neuroinflammation this result can be interpreted as a mechanism through which IL-10 leads to recovery of DA rats and one of the ways through which TNF leads to AO rats resistance to EAE induction.

**Key words:** experimental autoimmune encephalomyelitis, IL-10, TNF, CXCL12, central nervous system, CD4<sup>+</sup> cells, astrocytes

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Immunobiology

**UDK number:** 616.8-003.99 : 577.27(043.3)

# Sadržaj

UVOD.....	1
1.1 Multipla skleroza .....	2
1.1.2 Etiologija bolesti .....	2
1.1.3 Kliničke manifestacije i patohistološke promene .....	3
1.1.4 Patogeneza bolesti .....	4
1.2 Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis .....	5
1.2.2 Indukcija EAE-a kod laboratorijskih životinja .....	6
1.2.3 Čelijske populacije odgovorne za nastanak bolesti .....	7
1.2.4 Patogeneza bolesti .....	8
1.2.5 EAE kod AO i DA pacova .....	10
1.3 IL-10.....	11
1.3.1 Opšte odlike.....	11
1.3.2 IL-10 u MS-u i EAE-u .....	13
1.4 TNF .....	15
1.4.1 Opšte odlike .....	15
1.4.2 TNF u MS-u i EAE-u.....	16
CILJEVI .....	18
MATERIJAL I METODE.....	20
3.1 Eksperimentalne životinje .....	21
3.1.2 Indukovanje EAE-a.....	21
3.1.3 Procena kliničke slike.....	21
3.1.4 In vivo tretman životinja metilprednizolonom .....	22

3.1.5 <i>In vivo</i> tretman životinja etanerceptom .....	22
3.2 Priprema ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija .....	22
3.2.1 Medijumi za pripremu i kultivisanje ćelija .....	22
3.2.2 Izolovanje mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	23
3.2.3 Izolovanje ćelija drenirajućeg limfnog čvora .....	23
3.2.4 Izolovanje homogenata kičmene moždine i ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu	23
3.2.5 Prečišćavanje CD4 <sup>+</sup> ćelija magnetnom separacijom.....	24
3.2.6 Izolovanje astrocita i uspostavljanje primarne ćelijske kulture.....	24
3.2.7 Priprema ConA supernatanata.....	24
3.2.8 Određivanje broja ćelija .....	25
3.2.9 Ćelijske kulture .....	25
3.3 Određivanje nivoa ekspresije gena .....	25
3.3.2 Izolacija RNK.....	26
3.3.3 Reverzna transkripcija .....	26
3.3.4 „Real Time“ RT PCR .....	27
3.4 Određivanje koncentracije citokina ELISA metodom.....	28
3.5 Imunofluorescentno bojenje za detekciju unutarćelijskih citokina na protočnom citofluorimetru .....	29
3.6 Histološka analiza.....	30
3.6.1 Priprema tkiva za analizu.....	30
3.6.2 Histološka analiza metodom imunoperoksidaze.....	30
3.7 Statistička obrada podataka.....	31

REZULTATI .....	32
4.1 Klinička slika EAE-a kod DA pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine i kompletnim Frojndovim adjuvansom .....	33
4.2 Ekspresija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova.....	34
4.3 Produkcija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova.....	34
4.4 Ekspresija IL-10 u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova .....	35
4.5 Produkcija IL-10 u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova .....	36
4.6 Ekspresija IL-10 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova .....	37
4.7 Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova .....	38
4.8 Produkcija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova .....	39
4.9 Ekspresija IL-10 u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova .....	40
4.10 Unutarćelijska produkcija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova .....	41
4.11 Ekspresija TGF- $\beta$ u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova.....	43
4.12 Ekspresija TGF- $\beta$ u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova .....	44
4.13 Ekspresija TGF- $\beta$ u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova .....	45
4.14 Klinička slika DA pacova tretiranih metilprednizolonom.....	46
4.15 Ekspresija citokina u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolom .....	47
4.16 Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom .....	48
4.17 Ekspresija IL-10 u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom.....	49

4.18	Produkcija IL-10 u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom .....	50
4.19	Ekspresija CXCL12 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova .....	51
4.20	Ekspresija CXCL12 u astrocitima DA pacova .....	52
4.21	Uticaj IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova .....	53
4.22	Uticaj neutralizacije IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova.....	54
4.23	Ekspresija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova .....	55
4.24	Produkcija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova .....	56
4.25	Ekspresija TNF u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova .....	57
4.26	Produkcija TNF u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova .....	58
2.27	Ekspresija TNF u mononuklearnim ćelijama periferne krvi AO i DA pacova .....	59
4.28	Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova .....	60
4.29	Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.....	61
4.30	Produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.....	62
4.31	Ekspresija TNF u CD4 <sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova .....	63
4.32	Unutarćelijska produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.....	64
4.33	Ekspresija TNFR1 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova.....	66
4.34	Ekspresija TNFR2 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova.....	67
4.35	Određivanje nivoa solubilnog TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova .....	68
4.36	Klinička slika AO i DA pacova tretiranih etanerceptom.....	69

4.37 Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom .....	70
4.38 Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom .....	71
4.39 Produkcija TNF u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora DA pacova in vitro tretiranim metilprednizolonom .....	72
4.40 Ekspresija TNF u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom .....	73
4.41 Korelacija ekspresije gena za TNF i CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA pacova .....	74
4.42 Uticaj TNF na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova .....	75
4.43 Uticaj etanercepta na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova .....	76
DISKUSIJA .....	78
ZAKLJUČCI .....	91
LITERATURA .....	94

# **1.UVOD**



## **1.1 Multipla skleroza**

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna i neurodegenerativna bolest koja u centralnom nervnom sistemu (CNS) dovodi do velikih fokalnih lezija primarne demijelinizacije (oštećenja mijelinskog omotača sa relativnim očuvanjem aksona). Smatra se autoimunskom bolešću CNS-a koja se indukuje kada mijelin-specifične CD4<sup>+</sup> T-ćelije prepoznaju komponente mijelinskog omotača. Autoreaktivne CD4<sup>+</sup> T-ćelije u lezijama aktiviraju makrofage i mikrogliju što dovodi do procesa hronične inflamacije koji rezultuje uništavanjem mijelinskog omotača (Lassmann, 2001). Postoje i suprotna mišljenja po kojima primarna neurodegeneracija i patološki proces započinju umiranjem oligodendrocita, dok se autoimunski odgovor i inflamacija uključuju naknadno kao sekundarni fenomeni (Trapp, 2008; Nakahara, 2012).

Epidemiološke studije pokazuju da od multiple skleroze boluje oko 2.5 miliona ljudi u svetu (World Health Organization, 2008), što je u proseku 30 obolelih na 100000 ljudi. Multipla skleroza najčešće pogađa populaciju između 20-40 godina (Kurtzke, 1992), međutim može da se javi i kod dece, kao i kod individua starijih od 60 godina. Pogađa žene približno duplo više nego muškarce (Sadovnick, 1982). Češća je u zemljama severne Evrope u poređenju sa zemljama južne Evrope, dok je veoma retka u Aziji (Rosati, 2001). Predstavlja vodeći uzrok netraumatskog invaliditeta među mladima, a ima i veliki socioekonomski uticaj u razvijenim zemljama (Noseworthy, 2000).

### **1.1.2 Etiologija bolesti**

Još uvek nije jasno definisan uzrok bolesti, ali se smatra da su u njenoj osnovi kompleksne inrerakcije između različitih gena i faktora sredine. Epidemiološke studije su identifikovale različite infektivne i neinfektivne faktore koji se dovode u vezu sa povećanim rizikom od oboljevanja, od kojih za infekciju Epštajn-Barovim virusom i nedostatak vitamina D postoji najviše dokaza (Ascherio, 2010; Handel, 2010). Studije na jednojajčanim blizancima, kao i prisustvo oligoklonskih imunoglobulinskih traka u CNS-u obolelih od MS-a idu u prilog bolesti izazvanoj virusom (Ascherio, 2007a; Owens, 2011). Molekulska mimikrija bi mogla biti inicijalni okidač pomoću koga infektivni agens dovodi do autoimunskog oštećenja tkiva (Croxford, 2002), ali direktnog dokaza za ovakvu pretpostavku nema. Kada se radi o faktorima sredine MS se dovodi u vezu sa pušenjem (Ascherio, 2007b). Kao faktori rizika za oboljevanje se

navode i stres (Marrie, 2004), različita zanimanja koja podrazumevaju izloženost određenim toksičnim rastvaračima (Marrie, 2004), vakcinacija i ishrana (Marrie, 2004; Ascherio, 2007b).

Pored sredinskih faktora, identifikovani su genetički faktori rizika koji se najčešće vezuju za MHCII (od eng. Major Histocompatibility Complex) gene, pre svega HLA-DR i HLA-DQ (Compton, 2008; Hoppenbrouwers, 2011). Aleli DRB1\*1501 i DRB5\*0101 povezani su sa svim subtipovima MS-a. Primenom ispitivanja genskih polimorfizama celokupnog genoma (GWAS, od engl. Genome wide association studies) otkriveno je preko 50 gena van MHC lokusa koji se takođe povezuju sa predispozicijom za razvoj bolesti (Baranzini, 2013). Neki od primera su gen za IL (interleukin)-2 receptor, gen za IFN (interferon)- $\gamma$  (Gourraud, 2012), kao i gen za IL-7 receptor (Teutch, 2003).

### **1.1.3 Kliničke manifestacije i patohistološke promene**

Kliničke manifestacije multiple skleroze su jako varijabilne i individualne (Compton, 2008; Lublin, 1996; O'Connor, 2002). Izolovani sindrom kao što je optički neuritis može predstavljati prvu indikaciju koja će da preraste u MS tokom vremena (Miller, 2012). Tipičan klinički tok podrazumeva fazu relapsno remitentnih simptoma (relapsno remitentna MS), koja se često nastavlja progresivnim tokom (sekundarno progresivna MS). Kod određene subpopulacije ne postoji faza remisije, pa je bolest progresivna od samog početka (primarno progresivna MS) (Aharoni, 2013). Postoji i subpopulacija pacijenata sa jako malo ili nimalo simptoma tokom dužeg vremenskog perioda pa se bolest kod njih klasifikuje kao benigna MS.

Kada je u pitanju patohistologija MS-a ona se prepoznaje po prisustvu velikih, multifokalnih, demijelinisućih lezija odnosno plaka sa formiranjem glijalnog ožiljka (Lassmann, 1998; Prineas, 1985). Ovaj proces demijelinizacije koji se dešava prevashodno u beloj masi mozga i kičmene moždine je praćen remećenjem krvno moždane barijere i inflamatornom reakcijom u kojoj se infiltrati sastoje uglavnom od T-ćelija i makrofaga. Bolest može biti akutna (dovodi do smrti godinu dana nakon početka) i hronična, pri čemu hronična može biti aktivna (postoji barem jedna aktivno demijelinisuća lezija u CNS-u) i inaktivna (bez aktivno demijelinisućih lezija u CNS-u (Lassmann 2001). Iako je mijelinski omotač glavna meta tkivne destrukcije, aksoni,

nervne ćelije i astrociti takođe bivaju uništeni, ali u manjoj meri. Akutno oštećenje neurona je veoma često u aktivnim lezijama (Kornek, 1999), što dovodi do gubitka gustine neurona u hroničnim plakama. Dok demijelinizacija može biti delimično popravljena remijelinizacijom (Prineas 1985), oštećenja aksona su ireverzibilna. Takođe, novija histološka istraživanja i savremene metode magnetne rezonance dovele su do saznanja o postojanju kortikalnih lezija, odnosno lezija u sivoj masi. Pokazana je korelacija ovih lezija sa tokom bolesti i kognitivnim poremećajima kod obolelih od MS-a (Calabrese 2013).

#### **1.1.4 Patogeneza bolesti**

Inflamacija u MS-u se podvodi pod klasičnu T-ćelijsku imunsku reakciju, koja dovodi do regrutovanja makrofaga i aktiviranja mikroglije (Wekerle, 1998). Nekoliko karakteristika MS lezija govore u prilog tome da je u pitanju Th1 (od eng. T helper) autoimunski odgovor posredovan  $CD4^+$  T-limfocitima: broj autoreaktivnih T-ćelija je povećan u krvi obolelih od MS-a; u aktivno demijelinišućim lezijama leukociti ekspimiraju Th1 citokine kao što su  $IFN-\gamma$ , faktor nekroze tumora (TNF, od eng. Tumor Necrosis Factor) i IL-2 (Merrill, 1992); spektar hemokina i njihovih receptora je takođe u skladu sa Th1 inflamatornim odgovorom (Sorensen, 1999); MS se povezuje sa određenim MHCII haplotipovima (Kalman, 1999). Sa druge strane, i Th17 ćelije se smatraju potentnim patogenim ćelijama u neuroinflamatornoj reakciji CNS-a (Iwakura, 2006; Hofstetter, 2005a). T-ćelije koje proizvode IL-17 pronađene su u aktivnom i hroničnom MS-u (Tzartos, 2008), pokazana je povećana frekvencija Th17 ćelija u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih tokom relapsne faze MS-a (Brucklacher-Waldert, 2009), visok nivo IL-17 postoji kako u plakama tako i u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih (Lock, 2002; Matusevicius, 1999). Konačno, povećana ekspresija IL-17 u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti koreliše sa težinom MS-a (Matusevicius, 1999).

Međutim, patogeneza MS je kompleksnija od čistog  $CD4^+$  autoimunskog odgovora. Brojčano,  $CD8^+$  ćelija ima više nego  $CD4^+$  (Booss, 1983), i one su dominantne na mestu tkivne destrukcije u aktivnim lezijama, dok se  $CD4^+$  ćelije zadržavaju uglavnom u perivaskularnom prostoru (Babbe, 2000). Procenat oštećenja aksona i tkivne destrukcije bolje koreliše sa brojem makrofaga i  $CD8^+$  nego sa brojem  $CD4^+$  ćelija, što govori u prilog tome da  $CD8^+$  ćelije imaju važnu ulogu u patogenezi MS-a.

Što se tiče demijelinizacije, ona može biti posredovana makrofagima, odnosno njihovim toksičnim produktima (TNF ili reaktivne vrste kiseonika i azota) (Griot, 1990) ili antitelima kojima se aktivira komplement odgovoran za lizu mijelinskog omotača (Linnington, 1988). Takođe, ishemija bele mase može biti glavni patogenetski faktor demijelinizacije i tkivnog oštećenja (Lassmann, 2001), kao i primarna degeneracija oligodendrocita gde metabolički poremećaj oligodendrocita ove ćelije čini osetljivim na toksično dejstvo inflamatornih medijatora. Kada je u pitanju oštećenje aksona u MS plakama, ono može da se dešava akutno u lezijama tokom aktivne faze mijelinske destrukcije pod delovanjem CD8<sup>+</sup> ćelija i makrofaga (Trapp, 1998; Ferguson, 1997). Akutno oštećenje aksona može da bude i nezavisno od demijelinizacije, uzrokovano neadekvatnim funkcionisanjem mitohondrija unutar samog aksona (Bitsch, 2000, Nikić, 2011). Pored gubitka aksona u aktivnim plakama postoji i nizak nivo kontinuiranog oštećenja aksona u hroničnim, neaktivnim demijelinišućim plakama, gde aksoni, usled gubitka trofičke podrške od strane oligodendrocita postaju osetljivi na oštećenja (Kornek, 2000). Bez obzira na način koji uzrokuje oštećenje finalni put je isti: promene u propustljivosti jonskih kanala remete homeostazu kalcijuma u aksonima, što dovodi do aktivacije kalcijum zavisnih proteaza, lokalne degradacije citoskeleta, blokade aksonskog transporta i konačno prekida aksona (LoPachin, 1997). Navedeni različiti oblici bolesti, kao i identifikovanje različitih patogenetskih mehanizama koji dovode do MS-a, otvaraju mogućnost da se MS ne posmatra kao jedan entitet, već kao skup različitih poremećaja.

## **1.2 Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis**

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) se primarno koristi kao animalni model autoimunskih inflamatornih bolesti CNS-a i sličan je MS-u u mnogim aspektima (Gold, 2006; Steinman i Zamvil, 2005; 2006; Farooqi, 2010). Zanimljivo je da se upotreba EAE-a značajno proširila van laboratorijskog proučavanja MS-a i razvoja terapeutika za ovu bolest, pa je EAE postao model za organ-specifične autoimunske bolesti uopšte. Međutim, kao i svi animalni modeli, EAE ima svoja ograničenja kada se ekstrapolira na humano oboljenje (Sriram i Steiner, 2005; Gold, 2006; Steinman i

Zamvil, 2006; Furlan, 2009, Farooqi, 2010). Razlike između miševa i pacova kojima je indukovana EAE i pacijenata obolelih od MS-a postoje na mnogo nivoa: imunološke razlike u urođenom i adaptivnom imunskom odgovoru reflektuju evolutivnu udaljenost ovih vrsta (Mestas, 2004); EAE modeli obuhvataju ograničen broj genetički visokosrodnih (inbrednih) vrsta koje se gaje u specifičnim uslovima bez izloženosti patogenima, pa samim tim njihov imunski sistem nije izložen sredinskim faktorima koji oblikuju humani imunski sistem (Adams, 2003); MS se kod ljudi razvija spontano dok EAE nastaje veštačkom indukcijom injektiranjem autoantigena i potentnog bakterijskog adjuvansa. Uprkos svim ograničenjima, EAE je najkorišćeniji model u proučavanju MS-a koji je doveo do značajnih otkrića kada je u pitanju patogeneza i terapija ove bolesti (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009).

### **1.2.2 Indukcija EAE-a kod laboratorijskih životinja**

EAE može da se indukuje u mnogim vrstama, pre svega u glodarima i majmunima. Može imati akutni monofazni, relapsno remitentni ili hronično progresivni tok u zavisnosti od soja eksperimentalnih životinja i imunizacionog protokola. Kod osetljivih ili podložnih sojeva životinja se može indukovati aktivno, imunizacijom, korišćenjem homogenata tkiva CNS-a, mijelina ili nekih od proteina mijelina, kao što su mijelin bazni protein (MBP), proteolipidni protein (PLP) ili mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG), ili peptida poreklom od ovih proteina. Imunizacija se postiže korišćenjem emulzije, koju pored antigena čini i adjuvans, koji sadrži bakterijske komponente sposobne da aktiviraju urođeni imunski odgovor i omogućе obradu i prezentaciju antigena (Libbey i Fujunami, 2010). Na ovaj način se dobija bolest sa visokom incidencijom kod podložnih životinja (Stromes i Goverman, 2006a). Bolest obično počinje između 9-12 dana nakon imunizacije i karakteriše se varijabilnim kliničkim ishodom i patološkim promenama u zavisnosti od soja životinja i načina imunizacije. Sa druge strane EAE može da se indukuje i pasivno, tzv. adoptivnim transferom. U ovom načinu indukcije se u singene primaoce ubrizgavaju patogene, CD4<sup>+</sup> T-ćelije specifične za antigene CNS-a koje su nastale aktivnom imunizacijom životinja donora (Stromes i Gouverman, 2006b).

Najčešće korišćen mišji model za proučavanje patogeneze bolesti i ispitivanje lekova je relapsno remitentni EAE indukovani PLP-om (139-151) u SJL mišjem soju i hronični

EAE indukovano MOG-om (35-55) u C57Bl/6. Sve su česći modeli koji se zasnivaju na genetički modifikovanim transgenim miševima. Jedan od najzanimljivijih su C57Bl/6 miševi koji imaju prekomerno eksprimiran TCR (od eng. T Cell Receptor) za MOG. Ovi miševi spontano razvijaju EAE koji ima sličnu patologiju sa MS-om, sa učestalošću koja zavisi od uslova u kojima se odgajaju životinje (Bettelli, 2006). Kada su u pitanju pacovski modeli, postoje neki koji pokazuju izuzetnu kliničku i patohistološku sličnost sa MS-om, kao što su MOG-om indukovani EAE kod Dark Agouti (DA) ili Brown Noway (BN) pacova (Storch, 2006; Weissert, 1998). Za rutinsko ispitivanje lekova se najčešće koristi monofazni EAE indukovano kod Lewis pacova. Oni su i najčešće upotrebljavani kao pasivni model EAE-a korišćenjem CD4<sup>+</sup> T-ćelija specifičnih za MBP za adoptivni transfer (Fluegel, 2001).

### **1.2.3 Ćelijske populacije odgovorne za nastanak bolesti**

Što se tiče ćelija koje su odgovorne za nastanak EAE-a, Th1 su dugo smatrane glavnom patogenom populacijom T-ćelija. Eksperimenti u kojima su miševi bez IL-12p40 subjediniče koja je potrebna za diferencijaciju Th1 bili rezistentni na razvoj EAE-a, ili činjenica da je tretman pacijenata obolelih od MS-a IFN- $\gamma$ , osnovnim citokinom koga sekretuju Th1, pogoršavao bolest (Panitch, 1987) govorili su u prilog ovom mišljenju. Međutim, usledili su eksperimenti u kojima su miševi bez IFN- $\gamma$  ili STAT1 (ključni transkripcioni faktor za razvoj Th1) razvijali teži oblik EAE-a (Ferber, 1996; Beteli, 2004). Nakon toga brojna istraživanja su počela da ističu centralnu ulogu Th17 ćelija u razvoju i patogenezi EAE-a. Ovo je potkrepljivano činjenicom da je primena neutrališućeg anti-IL-17 antitela smanjila težinu bolesti (Langrish, 2005). Slično, neutralizacija IL-17 tokom bolesti je umereno smanjila kliničke simptome (Hofsetter, 2005). Postoje kontradiktorni podaci o važnosti IL-17 i drugih citokina koje sekretuju Th17, ali je opšte mišljenje da IL-17 familija citokina ima jasnu patogenu ulogu u EAE-u. Iako su najranije studije o Th17 umanjile ulogu Th1, skorašnja istraživanja govore u prilog tome da obe populacije ćelija imaju ulogu u patogenezi EAE-a, ali da postoji mogućnost da daju različite forme bolesti (El-behi, 2010; Petermann i Korn, 2011). Postoje i T-ćelije koje produkuju oba citokina, IL-17 i IFN- $\gamma$  i eksprimiraju Tbet i ROR $\gamma$ t transkripcione faktore koje bivaju regrutovane u CNS tokom EAE-a (Abromson-Leeman, 2009). Takođe je pokazano da Th17 ćelije mogu da počnu da produkuju samo

IFN- $\gamma$  što ukazuje na plastičnost ovih ćelijskih populacija (Abromson-Leeman, 2009; Shi, 2008). Predloženo je da ekspresija Tbet u T ćelijama, pre nego njihov citokinski profil, definiše encefalitogenost T-ćelija (Yang, 2009), jer je njegova inhibicija dovela do poboljšanja EAE-a inhibirajući kako Th1 tako i Th17 subpopulacije ćelija (Gocke, 2007).

Postoje studije koje pokazuju da i CD8<sup>+</sup> ćelije mogu biti patogene u EAE-u (Weiss, 2007). Međutim postoje i dokazi za regulatornu ulogu ovih ćelija u EAE-u. Tako je pokazano da je EAE teži kod miševa deficitarnih u CD8<sup>+</sup> ćelijama kao i da CD8<sup>+</sup> ćelije suprimiraju EAE kod miševa (Chen, 2009). Iako je pokazana i patogena uloga  $\gamma\delta$  T-ćelija u EAE-u, pre svega rano tokom bolesti, postoje podaci o regulatornoj ulozi ovih ćelija tokom povlačenja bolesti (Ponomarev, 2005; 2004; Sutton, 2009).

Kada su u pitanju Treg ćelije, pokazano je da transfer CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-ćelija smanjuje težinu bolesti (Kohm, 2002), kao i da podložnost različitih mišjih modela razvoju bolesti negativno koreliše sa frekvencijom Treg (Reddy, 2004). Pored uticaja na podložnost domaćina razvoju bolesti, Treg imaju ulogu i u oporavku. Naime, pokazano je da se u fazi oporavka Treg nakupljaju u CNS-u kao i da njihova deplecija inhibira oporavak (Korn, 2007; Liu, 2006; McGeachy, 2005). Dakle, autoimunska inflamacija zavisi od finog balansa između regulatornog i inflamatornog odgovora, tako da tokom početka i pika bolesti dominira inflamatorni odgovor, dok u fazi oporavka prevagu dobija regulatorni odgovor.

#### **1.2.4 Patogeneza bolesti**

Nakon imunizacije, CD4<sup>+</sup> T-ćelije specifične za antigen CNS-a proliferišu i bivaju podvrgnute diferencijaciji izazvanoj antigenom drenirajućem limfnom čvoru, pa nastaju Th1 i Th17 ćelije (Targoni, 2001). Dok se njihov broj uvećava u drenirajućem limfnom čvoru inicijalno aktivirani neuroantigen-specifični T-limfociti počinju da se šire po celom organizmu i dostižu visok broj čak i na irelevantnim mestima kao što je peritonealna šupljina (Targoni, 2001). Kao deo ovog nasumičnog migriranja, mali broj neuroantigen-specifičnih T-ćelija odlazi u CNS, gde kao i druge aktivirane T-ćelije ima sposobnost da prođe kroz krvno-moždanu barijeru i uđe u perivaskularni prostor (Hickey, 1991). Ovde dolazi do prezentacije antigena od strane rezidentnih ćelija CNS-a ili od antigen prezentujućih ćelija koje migriraju u CNS. Ovo mogu biti

makrofagi/mikroglija ili u određenim slučajevima dendritske ćelije i astrociti. Nakon susreta sa antigenom autoreaktivne T-ćelije bivaju reaktivirane, počinju da proizvode odgovarajuće citokine i na taj način aktiviraju lokalne ćelije, povećavaju propustljivost krvno-moždane barijere i dalje privlače inflamatorne ćelije u CNS. Na ovaj način nastaje perivaskularni infiltrat. Iz perivaskularnog prostora T-ćelije mogu da uđu u parenhim gde, pošto je ova migracija jednosmerna, najčešće podležu apoptotskoj smrti (Bauer, 1998). Vremenom, kako T-ćelije umiru u parenhimu, periferni pul neuroantigen-specifičnih ćelija se smanjuje pa efektorske ćelije prvog talasa (one koje su inicijalno aktivirane perifernom imunizacijom) bivaju istrošene (Targoni, 2001; Kuerten, 2010). Međutim, i naivne T-ćelije takođe mogu biti regrutovane u perivaskularni prostor uključujući i neuroantigen-specifične T-ćelije koje nemaju veze sa antigenom korišćenim za prvobitnu imunizaciju (npr PLP reaktivne T-ćelije nakon što je EAE indukovano MBP-om). Ove naivne ćelije će takođe susresti endogeni neuroantigen i biće uključene u imunski odgovor. Ovo dovodi do amplifikacije reakcije, tzv epitopskog širenja (Lehmann, 1992; McRae, 1995) i do stvaranja efektorskih ćelija drugog talasa.

Što se tiče drugih ćelijskih populacija i njihove uloge u patogenezi, smatra se da aktivirani makrofagi indirektno ili direktno oštećuju CNS i da su oni odgovorni za fagocitovanje mijelina (Barnett, 2006). Komponente humoralnog imunskog odgovora i solubilni medijatori takođe doprinose patologiji preko aktivacije komplementa, direktne citotoksičnosti citokinima ili reaktivnim vrstama kiseonika i azota (Hemmer, 2006). Plazma ćelije proizvode antitela koja mogu da se vežu i aktiviraju komplement ili da indukuju antitelima uzrokovanu citotoksičnost. Th2 ćelije koje proizvode IL-4 mogu da povećaju produkciju antitela. Citotoksične CD8<sup>+</sup> T-ćelije mogu da povećaju oštećenja dalje proizvodeći citokine ili oslobađajući perforin i granzime tako direktno oštećujući akson (Fletcher, 2010).

Inicijalni T-ćelijski napad na CNS se samoograničava. Smanjenje autoimunskog odgovora ne rezultira iscrpljivanjem efekorskog pula. Naime, tokom oporavka broj neuroantigen specifičnih efektorskih T-ćelija u slezini i krvi nastavlja da bude visok i ove T-ćelije prisutne na periferiji zadržavaju svoj encefalitogeni potencijal (Targoni, 2001; Hofstetter, 2005b; Menezes, 2007). Moguće je da T-ćelije prelaze sa patogenog u protektivni fenotip, jer je poznato da Th17 ćelije mogu da postanu inducibilne T



regulatorne ćelije (Zhou, 2009). Druga mogućnost je da nakon inicijalne ekscitabilnosti od strane T-ćelija, makrofagi u CNS-u postanu rezistentni na stimulaciju odnosno da ne reaguju više na pro-inflamatorne citokine sekretovane od strane T-ćelija (Fujihara, 2003).

### **1.2.5 EAE kod AO i DA pacova**

AO (Albino Oxford)pacovi su inbredni soj koji je visoko rezistentan na razvoj EAE-a (Mostarica-Stojkovic, 1982). Ovi pacovi ne razvijaju bolest čak i u uslovima u kojima je moguće indukovati EAE kod drugih rezistentnih sojeva, kao prilikom korišćenja elementalnog gvožđa kao adjuvansa (Miljković, 2006a). Sa druge strane, DA pacovi mogu da razviju bolest sa kliničkim simptomima nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine čak i u odsustvu adjuvansa (Stošić-Grujičić, 2004).

AO i DA pacovi se razlikuju po perifernom imunskom odgovoru nakon imunizacije u cilju indukovanja EAE-a. Pokazano je da se u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova generiše veći broj ćelija, pre svega CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ove ćelije proizvode više pro-inflamatornih citokina za koje se zna da su od važnosti za patogenezu EAE-a ( IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-12, IL-23 i IL-6) u odnosu na iste ćelije AO soja (Vukmanović, 1989; 1990; Miljković, 2006b; Marković, 2009). Međutim, nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine AO pacovi razvijaju inflamatorne lezije u CNS-u bez vidljivih kliničkih simptoma (Vukmanović, 1989). Takođe, pokazano je da encefalitogene T ćelije F1 generacije dobijene ukrštanjem AO i DA pacova mogu da izazovu EAE kako u F1 hibridima, tako i u roditeljskom DA soju, ali ne i u AO roditeljskom soju (Mostarica-Stojković, 1992). Sve ovo je ukazalo da primećene razlike u reaktivnosti T-ćelija u drenirajućem limfnom čvoru nisu dovoljne da dovedu do rezistentnosti AO pacova, već da bi ćelije CNS-a mogle da doprinesu ovom fenomenu.

Zato su dalje razlike između AO i DA pacova posmatrane u okviru CNS-a, pa je pokazano da je broj ćelija koji infiltrira u CNS tokom razvoja EAE-a veći kod DA u odnosu na AO pacove (Miljković, 2011b). Ovo se pre svega odnosilo na CD4<sup>+</sup> ćelije, kojih ne samo da je bilo manje, već su bile i manje aktivirane kod AO pacova, a pokazan je i veći broj naivnih T-ćelija kod ovog soja. Takođe, ekspresija pro-inflamatornih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 u infiltratima kičmene moždine je bila značajno manja kod AO u poređenju sa DA pacovima. Međutim, kada su ćelije koje infiltriraju

CNS propagirane *in vitro*, nije bilo razlike u procentu ćelija koje proizvode navedene citokine između AO i DA pacova. Ovo je ukazalo da tkivo CNS-a ograničava autoimuni odgovor i utiče na rezistenciju AO pacova.

Kada je u pitanju tkivo CNS-a, hemokin CXCL12 se pokazao značajnim kao molekul sa potencijalno neuroprotektivnim funkcijama u pacovskom EAE-u (Momčilović, 2012). CXCL12 ima važnu ulogu u vaskularnom i nervnom razvoju, kao i u hematopoezi (Nagasawa, 1996), dok je njegova osnovna uloga u imunskom sistemu da reguliše kretanje i lokalizaciju mijeloidnih, limfoidnih i progenitorskih ćelija između CNS-a i perifernih tkiva (Nagasawa, 1998; Lapidot, 2005). Ekspimiran je u mnogim tkivima, dok su u CNS-u obolelih od MS-a njegovi osnovni producenti astrociti (Ambrosini, 2005). Vezuje za dva receptora, CXCR4 i CXCR7, koji su ekspimirani na T i B limfocitima, monocitima, endotelskim i dendritskim ćelijama i neuronima (Schonemeier, 2008; Infantino, 2006; Balabanian, 2005). CXCL12 je važan za preživljavanje i migraciju neurona i prekursora oligodendrocita (Li i Ransohoff, 2008), pa tako može da doprinese procesu remijelinizacije i neuroprotekcije u neuroinflamaciji. U našoj laboratoriji je pokazano da je ekspresija CXCL12 u CNS-u značajno manja kod DA u poređenju sa AO pacovima na piku EAE-a, dok je blokada dejstva ovog hemokina u AO pacovima dovela do prevazilaženja rezistentnosti ovih životinja na indukciju EAE-a (Miljković, 2011b). Dakle, ovaj molekul je važan za regulaciju inflamacije u CNS-u u EAE-u koji indukujemo u našoj laboratoriji.

## **1.3 IL-10**

### **1.3.1 Opšte odlike**

IL-10 pripada porodici citokina sa centralnom ulogom u zaštiti tkiva. Ovi citokini sprečavaju preterano oštećenje tkiva izazvano bakterijskim i virusnim infekcijama, kao i pro-inflamatorni odgovor (Ouyang, 2011). IL-10 indirektno inhibira razvoj i diferencijaciju T-ćelija, delujući na antigen prezentujuće ćelije (smanjujući ekspresiju MHCII, utičući na ekspresiju kostimulatora i redukujući produkciju citokina i hemokina) (Hedrich, 2010). Međutim, kod nekih ćelija, kao što su B limfociti, granulociti, mast ćelije i keratinociti, IL-10 podstiče proliferaciju i diferencijaciju.

Dalje, ovaj citokin aktivira NK ćelije i citotoksične CD8<sup>+</sup> T limfocite (Mocellin, 2003; Boulland, 1998; Hofmann, 2012). Pored IL-10, i TGF-β je regulatorni citokin sa plejotropnim funkcijama u imunskom sistemu. TGF-β produkuje skoro sve ćelije, pa miševi bez ovog citokina podležu multifokalnim inflamatornim bolestima posredovanim autoregulatornim T-limfocitima (Yaswen, 1996). Zbog svoje sveprisutnosti, smatra se da TGF-β konstantno prevenira nastanak i reaktivaciju autoreaktivnih ćelija (Germain, 2012). Njegova osnovna uloga je da obezbedi toleranciju T-ćelija na sopstvene antigene direktno utičući na diferencijaciju i homeostazu T-ćelija (Li i Flavell, 2008a). Indirektno, delujući na dendritske ćelije, on ograničava aktivaciju T-ćelija (Laouar, 2008). Zbog svega navedenog, smatra se da su IL-10 i TGF-β dva anti-inflamatorna citokina koja zajedno imaju veoma važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (Li i Flavell, 2008b). Prvobitno je IL-10 protein opisan kao inhibicioni faktor sinteze citokina (CSIF, od eng. Cytokine Synthesis Inhibitory Factor) koga sintetizuju Th2 ćelije, zato što inhibira produkciju mnogih citokina, npr IFN-γ (Fiorentino, 1989). Kasnije je pokazano da IL-10 produkuje skoro sve ćelije kako urođenog tako i adaptivnog imuniteta, uključujući dendritske ćelije, makrofage, mast ćelije, ćelije prirodne ubice, eozinofile, neutrofile, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-ćelije kao i B-ćelije (Moore, 2001; O' Garra, 2007; Trinchieri, 2007; Roncarolo, 2008; Maynard, 2008; Maloy, 2001; Saraiva, 2010; Lampropoulou, 2010). Zanimljivo je da ga mogu proizvoditi svi T-ćelijski subtipovi, uključujući Th1, Th2, Th9 i Th17 efektorske ćelije, kao i regulatorne T-ćelije i CD8<sup>+</sup> T-limfocite. U CNS-u ga produkuju astrociti i mikroglia (Cannella, 1995).

Zreli humani i mišji IL-10 ima 160 amino kiselina i formira nekovalentno povezan homodimer. Vezuje se za dva receptorna lanca, IL-10R1 i IL-10R2 i angažovanje oba lanca je potrebno za sprovođenje signala (Ouyang, 2011). Monomer IL-10 se sastoji od 6 α heliksa koji povezuju petlje (Pestka, 2004). Aktivira Jak-STAT signalni put. Jak1 i Tyk2 kinaze su asociirane sa IL-10R1, odnosno IL-10R2 (Ho, 1995; Finbloom, 1995). IL-10 aktivira STAT1, STAT3 i ponekad STAT5, ali je STAT3 najvažniji za sprovođenje funkcije IL-10 u imunskim ćelijama (Meraz, 1996; Takeda, 1999). Supresivna uloga IL-10 na produkciju pro-inflamatornih citokina je u potpunosti ukinuta u makrofagima i neutrofilima koji nemaju STAT3 (Takeda, 1999).

IL-10 se generalno smatra supresivnim, anti-inflamatornim citokinom. On inhibira pro-inflamatorni odgovor od strane urođenog i adaptivnog imuniteta i sprečava lezije u

tkivima izazvane preteranim imunskim odgovorom. On je centralni citokin u fazi rezolucije inflamacije (Merge, 2006; Filippi, 2008), pa blokiranje IL-10 kod miševa dovodi do spontanog razvoja inflamatorne bolesti creva. Upravo tu osobinu suprimiranja inflamatornog odgovora koriste patogeni tokom uspostavljanja hronične infekcije domaćina (Ouyang, 2011), pa se povećana ekspresija IL-10 povezuje sa mnogim hroničnim bakterijskim i virusnim bolestima. Sekretija IL-10 od strane Th1 ćelija predstavlja potentnu autoregulatornu povratnu spregu koja štiti od preterane inflamacije i oštećenja tkiva do koga dovodi pro-inflamatorni Th1 odgovor. Međutim, i ovaj mehanizam je iskorišćen od strane patogena kako bi se izbegla njihova eliminacija, dovodeći do hronične infekcije (O’Gara, 2007; Trinchieri, 2007; Gabrisova, 2009). Zato se blokiranje IL-10 smatra terapijskim pristupom za lečenje određenih hroničnih oboljenja.

Sa druge strane, IL-10 se povezuje sa mnogim autoimunskim oboljenjima zbog svojih anti- inflamatornih funkcija (Asadullah, 2003). Smatra se da ima protektivnu ulogu kada je razvoj inflamatorne bolesti creva u pitanju (Baat, 2003), kao i u slučaju reumatoidnog artritisa (Alanara, 2010; Kragstrup, 2008). Međutim obrnuta situacija je u slučaju lupusa, gde je serumski nivo IL-10 povišen kod obolelih. Kako IL-10 ima ulogu u stimulaciji B-ćelijske proliferacije i diferencijacije, a lupus je posredovan antitelima produkovanim od strane B-ćelija, antagonisti IL-10 se uzimaju u obzir kao mogući tretman ove bolesti (Ouyang, 2011).

### **1.3.2 IL-10 u MS-u i EAE-u**

Kada je u pitanju uloga IL-10 u MS-u odnosno EAE-u, pokazano je da je IL-10 regulatorni citokin koji se povezuje sa remisijom bolesti (Kennedy, 1992; Balashov, 2000). Tako je ekspanzija ćelija koje proizvode IL-10 pronađena u CNS-u tokom remisije EAE-a i MS-a (Kennedy, 1992; Khoury, 1992; Issazadah, 1995). Smanjena produkcija IL-10 je primećena pre relapsa bolesti u hroničnom remitentnom EAE-u (Issazadeh, 1996) i MS-u (Salmagi, 1996; Waubant, 2001; van Boxel-Dezaire, 1999), dok je povećana produkcija IL-10 korelirala sa remisijom, sugerišući da bi endogeni IL-10 mogao da reguliše ciklus bolesti. Kod obolelih od sekundarnog progresivnog MS-a IL-10 nije uticao na produkciju pro-inflamatornih citokina (Balashov, 2000), a oboleli od ovog oblika MS-a su takođe imali i nizak nivo IL-10 iRNK (informaciona

ribonukleinska kiselina), u poređenju sa obolelim od relapsno remitentne bolesti i sa kontrolama (van Boxel-Dezaire, 1999). Ovi podaci sugerišu da tretman egzogenim IL-10 može da smanji rizik od progresije bolesti u težu formu MS-a kakva je sekundarno progresivna bolest. Takođe, povećan nivo IL-10 je pronađen kod obolelih od MS koji su uspešno primali terapiju IFN- $\beta$  sugerišući da bi jedan od mehanizama protekcije mogao da uključuje IL-10 (Porrini, 1999; Rudick, 1996; Chabot, 2000; Wang 2000; Byrnes, 2002; Tuohy, 2000).

Potvrdu da IL-10 reguliše autoimunost CNS-a su obezbedile studije u kojima je pokazano da neutralizacija endogenog IL-10 povećava težinu bolesti i incidencu EAE-a (Crisi, 1995), kao i eksperimenti u kojima je bolest bila teža kod miševa bez IL-10 u odnosu na kontrolne miševe. (Bettelli, 1998; Samoilova, 1998; Segal, 1998). Takođe, transgeni miševi koji su ekspimirali humani IL-10 pod kontrolom MHCII promotora antigen-prezentujućih ćelija su bili potpuno rezistentni na indukciju EAE-a (Cua, 1999). U novije vreme je pokazano prisustvo regulatornih B-ćelija kod miševa i ljudi, koje proizvode IL-10 i u stanju su da suprimiraju EAE (Yoshizaki, 2012). Pokazano je i da IL-10<sup>+</sup> mikroglija može da indukuje antigen-specifične Treg ćelije, koje *in vitro* smanjuju proliferaciju efektorskih ćelija, a *in vivo* dovode do supresije EAE-a (Ebner, 2013). Takođe, neuronalne stem ćelije konstruisane tako da ekspimiraju IL-10 nakon intravenske primene kod miševa imunizovanih MOG (33-55) peptidom dovode do smanjenja EAE-a (Klose, 2013). Ovi podaci sugerišu da bi IL-10 mogao imati potencijalno terapeutsko dejstvo u tretmanu hronične inflamacije CNS-a.

Međutim, postoje i podaci koji ne podržavaju imunoprotektivnu ulogu IL-10. Intravenska primena IL-10 nije dovela do poboljšanja EAE-a kod miševa kako u modelu aktivne bolesti tako i u pasivnom EAE modelu (Santambrogio, 1995; Cannella, 1996). Intrakranijalna primena virusnog vektora sa IL-10 nije imala efekat na tok EAE-a kod miševa (Broberg, 2001). Takođe, u skorije vreme se pojavio podatak da su miševi bez IL-10R na T-ćelijama razvijali slabiji EAE nego miševi koji ekspimiraju ovaj receptor (Liu, 2012). Ovaj rad je sugerisao da IL-10 prilikom delovanja na T-ćelije povećava njihov autoimunski potencijal, ukazujući da efekat ovog citokina verovatno u mnogome zavisi od miljea u kome se ćelije nalaze, kao i od toga koje ćelije ga proizvode i na koje ćelije IL-10 deluje u datom kontekstu.

## 1.4 TNF

### 1.4.1 Opšte odlike

TNF je potentni pro-inflamatorni citokin koji pripada superfamiliji strukturno sličnih molekula koji su od ključnog značaja za veliki broj bioloških procesa u ćelijama sisara (Grewal, 2009). U imunskom odgovoru, TNF pokazuje mnoge bitne kako fiziološke tako i patološke aktivnosti. Dovodi do nekroze i apoptoze tumora, učestvuje u odbrani domaćina od bakterijskih i virusnih infekcija, predstavlja endogeni pirogen koji izaziva groznicu. On je ključni medijator akutne i hronične sistemske inflamatorne reakcije. Pored toga što može da uzrokuje sopstvenu sekreciju, TNF stimuliše sekreciju drugih pro-inflamatornih citokina i hemokina. Takođe ima ključnu patogenu ulogu u mnogim autoimunskim bolestima kao što su reumatoidni artritis, inflamatorna bolest creva, multipla skleroza i lupus (Wu, 2012).

TNF se sintetiše kao monomerni transmembranski protein (tmTNF) koji se inkorporira u membranu kao homotrimer. Ovde biva isečen od strane matriksne metaloproteinaze TACE (od eng. TNF Alpha Converting Enzyme) u solubilnu formu koja cirkuliše takođe kao trimer (sTNF). Obe forme TNF su biološki aktivne (Aggarwal, 2000a; Idriss, 2000, MacEwan, 2002) i proizvode ih razne imunske ćelije, pre svega aktivirani makrofagi, ali takođe i T- i B-limfociti, NK ćelije, dendritske ćelije i monociti. U CNS-u obe forme TNF mogu biti sintetisane od strane mikroglije, astrocita i nekih populacija neurona (Lieberman, 1989; Morganti-Kossmann, 1997; Chung, 2005). Balans između ove dve forme TNF je uslovljen tipom ćelije koja ga proizvodi, aktivacionim statusom te ćelije, aktivnošću TACE enzima i ekspresijom endogenih TACE inhibitora (Gearing, 1994; Smookler, 2006).

Postoje dva TNF receptora, TNFR1 i TNFR2. Oni su membranski glikoproteini koji specifično vezuju TNF, ali i homotrimere limfotoksina. Ovi receptori se razlikuju po svojim ekspresionim profilima, afinitetu za ligand, strukturi citoplazmatskog repa i aktivaciji nishodnih signalnih puteva (Aggarwal, 2000b). TNFR1 je eksprimiran na većini ćelija i može biti aktiviran vezivanjem kako tmTNF tako i sTNF, sa preferencom vezivanja sTNF, dok je TNFR2 eksprimiran na imunskim (uključujući i mikrogliju) i endotelskim ćelijama i aktiviran je uglavnom tmTNF (Grell, 1998; 1995). Zanimljivo je

da TACE može da iseče TNF receptor i napravi sTNFR koji može da veže sTNF u cirkulaciji i tako ograniči aktivnost TNF (Seckinger, 1989).

sTNF ostvaruje svoje biološke funkcije primarno aktivacijom TNFR1. Ovaj receptor aktivira NF $\kappa$ B signalni put koji dovodi do preživljavanja ćelija, ćelijske proliferacije i produkcije citokina. Takođe regrutuje i inhibitore apoptoze (cIAP1,2) i aktivira ERK, JNK, p38 i MAP kinaze (Shu, 1996; Lee, 2003; Winston, 1995; Schievella, 1997). Može dovesti i do apoptoze, ili neprekidnom aktivacijom JNK, ili aktivacijom Fas signalnog puta (Micheau, 2003; Schneider-Brachert, 2004). Angažovanje TNFR2 aktivira inflamatorne i signalne puteve za preživljavanje takođe aktivacijom NF $\kappa$ B signalnog puta (Rothe, 1994; 1995; Rao, 1995). TNFR2 može da promoviše prenos signala i preko TNFR1 povećavajući asocijaciju između sTNF i TNFR1 (Tartaglia, 1993).

Zanimljiv je fenomen reverznog prenosa signala posredovan tmTNF. Pokazano je da nakon vezivanja receptora, tmTNF može da inicira unutarćelijski prenos signala u ćeliji koja eksprimira tmTNF (Harashima, 2001; Higuchi, 1997), aktivacijom p38 i MAPK (Pocsik, 1995; Watts, 1999; Kirchner, 2004). Takođe, moguće je i da nakon otpuštanja sTNF unutarćelijski domen TNF bude otpušten u ćeliju i otpremljen u jedro, gde dovodi do povećanja produkcije pro-inflamatornih citokina (Domonkos, 2001; Fluhrer, 2006; Friedmann, 2006).

#### **1.4.2 TNF u MS-u i EAE-u**

Pokazano je da prenos signala posredovan TNF ima nekoliko važnih funkcija u CNS-u (Tansey, 2008), uključujući aktivaciju mikroglije i astrocita posredovanu povredom i regulaciju permeabiliteta krvno-moždane barijere (Selmaj, 1990; Merrill, 1991; Sedgwick, 2000). Povišen nivo TNF je primećen kod velikog broja neuroloških poremećaja uključujući ishemiju (Liu, 1994; Feuerstein, 1994), traumatsku povredu mozga (Goodman, 1990;), multiplu sklerozu (Hofman, 1989; Selmaj, 1991a; Sharief, 1991; Rieckman, 1995; Raine, 1998), Alchajmerovu i Parkinsonovu bolest (Fillit, 1991; Boka, 1994).

Kada je u pitanju MS, postoje brojni pokazatelji da TNF učestvuje u patogenezi ove bolesti. Autopsije pacijenata pokazuju povećan nivo TNF u aktivnim lezijama (Hofman, 1989); nivo TNF u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu pacijenata obolelih od MS-a je

povećan u odnosu na zdrave individue i pozitivno koreliše sa intenzitetom bolesti (Sharief, 1991; Beck, 1988; Maimone, 1991); mononuklearne ćelije periferne krvi obolelih pacijenata pokazuju veću sekreciju TNF neposredno pre pogoršanja simptoma u poređenju sa istim ćelijama pacijenata koji su u remisiji (Rieckmann, 1994; 1995). Što se EAE-a tiče pokazano je da prekomerna ekspresija TNF dovodi do demijelinizacije i da je neutralizacija TNF protektivna u mišjem modelu (Probert, 1995; Ruddle, 1990; Selmaj, 1991b; 1995a; 1995b). Međutim, da situacija nije baš ovako jednostavna, pokazala su klinička istraživanja u kojima je kod obolelih od MS-a koji su primali anti-TNF terapiju dolazilo do pogoršanja bolesti (Dendrou, 2013). Daljim istraživanjem pokazano je da je prenos signala preko TNFR1 odgovoran za demijelinizaciju, dok je prenos signala preko TNFR2 ključan za remijelinizaciju u kuprizonskom modelu MS-a. Pokazano je da odsustvo TNF dovodi do odložene remijelinizacije, deplecije progenitora oligodendrocita i smanjenja broja zrelih astrocita, a da je samo ekspresija TNFR2 dovoljna za očuvanje sposobnosti oligodendrocita za regeneraciju (Arnett, 2001). Transgeni animalni modeli u kojima je eksprimiran samo tmTNF pokazuju da tmTNF, u odsustvu sTNF, dovodi do suprimiranja početka i progresije EAE-a i dalje održavajući sposobnost TNF da suprimira autoimunost (Kassiotis, 1999a; 2001). Ova sposobnost tmTNF da održi imunske funkcije, kao što su tolerancija na sopstveno i otpornost na infekciju, a da ograniči druge funkcije TNF kao što su demijelinizacija i apoptoza oligodendrocita (Alexopoulou, 2006) otvara mogućnost selektivne inhibicije sTNF/TNFR1 signalnog puta kao strategije za prevenciju relapsno remitentne MS kod obolelih pacijenata. Tako je u skorije vreme pokazano da inhibicija sTNF dovodi do oporavka miševa od EAE-a promovajući remijelinizaciju i očuvanje aksona (Brambilla, 2011), kao i da blokada sTNF, ali ne i tmTNF, štiti miševе od razvoja kliničkih simptoma EAE-a (Taoufik, 2011). Još je pokazano da gen koji kodira TNFR1 predstavlja genetički rizik za razvoj MS-a. Rizični alel kodira protein koji nema transmembranski i citoplazmatski domen, ali može da veže TNF pa tako predstavlja njegov endogeni neutralizator koji može da dovede do progresije MS-a (Gregory, 2012). Takođe, pokazano je da intracelularna forma skraćenog proteina može da utiče na sprovođenje signala preko normalnog TNFR1 i da tako dovodi do predispozicije za MS (Ottoboni, 2013).



## **2.CILJEVI**

AO i DA pacovi se nalaze na suprotnim polovima podložnosti kada je indukovanje EAE-a u pitanju. Korišćenjem ovog modela sojnih razlika moguće je ispitati koji fenomeni leže u osnovi podložnosti, odnosno rezistentnosti na bolest i primeniti stečena znanja u rasvetljavanju mehanizama koji dovode do autoimunskih oboljenja kod ljudi. Sa druge strane, citokini su signalni molekuli koji imaju važnu ulogu u progresiji i regulaciji imunskog odgovora tokom EAE-a.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje doprinosa IL-10, tipičnog anti-inflamatornog i TNF, tipičnog pro-inflamatornog citokina podložnosti, odnosno rezistenciji na indukciju autoimunske neuroinflamacije korišćenjem AO/DA modela. Kako bi se sproveo ovaj opšti cilj, postavljeni su sledeći specifični ciljevi:

- Određivanje nivoa ekspresije i produkcije IL-10 i TNF u perifernim limfnim organima imunizovanih AO i DA pacova u induktivnoj fazi bolesti;
- Određivanje nivoa ekspresije i produkcije IL-10 i TNF u centralnom nervnom sistemu (homogenati i infiltrati kičmene moždine) imunizovanih AO i DA pacova u različitim kliničkim fazama bolesti;
- Određivanje nivoa ekspresije TGF- $\beta$  u centralnom nervnom sistemu (homogenati i infiltrati kičmene moždine) imunizovanih AO i DA pacova u različitim kliničkim fazama bolesti;
- Ispitivanje uticaja sintetičkog glukokortikoida metilprednizolona na ekspresiju IL-10 i TNF u homogenatima i infiltratima kičmene moždine imunizovanih DA pacova, kao i njegovog uticaja na ekspresiju IL-10 i TNF u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita;
- Ispitivanje uticaja neselektivnog inhibitora TNF etanercepta na klinički tok EAE-a kod imunizovanih AO i DA pacova;
- Ispitivanje uticaja IL-10 i TNF na ekspresiju CXCL12 u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita.

# **3.MATERIJAL I**

## **METODE**

### 3.1 Eksperimentalne životinje

U ovom istraživanju su korišćene ženke pacova genetski visokosrodnih sojeva Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO), starosti od 2 do 4 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (Odluka br. 2-22/10).

#### 3.1.2 Indukovanje EAE-a

Za indukciju aktivnog EAE-a je korišćen MBP (100 µg/pacovu, poklon profesora Aleksandra Flugela, Univerzitet u Getingenu, Nemačka) ili homogenat kičmene moždine pacova (SCH, od eng. Spinal Cord Homogenate). SCH je pripremljen homogenizovanjem tkiva kičmene moždine uz dodavanje fiziološkog rastvora sa fosfatnim puferom (PBS, od eng. Phosphate Buffer Saline) u odnosu 1 g tkiva prema 1 ml PBS-a. Kao adjuvans korišćen je kompletni Frojndov adjuvans (CFA, od eng. Complete Freund's Adjuvans, Difco Laboratories, SAD). Emulzija za imunizaciju je pravljena mešanjem jednakih zapremina MBP ili SCH sa CFA. Životinje su imunizovane intradermalnim injektiranjem po 100 µl emulzije u obe zadnje šape.

#### 3.1.3 Procena kliničke slike

Životinje su posmatrane svakodnevno kako bi se utvrdili znaci EAE-a, a ocene su dobijali prema sledećim kriterijumima: 0- bez kliničkih simptoma; 1-atonija repa, 2- pareza zadnjih ekstremiteta, 3-paraliza zadnjih ekstremiteta, 4-moribundno stanje ili smrt. Životinje su žrtvovane ugljen-dioksidom u različitim vremenskim tačkama, odnosno danima posle imunizacije (d.p.i.). Drenirajući limfni čvorovi su vađeni u induktivnoj fazi bolesti (6 d.p.i.). Kičmene moždine su vađene u fazi početka (9-11 d.p.i., ocena 1), pika (12-14 d.p.i., ocena 2-3) ili fazi oporavka (18-22 d.p.i., ocena 1 ili manje) EAE-a kod DA pacova. Pre vađenja kičmenih moždina pacovi su perfundovani fizioloskim rastvorom u cilju eliminisanja ćelija krvi iz kičmene moždine.

### 3.1.4 *In vivo* tretman životinja metilprednizolonom

Počevši od dana pojave prvih kliničkih simptoma, DA pacovi imunizovani sa SCH+CFA su intraperitonealno tretirani sintetičkim glukokortikoidom metilprednizolonom (MP, 50 mg/kg pacova) (Hemofarm, Srbija) ili PBS-om 3 dana uzastopno. Pacovi su žrtvovani 3 sata nakon poslednjeg tretmana.

### 3.1.5 *In vivo* tretman životinja etanerceptom

Počevši od 9. dana nakon imunizacije SCH+CFA, AO i DA pacovi su tretirani etanerceptom (10 mg/kg pacova) (Pfizer, SAD) ili vodom subkutano. Etanercept je fuzioni protein koji inhibira TNF vezujući kako sTNF tako i tmTNF. Ovakav tretman je ponovljen 12. i 15. dana nakon imunizacije. Životinje su posmatrane svakodnevno tokom 22 dana radi utvrđivanja kliničke slike.

## 3.2 Priprema ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija

### 3.2.1 Medijumi za pripremu i kultivisanje ćelija

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 (PAA Laboratories, Austrija) u koji su dodavane sledeće supstance: 50  $\mu$ M 2-merkaptoetanol (Fluka, Nemačka), antibiotici penicilin i streptamicin (PAA Laboratories) i antimikotik nistatin (Galenika, Srbija). Fetalni teleći serum (FCS, od eng. Fetal Calf Serum, PAA Laboratories) koji je prethodno inkubiran 30 minuta na 56 °C u cilju inaktivisanja komponenti komplekta, je dodavan medijumu u koncentraciji od 5 % ili 10 % za kultivisanje ćelija. U slučaju stimulacije ćelija MBP-om korišćen je medijum sa 2 % pacovskog seruma (RS, od eng. Rat Serum) obzirom da bi FCS, koji je poreklom iz druge životinjske vrste, mogao da stimuliše produkciju citokina i tako maskira efekat MBP-a. Za kultivisanje astrocita korišćen je medijum koji je dodatno suplementiran sa 4 g/l glukoze.

### 3.2.2 Izolovanje mononuklearnih ćelija periferne krvi

Krv je izvađena iz srca pacova špricom od 5 ml koji je prethodno navlažen heparinom. 3 ml heparinizovane krvi nasloženo je na 3 ml medijuma za separaciju limfocita (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon centrifugiranja na 800 g u trajanju od 15 min izdvojen je prsten mononuklearnih ćelija periferne krvi. Ćelije su oprane 2 puta centrifugiranjem (750 g i 700 g 5min) u medijumu sa 5 % FCS, resuspendovane i brojane za dalje korišćenje.

### 3.2.3 Izolovanje ćelija drenirajućeg limfnog čvora

Poplitealni limfni čvorovi su sterilnim instrumentima vađeni i prenošeni u sterilne posude sa medijumom. Tkivo je homogenizovano protiskivanjem kroz metalnu mrežicu i potom filtrirano kroz sterilnu konusnu najlonsku mrežicu. Dobijena ćelijska suspenzija je centrifugirana (550 g, 5 min), a ćelije su resuspendovane u medijumu sa 5 % FCS i brojane.

### 3.2.4 Izolovanje homogenata kičmene moždine i ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu

U cilju eliminisanja ćelija krvi iz kičmene moždine pacovi su najpre perfundovani sterilnim fiziološkim rastvorom. Kičmene moždine su izolovane iz perfundovanih životinja sterilnim priborom i homogenizovane u 5 ml PBS-a protiskivanjem tkiva kroz metalne mrežice. Nakon centrifugiranja (100 g, 3 min) 50 µl homogenata je korišćeno za izolaciju RNK. Ostatak dobijene suspenzije je mešan sa 3 ml 30 % Perkola (Sigma-Aldrich) i naslojen na 3 ml 70 % Perkola. Ovaj gradijent je centrifugiran 50 minuta na 870 g. Nakon centrifugiranja se mogao uočiti beli prsten mononuklearnih ćelija kičmene moždine koji se nalazio na granici dva sloja. Interfazni prsten je pažljivo sakupljan i dva puta pran centrifugiranjem (850 g, 10 min) od ostataka Perkola u medijumu sa 5% FCS. Nakon toga su ćelije brojane za dalju upotrebu. Alternativno, homogenati kičmene moždine su centrifugirani na 12000 g, 20 min na 4 °C nakon čega su sakuljeni supernatanti korišćeni za detekciju TNF.

### 3.2.5 Prečišćavanje CD4<sup>+</sup> ćelija magnetnom separacijom

CD4<sup>+</sup> ćelije pacova su prečišćene iz ćelija drenirajućeg limfnog čvora ili iz ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu. U oba slučaja, nakon dobijanja ćelijske suspenzije, ćelije su resuspendovane u hladnom puferu za obeležavanje ćelija (PBS+3 % FCS) u koji je dodato CD4<sup>+</sup> antitelo konjugovano sa biotinom (eBioscience, SAD). Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 1 h ćelije su centrifugirane (2000 g, 3 min) i oprane u PBS-u, a zatim su resuspendovane u rastvoru za vezivanje magnetnih kuglica (PBS+0.5 % BSA+2 mM EDTA). Dodate su magnetne kuglice obeležene streptavidinom (BD Bioscience, SAD) i ćelije su inkubirane sat vremena na 4 °C. Nakon inkubacije ćelije su stavljene u magnetno polje kako bi se izdvojile obeležene ćelije. Čistoća ćelija je proverena na protočnom citofluorimetru (> 97 %).

### 3.2.6 Izolovanje astrocita i uspostavljanje primarne ćelijske kulture

Za izolovanje astrocita korišćeni su mozgovipacovastarih 1-3 dana. Mozak je mehanički ustinjavan makazama u 5 ml medijuma. Usitnjeno tkivo je propuštano kroz špric, a zatim kroz iglu prečnika 21G. Ovako dobijena suspenzija je kultivisana u flaskovima od 25 cm<sup>3</sup>. U narednih 21 dan ćelije su prošle kroz 3 „pasaža“, odnosno tretmana tripsinom (Sigma-Aldrich, 0.25 % tripsin i 0.02 % EDTA u PBS-u,) u cilju odlepljivanja ćelije od plastične podloge flaska i ponovne adhezije), kako bi se dobila čista astrocitna populacija. Čistoća ovih ćelija je proveravana na protočnom citofluorimetru bojenjem na GFAP (od eng. Glial Fibrillary Acidic Protein) i CD11b (> 95 % GFAP pozitivne, < 3 % CD11b pozitivne) U svim koracima su korišćeni sterilni rastvori i pribor.

### 3.2.7 Priprema ConA supernatanta

Slezine su izolovane iz zdravih pacova. Tkivo je homogenizovano u PBS-u protiskivanjem kroz metalne mrežice i potom filtrirano kroz konusne najlonske mrežice. Dobijena ćelijska suspenzija je centrifugirana (550 g, 3 min). 5x10<sup>6</sup> ćelija je stimulisano konkanavalinom A (ConA, Sigma-Aldrich) u koncentraciji 5mg/ml. Nakon kultivacije od 48h pokupljeni su supernatanti koji su, s obzirom da sadrže različite citokine korišćeni za stimulaciju drugih ćelija (ConASn).

### 3.2.8 Određivanje broja ćelija

Iz ćelijskih suspenzija dobijenih iz životinja, deo ćelija je resuspendovan u PBS-u sa 0,1 % tripan-plavog (BDSL, V. Britanija) i broj ćelija je određivan brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk, pri čemu mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušene građe membrane) nisu brojane. Potom su ćelijske suspenzije podešavane do željene gustine za odgovarajući eksperiment.

### 3.2.9 Ćelijske kulture

Sve ćelije su kultivisane u pločama za kultivaciju (Sarstedt, Nemačka) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom (Cole Parmer, SAD), na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5 %. Način stimulacije ćelija je varirao u zavisnosti od eksperimenta. Za merenje produkcije citokina, ćelije drenirajućeg limfnog čvora su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 24 bazenčića (2,5 x 10<sup>6</sup>/1000 µl/bazenčić) tokom 24 h u prisustvu 10 µg/ml MBP-a. Ćelije infiltrata kičmene moždine su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 96 bazenčića (5 x 10<sup>5</sup>/ 200 µl/bazenčić) tokom 24 h. CD4<sup>+</sup> ćelije iz drenirajućeg limfnog čvora su kultivisane u pločama za kultivaciju sa 24 bazenčića (6 x 10<sup>5</sup>/ 650 µl/bazenčić) u prisustvu 10 µg/ml MBP-a tokom 24 h. Astrociti su kultivisani u pločama za kultivaciju sa 24 bazenčića (1.5 x 10<sup>5</sup>/1000 µl/bazenčić), a zatim su stimulisani sa ConASn (20 %) ili sa citokinima IL-10 (20 ng/ml, Peprotech, SAD), TNF (10 ng/ml, Peprotech, SAD), IFN-γ (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, SAD), IL-17 (50 ng/ml, R&D Systems, SAD) ili tretirani neutrališućim antitelom za IL-10 (0.5 µg/ml, R&D Systems, SAD), MP-om (100 ng/ml) ili etanerceptom (250 ng/ml).

### 3.3 Određivanje nivoa ekspresije gena

Relativna ekspresija gena je određivana korišćenjem kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu „Real time“ PCR, (od eng. Polymerase Chain Reaction). Prethodno je iz ispitivanih ćelija izolovana RNK i reverznom transkripcijom prevođena u komplementarnu DNK (cDNK).



### 3.3.2 Izolacija RNK

Uzorci koji su sadržavali  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^6$  ispitivanih ćelija su prenošeni u epruvete od 2 ml (Sarstedt), centrifugirani (2000 g, 3 min) i po odstranjivanju medijuma su lizirani blagim pipetiranjem u 500  $\mu$ l reagensa za izolaciju RNK (Total RNA Isolation Kit, Metabion, Nemačka). U njih je dodavano 100  $\mu$ l hloroforma, a zatim su centrifugirani 20 minuta (12000 g, 4 °C). Nakon centrifugiranja i formiranja tri faze u epruveti, vodena faza koja sadrži izdvojenu RNK je prenošena u drugu epruvetu. RNK je precipitirana dodavanjem izopropanola u zapremini koja je bila jednaka zapremini prenete vodene faze (oko 300  $\mu$ l). Nakon blagog mešanja, epruvete su ostavljane 10 minuta na -20 °C nakon čega su centrifugirane 20 minuta (12000 g, 4 °C). Potom je istaložena RNK ispirana sa 1 ml 75 % etanola uz centrifugiranje u trajanju od 10 minuta (12000 g, 4 °C). Po završetku ispiranja i odstranjivanja etanola, precipitati su sušeni i rastvarani u 13  $\mu$ l DEPC (od eng. Diethylpyrocarbonate,) vode (Fermentas, Litvanija). Koncentracija izolovane RNK je određivana u uzorcima merenjem apsorpcije na 260 nm i poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu, odnosno ispitivan stepen njene čistoće na 280 nm talasne dužine na kojoj je maksimalna moć apsorpcije aromatičnih amino kiselina. (Odnos  $A_{260nm} / A_{280nm}$  između 1.7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu je korišćen spektrofotometar (GeneQuant pro, Amersham, SAD).

### 3.3.3 Reverzna transkripcija

Nakon izolacije i merenja, izolovana RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevođena u cDNK. Iz uzoraka je uzimana ona zapremina koja je sadržavala 2  $\mu$ g rastvorene RNK i dopunjavana je do 12  $\mu$ l DEPC vodom sa 1  $\mu$ l heksamernih prajmera nasumičnih sekvenci (Fermentas) i 1  $\mu$ l smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas) finalne koncentracije 1 mM za svaki dNTP. Po mešanju, rastvorena RNK je denaturisana na 70 °C 10 minuta, posle čega su uzorci stavljeni 2 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4  $\mu$ l 5 puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5 x reaction buffer, Fermentas) i 1  $\mu$ l (200 U) reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas). Uzorci su dopunjeni DEPC vodom do finalne zapremine od 20  $\mu$ l, inkubirani na 25 °C 15 minuta, a potom na 42 °C 60 minuta. Konačno, reakcija je

prekidana inkubacijom uzoraka na 70 °C, 10 minuta i 95 °C, 3 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na 4 °C do dalje upotrebe. Reakcija reverzne transkripcije je obavljena u epruvetama od 200 µl (Eppendorf, Nemačka), a inkubacija na različitim temperaturama je obavljena pomoću odgovarajućeg aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf). U cilju provere postojanja kontaminacije, u svakoj reakciji je korišćena i negativna kontrola koja je sadržavala sve reagense reakcione smeše osim RNK.

### 3.3.4 „Real Time“ RT PCR

Pripremljena cDNK je umnožena korišćenjem Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Miksa (Fermentas) u konačnoj zapremini od 20 µl. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bazenčića (MicroAmp<sup>TM</sup> Optical, Applied Biosystems, SAD) i u svaki od bazenčića je dodavano po 10 µl master miksa, po 2 µl specifičnih prajmera za gen od interesa odnosno za β-aktin (finalne koncentracije 100–900 nM), po 4 µl odgovarajućeg uzorka razblaženog 10 puta, a sve je do konačne zapremine dopunjeno vodom. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Buzenčići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1000 g, prenetu u termoblok aparata za „Real Time“ RT PCR (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije su bili sledeći: inicijalni korak od 5 minuta na 50 °C, praćen korakom od 10 minuta na 95 °C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95 °C i 1 minut na 60 °C. Prajmeri korišćeni u eksperimentima (Metabion) su dati u tabeli:

Gen	Prajmer
β-aktin	F 5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT-3' R 5'-CCA GCG CAG CGA TAT CG-3'
IFN-γ	F 5'-TGG CAT AGA TGT GGA AGA AAA GAG-3' R 5'-TGC AGG ATT TTC ATG TCA CCA T-3'
IL-17	F 5'-ATC AGG ACG CGC AAA CAT G-3' R 5'-TGA TCG CTG CTG CCT TCA C-3'

IL-10	F 5'-GAA GAC CCT CTG GAT ACA GCT GC-3' R 5'-TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT-3'
TGF- $\beta$	F 5'-CCC TGC CCC TAC ATT TGG A-3' R 5'-ACG GTG ATG CGG AAG CAC-3'
TNF	F 5'-TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC-3' R 5'-CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC -3'
CXCL12	F 5'-GAT TCT TTG AGA GCC ATG TC-3' R 5'-GTC TGT TGT TGC TTT TCA GC-3'

F – prajmer komplementaran kodirajućem (sense) lancu DNK

R – prajmer komplementaran nekodirajućem (antisense) lancu DNK

Akumulacija PCR produkata je detektovana u realnom vremenu, a rezultati su analizirani korišćenjem programa 7500 System Software (Applied Biosystems). Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin i iskazan kao  $2^{-dCt}$ , gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i endogene kontrole ( $\beta$ -actin).

### 3.4 Određivanje koncentracije citokina ELISA metodom

Koncentracija IL-10 i TNF u supernatantima različitih ćelijskih kultura je određivana ELISA (od eng. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) metodom. U tu svrhu korišćene su ploče za mikrotitraciju MaxiSorp (Nunc, Danska) i komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje odgovarajućih citokina (BD Bioscience). Supernatanti kultura su sakupljeni posle inkubacije od 24 h i odvajani od ćelija centrifugiranjem (2000 g, 3 min). Potom su zamrzavani i čuvani do analize. Sam postupak izvođenja ELISA metode je obavljan prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Tipičan protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa

primarnim antitelom (50 µl/bazenčić, preko noći na 4 °C ili sobnoj temperaturi), ispiranje PBS+0.01 % Tween (3 x, 300 µl/bazenčić), blokiranje PBS+10 %FCS (100 µl/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (3 x, 300 µl/bazenčić), inkubacija uzoraka (50 µl/bazenčić, 2 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (3 x, 300 µl/bazenčić), inkubacija sa sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (50 µl/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (3 x 300 µl/bazenčić), inkubacija sa avidin-enzimskim kompleksom (peroksidaza rena) (50 µl/bazenčić, 30 minuta na sobnoj temperaturi), ispiranje (3 x 300 µl/bazenčić), inkubacija sa supstratom (tetrametilbenzidin, TMB) (50 µl/bazenčić, do 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku), zaustavljanje reakcije sa 1 M HCl (50 µl/bazenčić) i očitavanje apsorbance pomoću spektrofotometra (Titertek, Nemačka) korišćenjem filtera za 450 nm. Koncentracija citokina je određivana korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbance za serijska razblaženja rekombinantnih citokina poznatih koncentracija.

### **3.5 Imunofluorescentno bojenje za detekciju unutarćelijskih citokina na protočnom citofluorimetru**

AO i DA pacovi imunizovani SCH+CFA emulzijom žrtvovani su na piku bolesti DA pacova kada su izolovane ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu.  $1 \times 10^6$  ćelija je rastvoreno u 500 µl medijuma kome su dodati PMA (od eng. Phorbol Myristate Acetate, 400 ng/ml) i jonomicin (800 ng/ml) za stimulaciju ćelija i brefeldin (1:1000) koji inhibira oslobađanje proteina iz ćelija. Uzorci su inkubirani 4 sata na 37 °C. Nakon inkubacije uzorci su prani u PBS-u (centrifuga 3 min, 800 g), a zatim su obojeni fluorescentnim anti-CD4 antitelom (anti-pacovsko, PE obeleženo, eBioscience, SAD; ili anti-pacovsko, PE-Cy5 obeleženo, BD Pharmingen, SAD) rastvorenim u 200 µl PBS+10 % RS u preporučenom razblaženju. Nakon toga su inkubirani 30 minuta na 4 °C. Zatim su ćelije oprane u PBS-u i fiksirane 2 % paraformaldehidom (Serva, Heidelberg, Nemačka) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su oprane od paraformaldehida PBS-om (centrifuga 3 min, 900 g) i držane na 4 °C do permeabilizacije. Za permeabilizaciju ćelija je korišćen pufer za permeabilizaciju (PB) koji se sastojao iz 2 % FCS, 0,01 % Triton i 2 % BSA rastvorenih u PBS-u, u kome su ćelije inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena ćelije su prane

u PB-u, nakon čega im je dodavano fluorescentno obeleženo antitelo za IL-10 (anti-pacovsko, PE obeleženo, BD Pharmingen) ili TNF (anti-mišje/pacovsko, PE-Cy7 obeleženo, eBioscience) rastvoreno u PB-u u preporučenom razblaženju. Alternativno, ćelijama je dodavano fluorescentno obeleženo antitelo irelevantne specifičnosti kao izotipska kontrola u istom razblaženju kao i specifično antitelo. Posle inkubacije od 45 minuta na 4 °C ćelije su prane još dva puta u PB-u i jednom u PBS-u, nakon čega su finalno resuspendovane u PBS-u i analizirane na protočnom citofluorimetru (FACS Calibur, Becton Dickinson, SAD).

### **3.6 Histološka analiza**

#### **3.6.1 Priprema tkiva za analizu**

Za histološku analizu korišćeni su DA pacovi imunizovani SCH+CFA emulzijom. Pacovi su žrtvovani na piku bolesti, izolovane su kičmene moždine i fiksirane u 4% paraformaldehidu rastvorenom u PBS-u preko noći na 4 °C. Nakon fiksacije, uzorci su držani po 24h u 10%, 20% i 30% rastvoru saharoze (LachNer, Neratovice, Češka) u PBS-u na 4 °C. Tkivo je zatim ukalupljeno korišćenjem medijuma za ukalupljivanje za sečenje na kriostatu (Killik, Milano, Italija). Poprečni preseki kičmene moždine debljine 10 µm dobijeni su sečenjem na kriostatu. Odmah nakon sečenja preseki su stavljeni na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, MA, SAD). Nakon toga uzorci su čuvani na -20 °C do upotrebe.

#### **3.6.2 Histološka analiza metodom imunoperoksidaze**

Preseci koji su prethodno nanešeni na predmetna stakla inkubirani su u rastvoru 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zorka, Šabac, Srbija) u metanolu (Zorka, Šabac, Srbija) 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se eliminisala aktivnost endogene peroksidaze. Sledilo je blokiranje uz pomoć 10 % pacovskog seruma u 2% BSA, 0.05% Triton X 100 u PBS-u u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su inkubirani preko noći na 4°C sa antitelima specifičnim za CXCL12; rabbit anti-rat CXCL12 (eBioscience ili Santa Cruz, San Diego, SAD). Primarna antitela su detektovana korišćenjem sekundarnog antitela konjugovanog sa biotinom; biotinylated goat anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, St.

Louis, SAD) inkubiranjem u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Sledilo je inkubiranje uzoraka sa ekstravidin-peroksidazom (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Nakon toga su uzorci inkubirani 1 minut sa supstratom 3,3'-diaminobenzidinom (Dako, Glostrup, Danska) na sobnoj temperaturi i na kraju bojeni hematoksilinom u trajanju od 1 minuta. Uzorci su zatim sprovedeni sukcesivno kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70%, 86% i 100%) i ksilol. Nakon toga su pokriveni pokrovnim staklom korišćenjem DPX-a (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Preseci su posmatrani i slikani na mikroskopu Axiovert 200M, korišćenjem softvera AxioVision 4.5 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

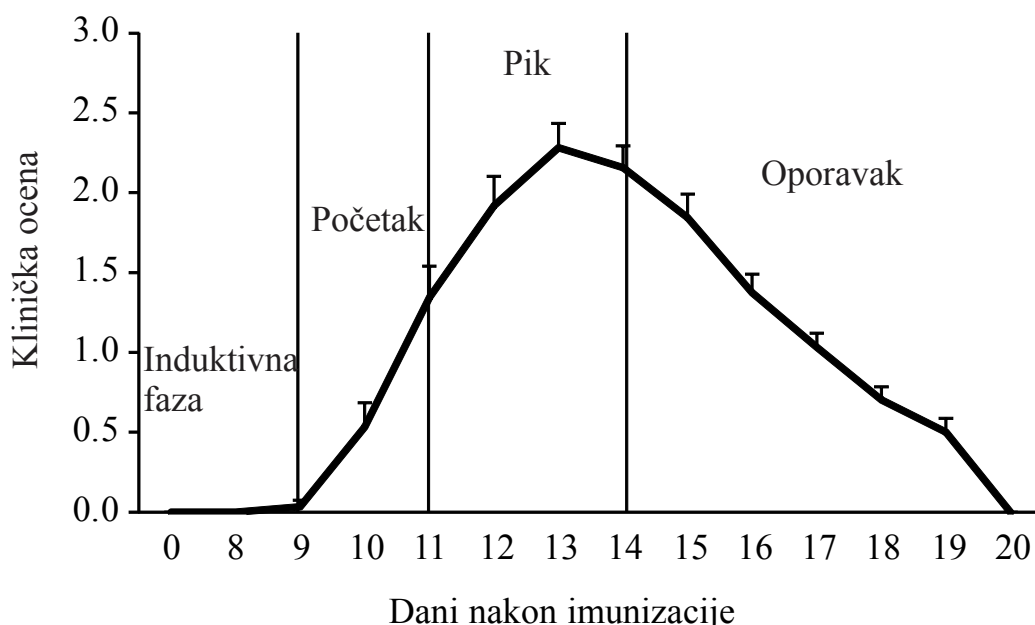
### **3.7 Statistička obrada podataka**

Rezultati dobijeni u više nezavisnih eksperimenata su predstavljeni kao srednje vrednosti (SV) + standardna devijacija (SD) ili SV +/- standardna greška (SE). Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti ekspresije gena i nivoa produkovanih citokina je korišćen Studentov *t*-test. Pirsonov test korelacije je korišćen za određivanje koeficijenta korelacije i statističke značajnosti korelacije ekspresije gena. Vrednost parametara *p* manja od 0.05 je smatrana statistički značajnom.

# **4.REZULTATI**

#### 4.1 Klinička slika EAE-a kod DA pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine i kompletnim Frojndovim adjuvansom

U cilju indukovanja aktivnog EAE-a ženke DA pacova starosti 2-4 meseca imunizovane su homogenatom kičmene moždine (SCH) emulgovanim u kompletnom Frojndovom adjuvansu (CFA). Imunizovane životinje su razvijale akutnu monofaznu bolest čiji su se prvi znaci obično javljali 9. dana nakon imunizacije. Period pre njihove pojave označen je kao induktivna faza bolesti, a ispoljavanje neuroloških poremećaja kao efektorska faza. U odnosu na kliničke manifestacije tok efektorske faze je podeljen na početak (9-11 dan nakon imunizacije), pik (11-14 dan nakon imunizacije) i oporavak (od 15. dana nakon imunizacije) (Slika 1). U narednim eksperimentima su izolovani organi iz životinja u na taj način definisanim vremenskim tačkama.

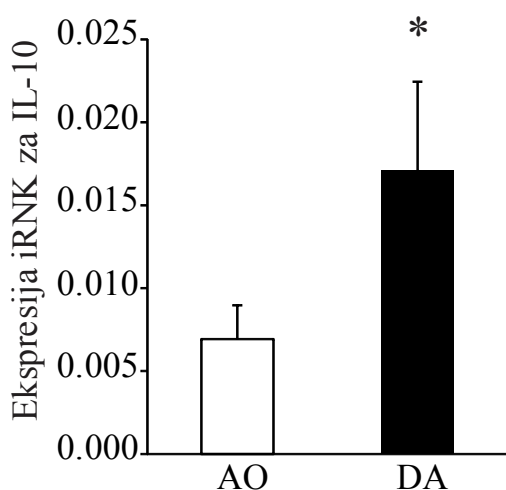


Slika 1: **Klinička slika EAE-a kod DA pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine.** Ženke DA pacova stare 2-4 meseca imunizovane su SCH+CFA emulzijom. Životinje su praćene svakodnevno tokom 20 dana. Kliničke ocene su date na sledeći način: 1-atonija repa, 2-pareza zadnjih ekstremiteta, 3-paraliza zadnjih ekstremiteta, 4-moribund. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna greška kliničke ocene 33 životinje.



## 4.2 Ekspresija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova

Nakon imunizacije životinja imunski odgovor započinje u limfnim organima koji dreniraju mesto unosa antigena. Kako su ovi limfni organi mesta gde T-limfociti prvi put susreću antigen, ekspresija citokina na nivou limfnog čvora koji drenira mesto imunizacije ukazuje na njegovu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora. Zato su pacovima imunizovanim MBP+CFA emulzijom u induktivnoj fazi (6.dana nakon imunizacije) vađeni poplitealni (drenirajući) limfni čvorovi i iz njih izolovane ćelije u kojima je ispitivana ekspresija IL-10 metodom „real time“ RT PCR. Pokazano je da je ekspresija iRNK za IL-10 statistički značajno veća kod DA u poređenju sa AO pacovima (Slika 2).

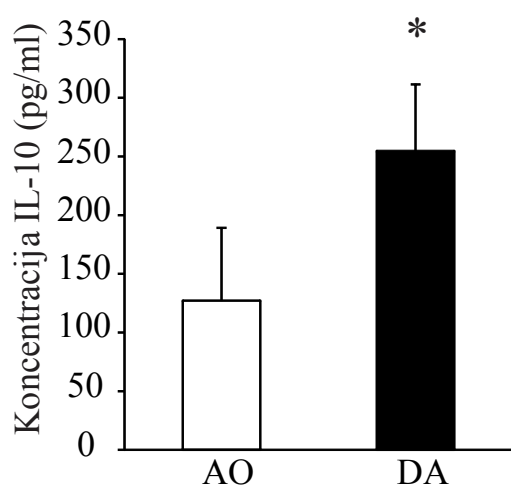


Slika 2: Ekspresija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova. Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je izolovana RNK nakon čega je merena njena ekspresija metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

## 4.3 Produkcija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova

Pošto je pokazano da postoji razlika u ekspresiji gena za IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru između pacova AO i DA soja bilo je potrebno ispitati da li se ta razlika odražava i

na produkciju citokina. Pacovima imunizovanim MBP+CFA emulzijom su vađeni poplitealni limfni čvorovi 6.dana nakon imunizacije. Koncentracija IL-10 je nakon *in vitro* restimulacije MBP-om merenametodom ELISA. Utvrđeno je da je produkcija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru statistički značajno veća kod DA u odnosu na AO pacove (Slika 3). Dakle, i ekspresija i produkcija IL-10 su veće u drenirajućem limfnom čvoru kod DA u odnosu na AO pacove.

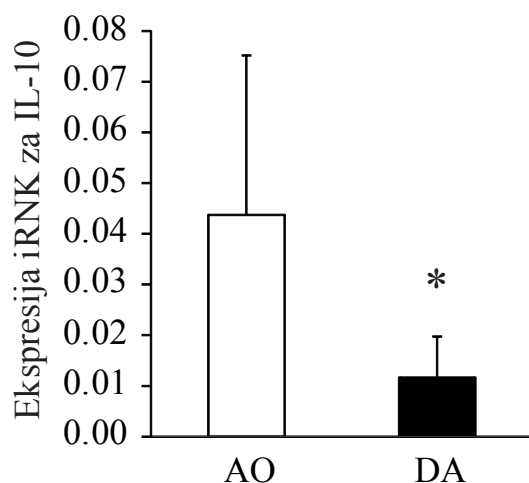


Slika 3: **Produkcija IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Čelije limfnog čvora su stimulisane MBP-om. Supernatanti su prikupljeni nakon 24h i izmerena je koncentracija proteina metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.4 Ekspresija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova

T-ćelije, i to prevashodno populacija CD4<sup>+</sup> T-ćelija, se smatraju osnovnom ćelijskom populacijom odgovornom za nastanak i patogenezu EAE-a (El-behi, 2010). Shodno tome, naš sledeći korak je bio određivanje ekspresije IL-10 u ovim ćelijama. Pacovi su imunizovani MBP+CFA emulzijom. Poplitealni limfni čvorovi su vađeni iz pacova 6. dana nakon imunizacije i iz njih su izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije metodom magnetne

separacije. Ekspresija iRNK je određivana „real time“ RT PCR metodom. Ustanovljeno je da je ekspresija iRNK za IL-10 u izolovanim CD4<sup>+</sup> ćelijama statistički značajno manja kod DA u poređenju sa AO pacovima (Slika 4). Dakle, ekspresija IL-10 u ovim ćelijama ne prati obrazac ekspresije primećen u poplitealnom limfnom čvoru kada je u pitanju poređenje AO i DA pacova.

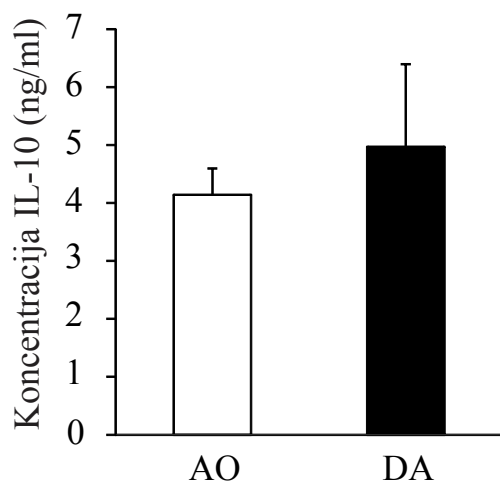


**Slika 4: Ekspresija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je prečišćena populacija CD4<sup>+</sup> ćelija iz kojih je izolovana RNK. Zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### **4.5 Produkcija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova**

Kako bi se utvrdilo da li produkcija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz poplitealnih limfnih čvorova prati relativnu gensku ekspresiju ovog citokina, ove ćelije su izolovane iz pacova imunizovanih MBP+CFA emulzijom 6. dana nakon imunizacije. CD4<sup>+</sup> ćelijama su restimulisane MBP-om i nakon 24h je merena koncentracija IL-10 u sakupljenim ćelijskim supernatantima metodom ELISA. Pokazano je da nema razlike u

produkciji IL-10 od strane CD4<sup>+</sup> ćelija izolovanih iz poplitealnih limfnih čvorova između AO i DA pacova (Slika 5).

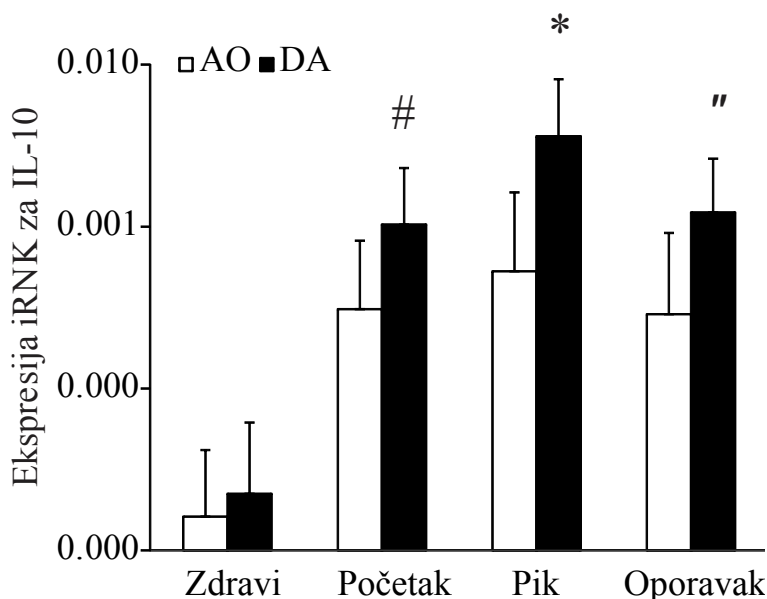


Slika 5: **Produkcija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je izolovana populacija CD4<sup>+</sup> ćelija koje su stimulisane MBP-om. Nakon 24h prikupljeni su supernatanti i izmerena je koncentracija proteina ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi.

#### 4.6 Ekspresija IL-10 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

EAE je bolest centralnog nervnog sistema. Zato je, kod proučavanja fenomena koji potencijalno dovode do razlika u podložnosti razvijanju ove bolesti kod dva soja, pored „dešavanja“ na periferiji, bitno utvrditi i šta se događa sa imunskim odgovorom u CNS-u. Zbog toga je u cilju daljeg poređenja AO i DA pacova sledeći korak bio utvrđivanje ekspresije IL-10 u homogenatima kičmene moždine ovih pacova. Životinje su imunizovane SCH+CFA emulzijom i žrtvovane u fazi početka, pika i oporavka kako bi se dobili homogenati. Takođe, da bi se poredile inherentne razlike između AO i DA životinja, korišćeni su i homogenati zdravih pacova. Ekspresija IL-10 je određivana „real time“ RT PCR metodom. Utvrđeno je da je ekspresija IL-10 kod imunizovanih pacova oba soja veća u poređenju sa zdravim kontrolnim životinjama, a da je kod imunizovanih

DA veća u odnosu na AO pacove u svim ispitivanim terminima, pri čemu je ova razlika statistički značajna samo na piku bolesti. Ekspresija IL-10 kod osetljivih DA pacova je statistički značajno rasla na početku bolesti, održavala se na piku, a zatim statistički značajno opadala u oporavku (Slika 6).

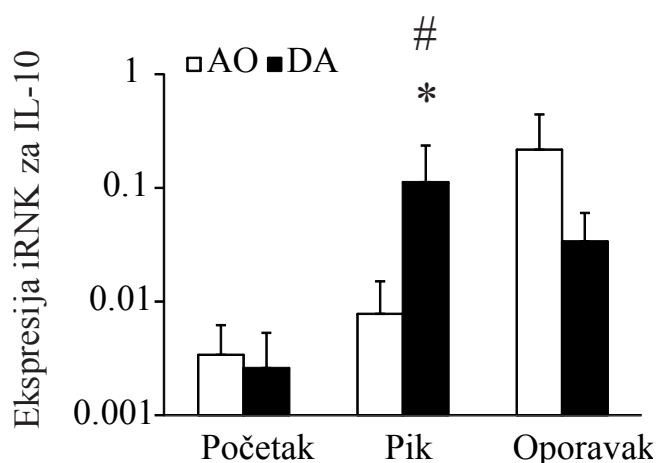


Slika 6: Ekspresija IL-10 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova. Kičmene moždine su vađene iz neimunizovanih (zdravih) i životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz homogenate je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani na logaritamskoj skali kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze početka i zdravih pacova unutar soja. '' $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze oporavka i faze pika unutar soja.

#### 4.7 Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

Homogenat kičmene moždine izolovani iz imunizovanih pacova sadrže kako imunske ćelije koje su infiltrirale u CNS (T-ćelije, makrofagi, B-ćelije, granulociti, NK, NKT ćelije) (Miljković, 2011a), tako i rezidentne ćelije CNS-a (neuroni i glijalne ćelije). Zato nas je dalje zanimalo da ekspresiju IL-10 ispitamo na populaciji ćelija koja infiltrira

centralni nervni sistem tokom razvoja EAE-a. U tom cilju, životinje su imunizovane SCH+CFA emulzijom, kičmene moždine su vađene u različitim fazama bolesti pa su iz njih izolovani infiltrati mononuklearnih ćelija (u daljem tekstu infiltrati). Ekspresija IL-10 je određivana „real time“ RT PCR metodom. Kao i u slučaju homogenata, pokazano je da je ekspresija IL-10 sa statistički značajnom razlikom veća kod DA u odnosu na AO pacove na piku bolesti. Za razliku od homogenata, ekspresija IL-10 kod DA pacova se povećavala na piku u odnosu na početak bolesti, dok se u oporavku smanjivala, ali bez statističke značajnosti (Slika 7).

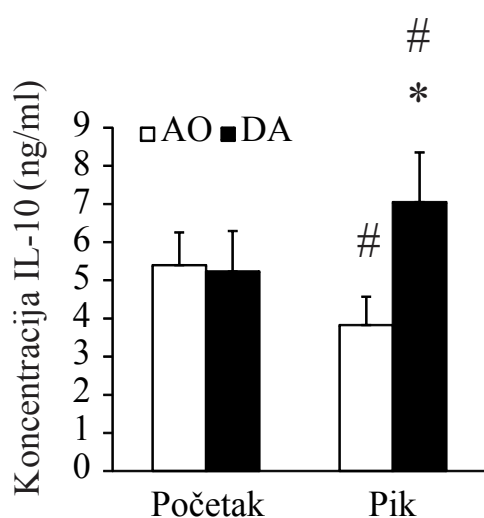


Slika 7: Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz njih su dobijeni infiltrati kičmene moždine iz kojih je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani na logaritamskoj skali kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze pika i faze početka unutar soja.

#### 4.8 Produkcija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

Kako smo utvrdili da postoji razlika na nivou ekspresije gena za IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova, sledeći korak je bio da se ispita da li ova razlika može da se uoči i na nivou produkcije citokina. Životinje su imunizovane SCH+CFA

emulzijom, žrtvovane u fazi početka i pika bolesti kada su izolovani infiltrati kičmene moždine. Infiltrati su gajeni u kulturi i nakon 24h je merena koncentracija IL-10 iz supernatanta metodom ELISA. Kao i u slučaju genske ekspresije, pokazano je da je produkcija IL-10 statistički značajno veća kod DA u odnosu na AO pacove na piku bolesti, dok razlike nema na početku EAE-a. Zanimljivo je da je produkcija IL-10 kod AO pacova opadala na piku u odnosu na početak bolesti, dok je kod DA pacova rasla (Slika 8).

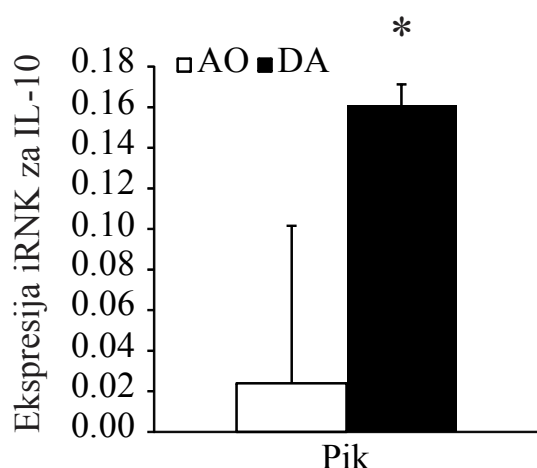


Slika 8: **Produkcija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine koji su gajeni u kulturi 24h. Nakon inkubacije sakupljeni su supernatanti i određivana je koncentracija citokina metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze pika i faze početka unutar soja.

#### 4.9 Ekspresija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova

Kako CD4<sup>+</sup> populacija T-limfocita predstavlja najbrojniju populaciju među ćelijama koje infiltriraju centralni nervni sistem tokom razvoja EAE-a, sledeći korak je bilo

utvrđivanje mogućih razlika na nivou ekspresije IL-10 u ovim ćelijama. Pacovi su imunizovani MBP+CFA emulzijom i žrtvovani u fazi pika bolesti. Iz kičmenih moždina su izolovani infiltrati, a iz njih CD4<sup>+</sup> ćelije metodom magnetne separacije. Genska ekspresija je određena „real time“ RT PCR metodom. Utvrđeno je da je ekspresija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine na piku bolestiveća kod DA u odnosu na AO pacove (Slika 9).



**Slika 9: Ekspresija IL-10 u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih MBP+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine na piku bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine iz kojih su izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije. Iz CD4<sup>+</sup> ćelija je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

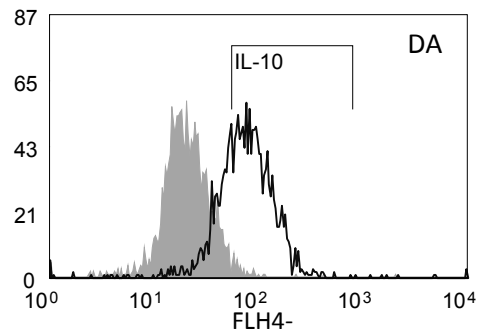
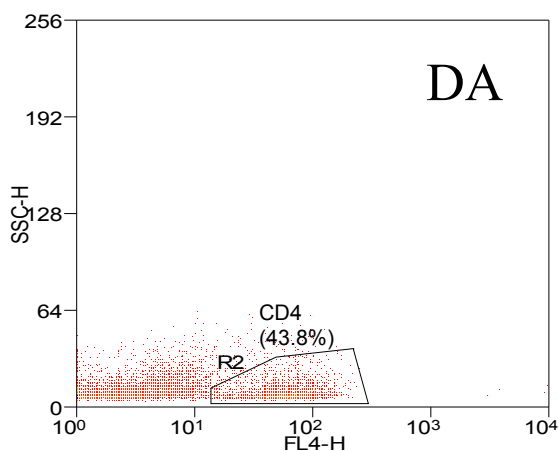
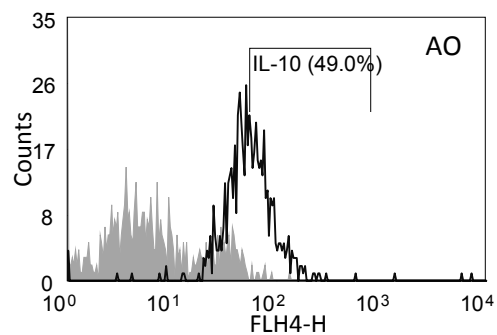
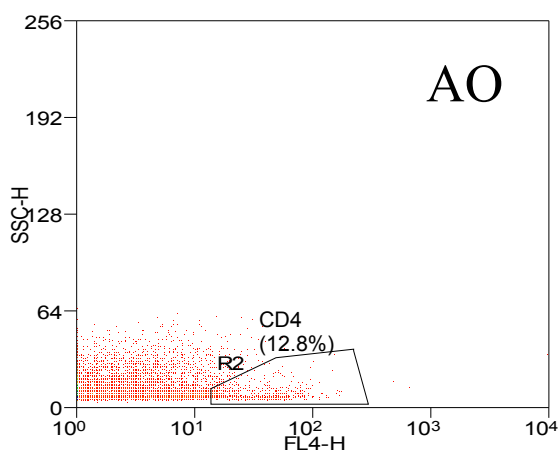
#### **4.10 Unutarćelijska produkcija IL-10 u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova**

Pošto je na nivou genske ekspresije pokazana razlika između CD4<sup>+</sup> ćelija izolovanih iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova, želeli smo da ispitamo unutarćelijsku produkciju IL-10 u ovim ćelijama. Pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom i žrtvovani u fazi pika bolesti. Iz kičmenih moždina su izolovani infiltrati, a zatim je primenjena metoda unutarćelijskog bojenja kojom su na protočnom citofluorimetru



utvrđeni procenti CD4<sup>+</sup> ćelija koje proizvode IL-10. Potvrđeno je da DA pacovi procentualno imaju više CD4<sup>+</sup> ćelija u infiltratima kičmene moždine na piku bolesti (Miljković, 2011b). Pokazano je da kod DA pacova ima više CD4<sup>+</sup> ćelija koje proizvode IL-10 (Slika 10).

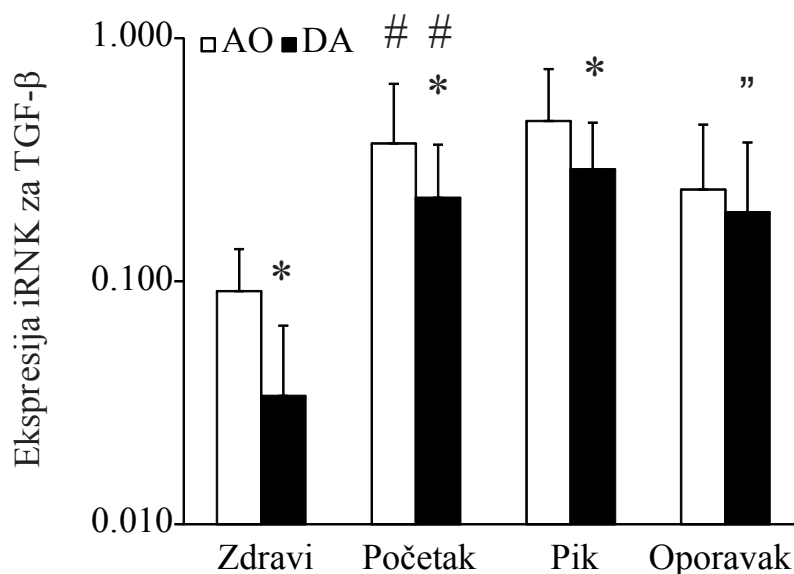
	<b>%CD4<sup>+</sup></b>	<b>IL-10%</b>	<b>IL-10 srednja vrednost intenziteta fluorescence</b>
<b>AO</b>	<b>10.4 +/- 6.5</b>	<b>40.5 +/- 13.1</b>	<b>20.0 +/- 3.5</b>
<b>DA</b>	<b>45.6 +/- 4.5*</b>	<b>76.9 +/- 17.4*</b>	<b>41.1 +/- 16.0*</b>



**Slika 10: Procenat CD4<sup>+</sup> i IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ćelija u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine na piku bolesti i iz njih su izolovani infiltrati. Ćelije su stimulisane brefeldinom, PMA i jonomicinom 4 h, zatim su inkubirane u trajanju od 30 min sa fluorescentnim antitelom specifičnim za CD4. Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane, permeabilizovane, a zatim obojene fluorescentnim antitelom specifičnim za IL-10. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost +/- standardna devijacija 5 uzoraka po grupi (tabela). Na slici je prikazan jedan reprezentativni plot (slika gore i dole levo), kao i histogram na kome je prikazan procenat CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> ćelija u odnosu na izotipsku kontrolu (slika gore i dole desno). \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### **4.11 Ekspresija TGF- $\beta$ u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova**

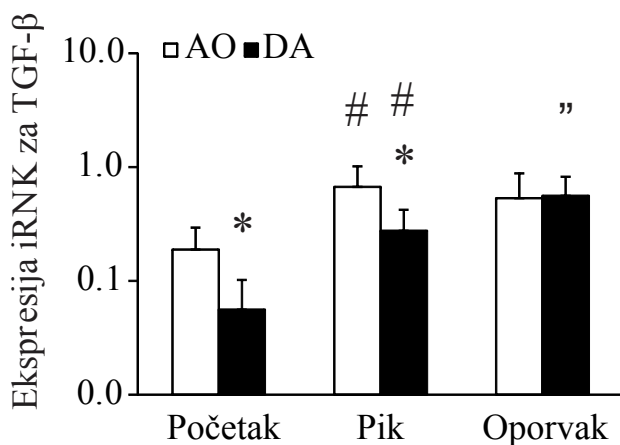
TGF- $\beta$  je pored IL-10 jedan od najbitnijih anti-inflamatornih citokina u imunskom odgovoru, pa nasje zanimalo da ispitamo razlike između AO i DA pacova u nivou još jednog citokina sličnog anti-inflamatornog dejstva. Pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom. Zdravim životinjama, kao i životinjama u različitim fazama bolesti su vađene kičmene moždine, a ekspresija TGF- $\beta$  u homogenatima je određivana metodom "real time" RT PCR. Pokazano je da je ekspresija TGF- $\beta$  u homogenatima veća kod AO pacova u odnosu na DA pacove (statistička značajnost na početku i na piku bolesti). Zanimljivo je da je ekspresija TGF- $\beta$  bila veća čak i kod zdravih AO u poređenju sa DA pacovima. U oba soja ekspresija je rasla na početku sa statističkom značajnošću, a opadala u oporavku samo kod DA pacova (Slika 11).



Slika 11: Ekspresija TGF- $\beta$  u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova. Kičmene moždine su vađene iz neimunizovanih (zdravih) i životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom u različitim fazama bolesti DA pacova. Homogenati kičmene moždine su korišćeni za izolaciju RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT-PCR. Rezultati su prikazani na logaritamskoj skali kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze početka i zdravih životinja unutar soja. "  $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze oporavka i faze pika unutar soja.

#### 4.12 Ekspresija TGF- $\beta$ u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

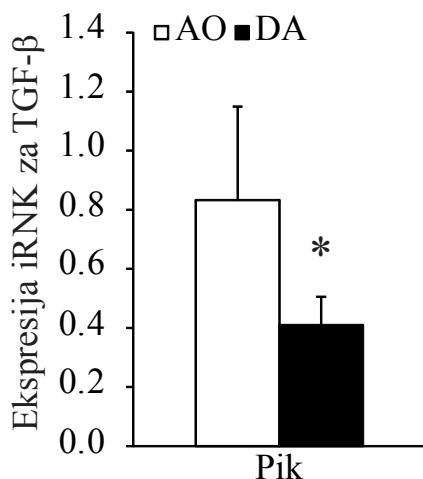
Dalje nas je zanimalo da ispitamo ekspresiju TGF- $\beta$  u ćelijama koje infiltriraju centralni nervni sistem. Zato su pacovima imunizovanim SCH+CFA emulzijom vađene kičmene moždine u različitim fazama bolesti. Iz njih su izolovani infiltrati u kojima je ekspresija TGF- $\beta$  određivana metodom „real time“ RT PCR. Pokazano je da je ekspresija TGF- $\beta$  u infiltratima statistički značajno veća kod AO u odnosu na DA pacove na početku kao i na piku bolesti, ali ne i u oporavku. Kod oba soja ekspresija je rasla na piku u odnosu na početak bolesti, dok je kod DA pacova nastavila da raste i u oporavku (Slika 12).



Slika 12: Ekspresija TGF- $\beta$  u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz njih su dobijeni infiltrati kičmene moždine iz kojih je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani na logaritamskoj skali kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze pika i faze početka unutar soja. ” $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze oporavka i faze pika unutar soja.

#### 4.13 Ekspresija TGF- $\beta$ u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova

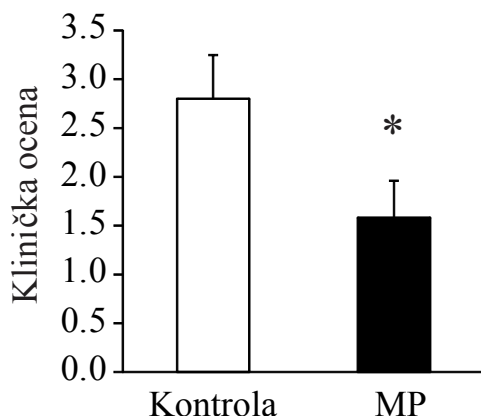
Kao i prilikom ispitivanja ekspresije IL-10, želeli smo da utvrdimo ekspresiju TGF- $\beta$  u CD4<sup>+</sup> ćelijama koje infiltriraju CNS. Zato su iz životinja imunizovanih MBP+CFA emulzijom nakon vađenja kičmenih moždina na piku bolesti iz infiltrata izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije metodom magnetne separacije. Genska ekspresija je utvrđena „real time“ RT PCR metodom. Pokazano je da je genska ekspresija TGF- $\beta$  u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine na piku bolesti veća kod AO u odnosu na DA pacove (Slika 13).



Slika 13: Ekspresija TGF- $\beta$  u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih MBP+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine na piku bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine iz kojih su izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije. Iz CD4<sup>+</sup> ćelija je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.14 Klinička slika DA pacova tretiranih metilprednizolonom

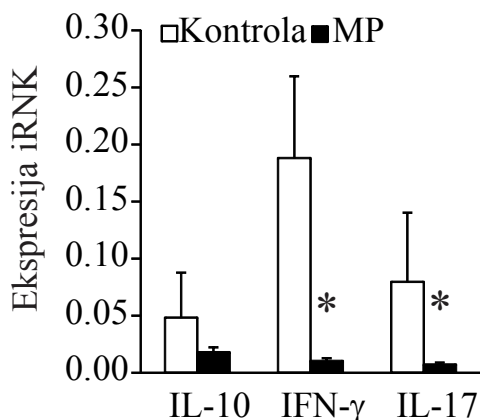
Rezultati ekspresije IL-10 u CNS-u AO i DA pacova ukazali su na mogućnost da se ekspresija IL-10 indukuje samo u uslovima veoma snažne inflamacije. U cilju provere ove pretpostavke DA pacovi su tretirani sintetičkim glukokortikoidom metilprednizolonom (MP) koji je dokazani inhibitor neuroinflamacije (Tischner, 2007). U skladu sa prethodno opisanim tretmanom ovim lekom koji je efikasno suprimirao EAE u DA pacova (Miljković 2009), DA pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom, a zatim su od pojave prvih simptoma tretirani 3 dana uzastopno MP-om ili PBS-om. Na osnovu kliničke slike ovih životinja moglo se zaključiti da MP inhibira bolest (Slika 14).



Slika 14: **Klinička slika DA pacova tretiranih metilprednizolonom.** Ženke DA pacova stare 2-4 meseca su imunizovane SCH+CFA emulzijom. Od pojave prvih simptoma životinje su tretirane MP-om (50mg/kg) ili PBS-om uzastopno 3 dana. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane. Kliničke ocene su date u trenutku žrtvovanja na sledeći način: 1-atonija repa, 2-pareza zadnjih ekstremiteta, 3-paraliza zadnjih ekstremiteta, 4-moribund. Rezultati kliničke ocene prikazani su kao srednja vrednost + standardna greška kliničke ocene6 životinja po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između životinja tretiranih PBS-om (kontrola) i životinja tretiranih MP-om.

#### 4.15 Ekspresija citokina u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolom

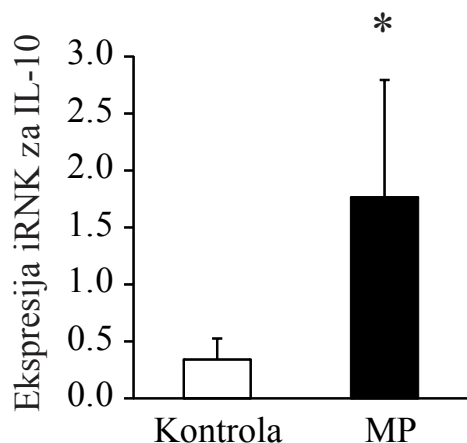
Kako je potvrđeno da MP inhibira EAE, ispitali smo ekspresiju IL-10 u CNS-u pacova nakon *in vivo* tretmana ovim sintetičkim glukokortikoidom. DA pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom i tretirani su MP-om u trajanju od tri dana počev od pojave prvih simptoma bolesti. Žrtvovani su 3 sata nakon poslednjeg tretmana i izvađene su im kičmene moždine. Ekspresija IL-10, ali i IFN- $\gamma$  i IL-17 (pro-inflamatornih citokina koje sekretuju Th1 i Th17, ćelijske populacije koje se smatraju odgovornim za patogenezu EAE-a (Petermann, 2011)) je određivana „real time“ RT PCR metodom. Primenjen na opisan način MP je značajno inhibirao ekspresiju IFN- $\gamma$  i IL-17, a nije značajno uticao na ekspresiju IL-10 kod imunizovanih DA pacova (Slika 15). Štaviše, umesto povećanja koje bi bilo u skladu sa pretpostavljenom inhibitornom ulogom ovog citokina, ovakav tretman je doveo do blagog smanjenja ekspresije IL-10 bez statističke značajnosti.



Slika 15: Ekspresija iRNA citokina u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom. Ženke DA pacova stare 2-4 meseca imunizovane su SCH+CFA emulzijom. Od pojave prvih simptoma životinje su tretirane MP-om (50mg/kg) ili PBS-om uzastopno 3 dana. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine i iz njih je izolovana RNK. Ekspresija iRNA je merena metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između životinja tretiranih PBS-om (kontrola) i životinja tretiranih MP-om.

#### 4.16 Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom

S obzirom da se u homogenatima određuje ekspresija gena za IL-10 u svim ćelijama tkiva, sledeći korak je bio da se izoluju infiltrati i u njima ispita ekspresija IL-10. Pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom, tretirani su PBS-om ili MP-om od pojave prvih simptoma bolesti tri dana uzastopno. Tri sata nakon poslednjeg tretmana životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine iz kojih su dobijeni infiltrati. Genska ekspresija je određivana metodom „real time“ RT PCR. Utvrđeno je da tretman MP-om statistički značajno povećava ekspresiju IL-10 u infiltratima kičmene moždine DA pacova (Slika 16). Dakle, za razliku od homogenata kičmene moždine, inhibicija EAE-a MP-om bila je praćena povećanjem ekspresije IL-10 u infiltratima kičmene moždine.

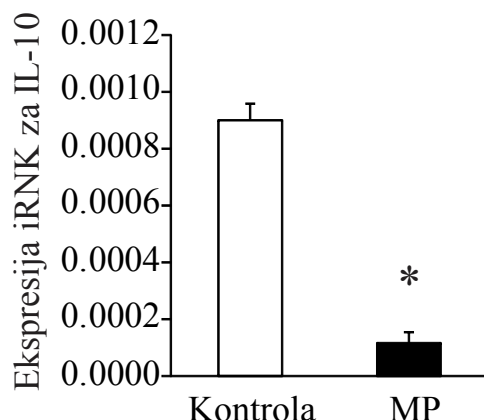


Slika 16: Ekspresija IL-10 u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom. Ženke DA pacova 2-4 meseca stare imunizovane su SCH+CFA emulzijom. Od pojave prvih simptoma životinje su tretirane MP-om (50mg/kg) ili PBS-om uzastopno 3 dana. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine iz kojih su dobijeni infiltrati. Izolovana je RNK, a ekspresija iRNK je merena metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između životinja tretiranih PBS-om (kontrola) i životinja tretiranih MP-om.

#### 4.17 Ekspresija IL-10 u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom

Kako su podaci dobijeni za ekspresiju IL-10 u homogenatima i infiltratima kičmene moždine pacova tretiranih MP-om imali suprotnu tendenciju, potrebno je bilo ispitati koje su to ćelije koje se nalaze u homogenatima kičmene moždine koje dovode do toga da je ukupna ekspresija IL-10 nakon tretmana MP-om blago smanjena. S obzirom da su astrociti najbrojnija populacija ćelija u CNS-u naš sledeći korak je bio ispitivanje ekspresije IL-10 u ovim ćelijama. Zato je *in vitro* uspostavljena kultura astrocita DA pacova tretirana ConASn (supernatant splenocita tretiranih konkanavalinom A, bogat različitim citokinima), u cilju imitiranja inflamatornih uslova koji se događaju u CNS-u pacova koji su razvili EAE, i potom tretirana MP-om. Iz astrocita je izolovana RNK iz koje je metodom „real time“ RT PCR određivana genska ekspresija. Pokazano je da MP statistički značajno smanjuje ekspresiju IL-10 u astrocitima tretiranim ConASn (Slika 17).

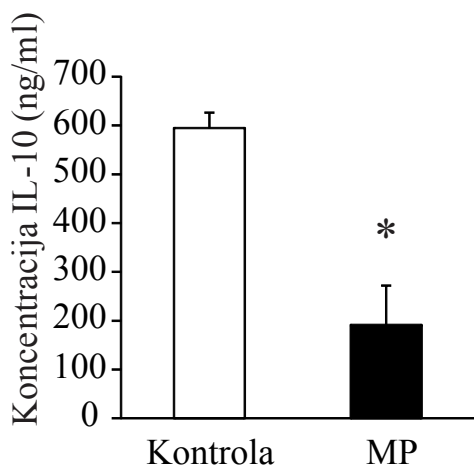




Slika 17: **Ekspresija IL-10 u astrocitima tretiranim metilprednizolonom.** *In vitro* uspostavljena kultura astrocita DA pacova je stimulirana ConASn u osustvu ili prisustvu MP-a (100 ng/ml). Nakon 24 h kultivacije iz astrocita je izolovana RNK i izmerena je ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 3 eksperimenta. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između kontrola i tretmana MP-om.

#### 4.18 **Produkcija IL-10 u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom**

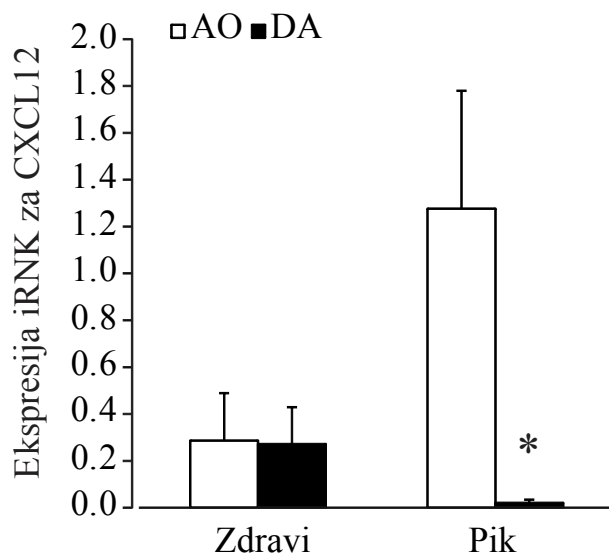
Pošto smo registrovali smanjenje ekspresije IL-10 u kulturi astrocita DA pacova pod delovanje MP-a, zanimalo nas je da ispitamo i produkciju ovog citokina u istim uslovima. Kultura astrocita DA pacova je tretirana IFN- $\gamma$ +IL-17 kako bi se simulirala inflamacija koja se događa u CNS-u ovih pacova prilikom razvijanja EAE-a, a zatim je tretirana MP-om. Nakon kultivacije ćelija u trajanju od 24h iz prikupljenih supernatanta je određivana koncentracija IL-10 metodom ELISA. Kao i u slučaju ekspresije, pokazano je da MP statistički značajno smanjuje produkciju IL-10 u astrocitima tretiranim IFN- $\gamma$ +IL-17 (Slika 18).



Slika 18: **Produkcija IL-10 u astrocitima tretiranim metilprednizolonom.** *In vitro* uspostavljena kultura astrocita DA pacova je stimulisani IFN- $\gamma$  (10 ng/ml)+ IL-17 (50 ng/ml) u odsustvu ili prisustvu MP-a (100 ng/ml). Nakon 24h kultivacije sakupljeni su supernatanti i koncentracija proteina je izmerena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 3 eksperimenata. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između kontrola i tretmana MP-om.

#### 4.19 Ekspresija CXCL12 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

CXCL12 je molekul sa pretpostavljenom protektivnom ulogom u neuroinflamaciji (Momčilović, 2012). Stoga smo želeli da ispitamo kakva je ekspresija ovog molekula u homogenatima kičmenih moždina zdravih životinja, kao i životinja na piku bolesti. AO i DA pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom. Zdravim životinjama, kao i životinjama na piku bolesti su vađene kičmene moždine, a ekspresija CXCL12 u homogenatima je određivana metodom “real time“ RT PCR. Pokazano je da nema razlike u ekspresiji CXCL12 između zdravih AO i DA pacova, dok je na piku bolesti ekspresija ovog molekula veća kod AO pacova (Slika 19).



Slika 19: **Ekspresija CXCL12 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova.**

Kičmene moždine su vađene iz neimunizovanih (zdravih) i životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom u fazi pika bolesti DA pacova. Iz homogenata je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.20 Ekspresija CXCL12 u astrocitima DA pacova

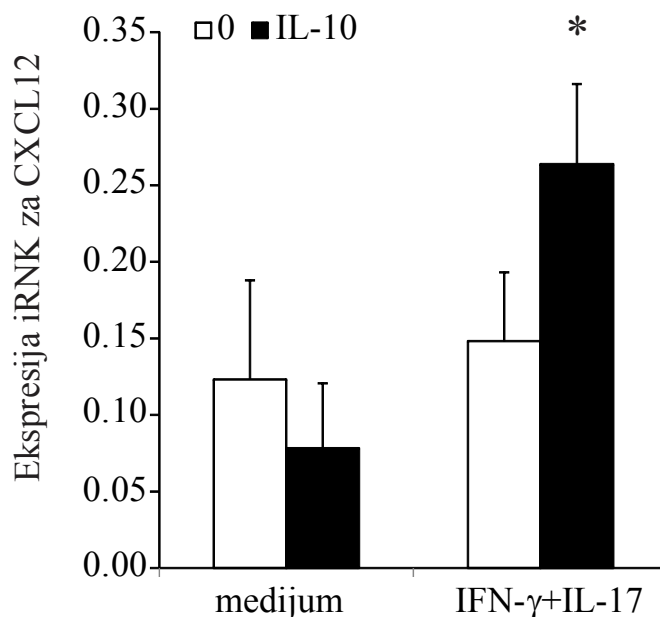
Astroцити су важни регулатори инфламације у CNS-a (Miljković, 2011c). Kako je CXCL12 molekul bitan regulator neuroinflamacije koga u CNS-u najviše produkuju astroцити, želeli smo da proverimoda li je on ekspimiran na astroцитима imunohistohemijskim bojenjem. Zato su iz DA pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom uzete kičmene moždine na piku bolesti i pripremljeni su histološki preparati koji su obeleženi antitelima specifičnim za CXCL12. CXCL12 pozitivne ćelije lokalizovane su skoro u potpunosti u beloј masi kičmene moždine. Bojenje relativno slabog intenziteta primećeno je u ćelijama sa dugim, tankim, nerazgranatim nastavcima, koji se pružaju ka pialnoj površini, predstavljajući najverovatnije fibrozne astroците (Slika 20).



Slika 20: **Ekspresija CXCL12 u kičmenoj moždini DA pacova.** Kičmene moždine su izvađene iz DA pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom u fazi pika bolesti i pripremljene su za histološku analizu. Preseci kičmenih moždina su obeleženi antitelima specifičnim za CXCL12. Na slici je prikazan reprezentativni presek na uvećanju 40x. Strukture pozitivne na CXCL12 su naznačene strelicama.

#### **4.21 Uticaj IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova**

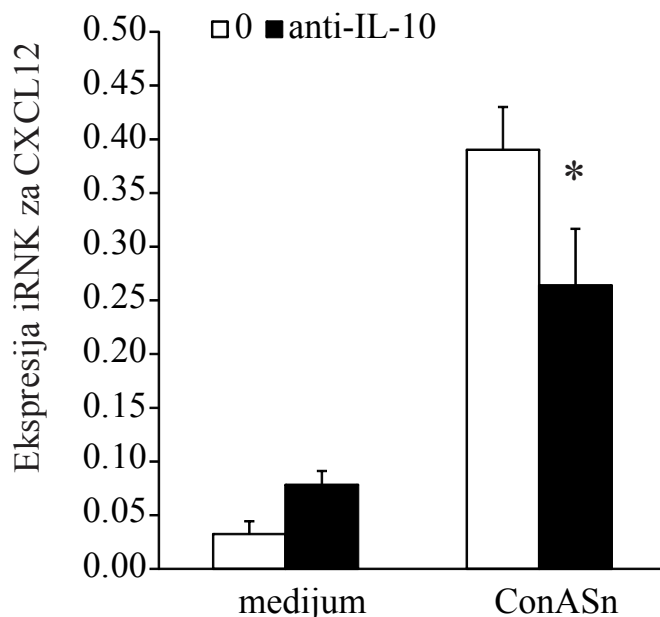
Pošto su astrociti važni regulatori inflamacije u CNS-u (Miljković, 2011c), naš sledeći cilj je bio da proverimo kako IL-10 utiče na ekspresiju CXCL12 u astrocitima. Uspostavljena astrocitna kultura iz DA pacova je stimulisana IL-10 u uslovima kada nema inflamacije (medijum) i u uslovima u kojima se oponaša inflamacija (IFN- $\gamma$ +IL-17). Iz astrocita je izolovana RNK i ekspresija CXCL12 je izmerena „real time“ RT PCR metodom. Pokazano je da IL-10 sam ne utiče na ekspresiju CXCL12, dok u saradnji sa IFN- $\gamma$ +IL-17, IL-10 dovodi do statistički značajnog povećanja ekspresije CXCL12 u astrocitima (Slika 21).



Slika 21: **Uticaj IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima.** Astroцити су третирани IL-10 (10 ng/ml) u odsustvu ili prisustvu IFN- $\gamma$  (10ng/ml)+IL-17 (50 ng/ml). Nakon 24h kultivacije izolovana je RNK i izmerena je ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 3 eksperimenata. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih i ćelija tretiranih IL-10.

#### 4.22 Uticaj neutralizacije IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova

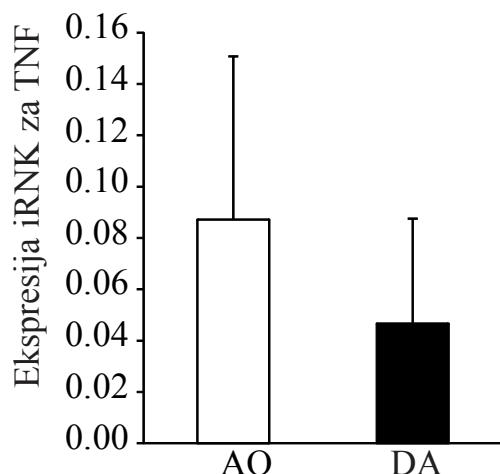
Kako bismo potvrdili da IL-10 povećava ekspresiju CXCL12 u astrocitima urađen je još jedan eksperiment. Astroцити су *in vitro* stimulisani ConASn, a potom su tretirani neutrališućim antitelom za IL-10. Nakon 24h kultivacije je izolovana RNK i određena je genska ekspresija „real time“ RT PCR metodom. U astrocitima izolovanim iz DA pacova ConASn je povećavao ekspresiju CXCL12. Ovo povećanje ekspresije je inhibirano upotrebom neutrališućeg antitela za IL-10 (Slika 22).



Slika 22: **Uticaj neutralizacije IL-10 na ekspresiju CXCL12 u astrocitima.** Astroцити су третирани анти-IL-10 антителом (0.5 µg/ml) у одсуству или присуству ConASn. Након 24h култивације изолована је РНК и измерена је експресија iRNK „real time“ RT PCR методом. Резултати су приказани као средња вредност + стандардна девијација 3 експеримента. \*p<0.05 представља статистички значајну разлику између нетретираних и ћелија третираних анти-IL-10.

#### 4.23 Ekspresija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova

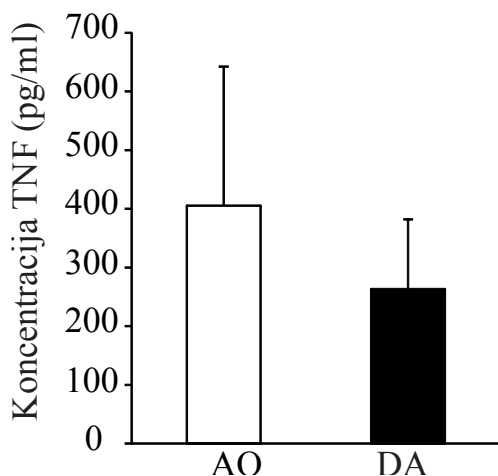
Kao i u slučaju IL-10, odlučili smo se da razlike između AO i DA pacova u pogledu TNF počnemo da proučavamo u drenirajućim limfnim čvorovima. U tu svrhu pacovi su imunizovani MBP+CFA emulzijom. U induktivnoj fazi bolesti, 6. dana nakon imunizacije, pacovima su izvađeni drenirajući limfni čvorovi u kojima započinje imunski odgovor na antigen. Iz njih je potom izolovana RNK, nakon čega je metodom „real time“ RT PCR određena genska ekspresija TNF. Utvrđeno je da u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova nema statistički značajne razlike u ekspresiji TNF između imunizovanih AO i DA pacova (Slika 23).



Slika 23: **Ekspresija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je izolovana RNK nakon čega je merena njena ekspresija metodom „real time“ RTPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 4 uzorka po grupi.

#### 4.24 Produkcija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova

Da bismo ispitali da li postoji razlika u produkciji TNF između AO i DA pacova, životinjama imunizovanim MBP+CFA emulzijom 6.dana nakon imunizacije su izvađeni drenirajući limfni čvorovi. Dobijena ćelijska suspenzija ovih limfnih čvorova je *in vitro* restimulisana MBP-om i TNF je izmeren nakon 24h kultivacije metodom ELISA. Kao i u slučaju genske ekspresije, pokazano je da se produkcija TNF ne razlikuje između AO i DA pacova u drenirajućem limfnom čvoru (Slika 24).

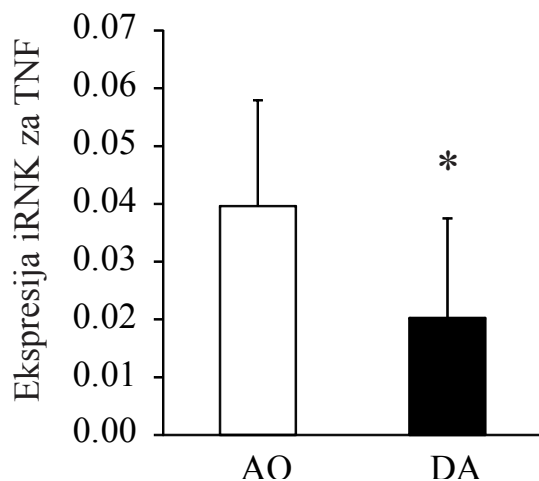


Slika 24: **Produkcija TNF u drenirajućem limfnom čvoru AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Čelije limfnog čvora su stimulisane MBP-om. Nakon 24h prikupljeni su supernatanti i izmerena je koncentracija proteina ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 4 uzorka po grupi.

#### **4.25 Ekspresija TNF u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova**

U pogledu potencijalnih razlika između AO i DA pacova kada je TNF u pitanju, dalje nas je zanimalo šta se dešava u CD4<sup>+</sup> ćelijskoj populaciji u drenirajućem limfnom čvoru. Zato su iz poplitealnog limfnog čvora pacova imunizovanih MBP+CFA emulzijom izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije 6. dana nakon imunizacije, a genska ekspresija TNF u ovim ćelijama je određena metodom „real time“ RT PCR. U slučaju CD4<sup>+</sup> ćelija drenirajućeg limfnog čvora, pokazano je da je ekspresija TNF statistički značajno manja kod DA u odnosu na AO pacove (Slika 25).

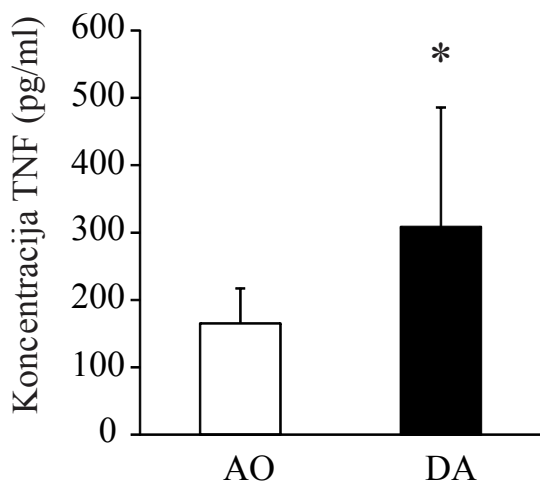




Slika 25: Ekspresija TNF u CD4<sup>+</sup>ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova. Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je izolovana CD4<sup>+</sup> populacija ćelija iz kojih je izolovana RNK. Zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost +standardna devijacija 8 uzoraka po grupi. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.26 Produkcija TNF u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova

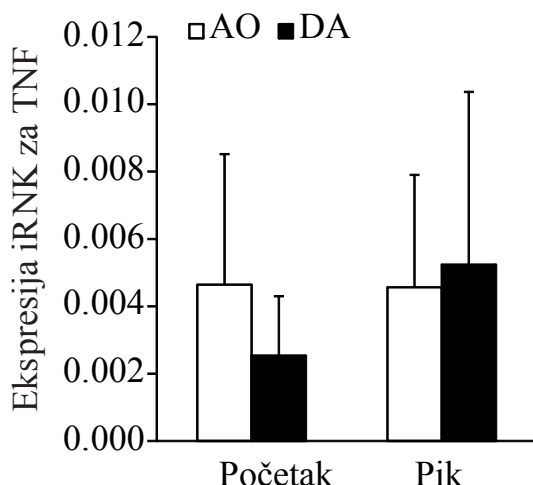
Pošto je u CD4<sup>+</sup> ćelijama poplitealnog limfnog čvora primećena razlika između AO i DA pacova na nivou genske ekspresije, dalje nas je zanimalo da li se ta razlika odražava i na produkciju TNF. Zato su CD4<sup>+</sup> ćelije izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora pacova imunizovanih MBP+CFA emulzijom restimulisane MBP-om *in vitro*, a nakon 24h kultivacije je merena količina TNF metodom ELISA. Utvrđeno je da je, za razliku od ekspresije, produkcija TNF od strane CD4<sup>+</sup> ćelija kod DA pacova statistički značajno veća u odnosu na AO pacove (Slika 26).



Slika 26: **Produkcija TNF u CD4<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz drenirajućeg limfnog čvora AO i DA pacova.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Iz limfnih čvorova je izolovana CD4<sup>+</sup> populacija ćelija koje su stimulisane MBP-om. Nakon 24h prikupljeni su supernatanti i izmerena je koncentracija proteina ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 8 uzoraka po grupi.

### 2.27 Ekspresija TNF u mononuklearnim ćelijama periferne krvi AO i DA pacova

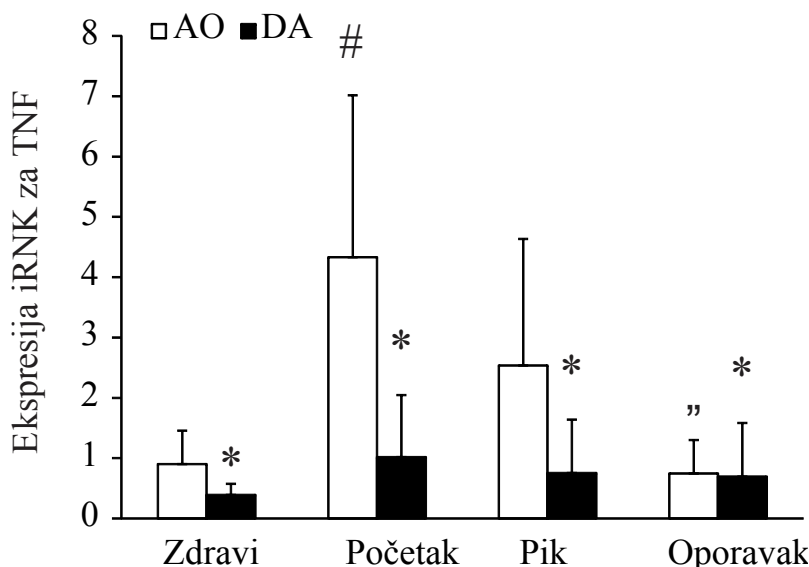
Kako bi se ispitala ekspresija TNF u ćelijama koje su napustile drenirajući limfni čvor i ušle u cirkulaciju, iz pacova imunizovanih MBP+CFA emulzijom su izolovane mononuklearne ćelije periferne krvi. Ove ćelije su izolovane u fazi početka i fazi pika bolesti kod DA pacova, a zatim je izmerena genska ekspresija „real time“ RT PCR metodom. U slučaju mononuklearnih ćelija periferne krvi pokazano je da nema razlike na nivou genske ekspresije za TNF između AO i DA pacova (Slika 27).



Slika 27: **Ekspresija TNF u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.** Mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane su iz AO i DA pacova imunizovanih MBP+CFA emulzijom u fazi početka i pika bolesti kod DA pacova. Iz ovih ćelija je izolovana RNK. Zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 8 uzoraka po grupi.

#### 4.28 Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

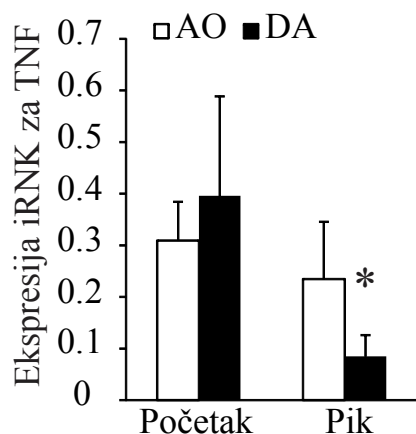
Dalja istraživanja bazirala su se na ispitivanju razlika između AO i DA pacova u imunskom odgovoru u centralnom nervnom sistemu. Za ove potrebe životinje su imunizovane SCH+CFA emulzijom. Žrtvovane su zdrave životinje i životinje u različitim fazama bolesti, izvađene su im kičmene moždine i homogenat tkiva je iskorišćen za izolovanje RNK. Genska ekspresija je utvrđena metodom „real time“ RT PCR. U svim fazama bolesti, ali i kod zdravih životinja ekspresija TNF bila je statistički značajno veća u homogenatima kičmene moždine AO u odnosu na DA pacove (Slika 28). Takođe, ekspresija kod AO pacova rasla je u fazi početka bolesti, smanjivala se na piku bez značajnosti, a zatim se statistički značajno smanjila u fazi oporavka vraćajući se na nivo koji ima kod zdravih životinja.



Slika 28: **Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova.** Kičmene moždine su vađene iz neimunizovanih (zdravih) i životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz homogenata kičmene moždine je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze početka i zdravih životinja unutar soja. ” $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze oporavka i faze pika unutar soja.

#### 4.29 Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

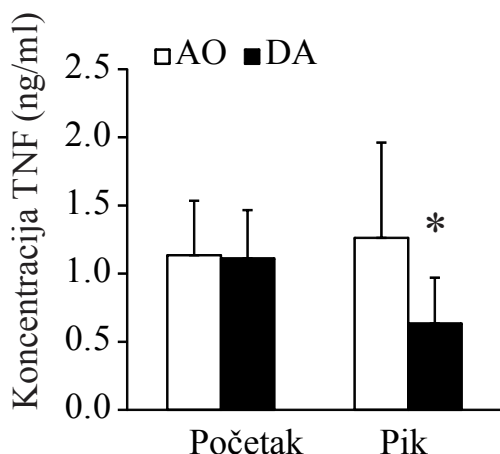
Kako bismo ispitali da li postoje razlike u pogledu ekspresije TNF u ćelijama koje sa periferije infiltriraju u centralni nervni sistem, životinje su imunizovane SCH+CFA emulzijom. Žrtvovane su u fazi početka i pika kada su im izvađene kičmene moždine iz kojih su izolovani infiltrati. Infiltrati su korišćeni za dobijanje iRNK, a genska ekspresija je određena metodom „real time“ RT PCR. Kao i u slučaju homogenata i u infiltratima je pokazano da je genska ekspresija TNF statistički značajno veća kod AO u odnosu na DA pacove u fazi pikaboolesti (Slika 29).



Slika 29: **Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine iz kojih je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.30 Produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

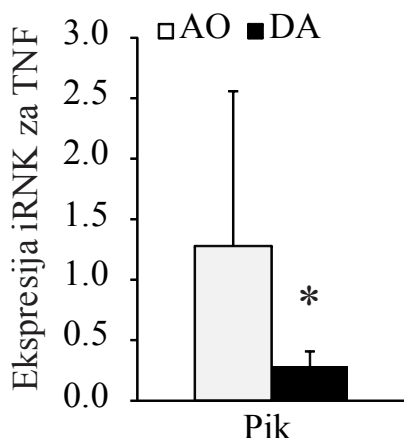
Da bi se utvrdilo da li se razlike u ćelijama koje infiltriraju centralni nervni sistem na nivou genske ekspresije odražavaju i na nivou produkcije TNF, iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom su izolovane kičmene moždine u fazi početka i pika bolesti. Iz kičmenih moždina su izolovani infiltrati mononuklearnih ćelijakoje su *in vitro* kultivisane 24h. Nakon ovog perioda je izmerena količina proteina metodom ELISA. Kao i u slučaju ekspresije, pokazano je da je produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine statistički značajno veća kod AO pacova u odnosu na DA pacove u fazi pika bolesti (Slika 30).



Slika 30: **Produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine koji su gajeni u kulturi 24h. Nakon inkubacije sakupljeni su supernatanti i određivana je koncentracija citokina metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.31 Ekspresija TNF u $CD4^+$ ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova

Imajući u vidu značajnu ulogu  $CD4^+$  ćelija u patogenezi EAE kao i činjenicu da je  $CD4^+$  ćelijska populacija najbrojnija u infiltratima kičmene moždine, u sledećem eksperimentu je ispitivana ekspresija TNF u  $CD4^+$  ćelijama infiltrata. Zato su iz životinja imunizovanih MBP+CFA emulzijom izvađene kičmene moždine u fazi pika bolesti i iz njih su dobijeni infiltrati. Iz infiltrata kičmene moždine su metodom magnetne separacije prečišćene  $CD4^+$  ćelije u kojima je merena genska ekspresija metodom „real time“ RT PCR. Pokazano je da je ekspresija TNF u  $CD4^+$  ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine u fazi pika bolesti statistički značajno veća kod AO u odnosu na DA pacove (Slika 31).

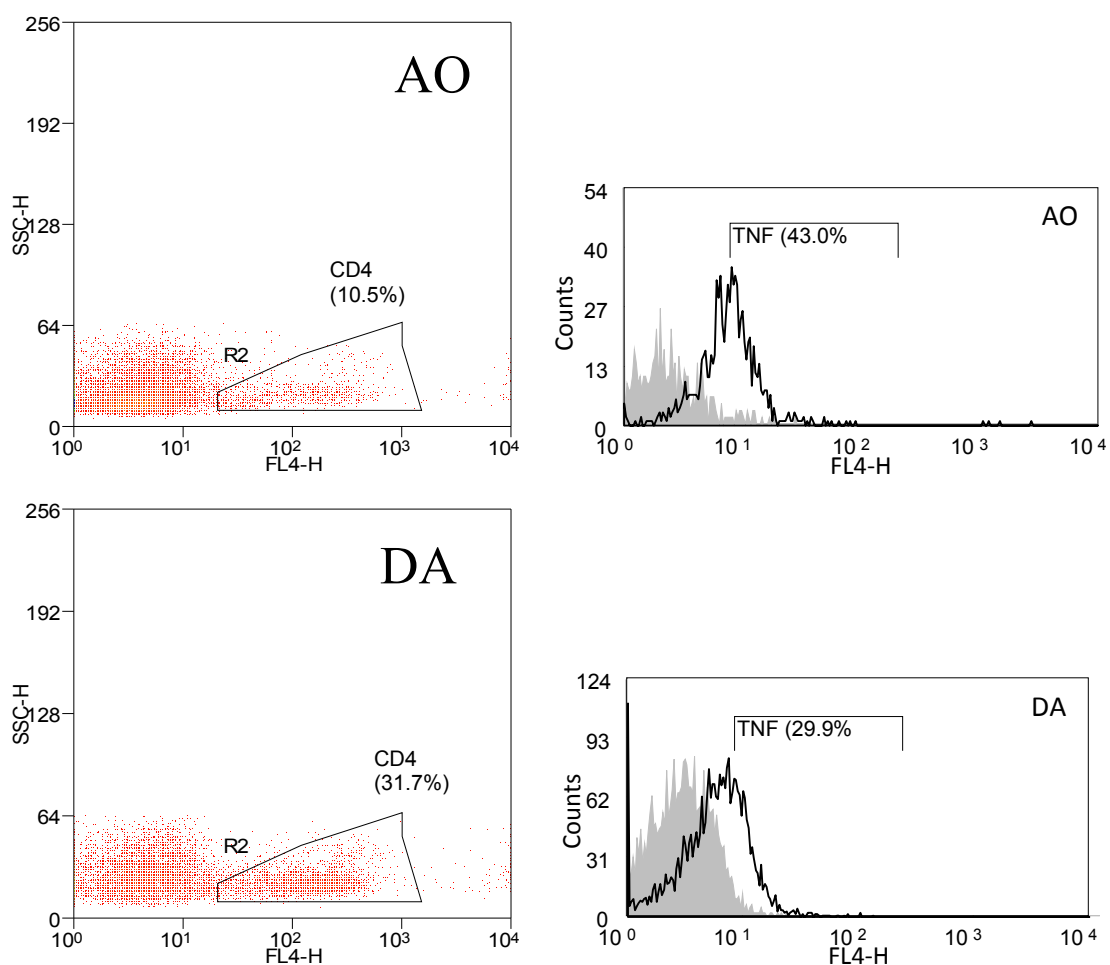


Slika 31: Ekspresija TNF u CD4<sup>+</sup>ćelijama izolovanim iz infiltrata kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih MBP+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine na piku bolesti DA pacova. Iz njih su izolovani infiltrati kičmene moždine iz kojih su izolovane CD4<sup>+</sup> ćelije. Iz CD4<sup>+</sup> ćelija je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.32 Unutarćelijska produkcija TNF u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova

Pošto je uočena razlika u nivou ekspresije gena za TNF u CD4<sup>+</sup> ćelijama infiltrata kičmene moždine između AO i DA pacova, dalje smo hteli da ispitamo da li postoji razlika i u nivou produkcije TNF u ovim ćelijama. Životinje su imunizovane SCH+CFA emulzijom i žrtvovane u fazi pika bolesti kada su izolovani infiltrati kičmene moždine. Primenjena je metoda unutarćelijskog bojenja kojom su na protočnom citofluorimetru utvrđeni procenti CD4<sup>+</sup> ćelija koje proizvode TNF. Iako je pokazano da nema razlike u procentu CD4<sup>+</sup> ćelija infiltrata koje proizvode TNF na piku bolesti između AO i DA pacova, utvrđeno je da je srednja vrednost fluorescencije ovih ćelija veća kod AO u odnosu na DA pacove (Slika 32).

	%CD4 <sup>+</sup>	TNF%	TNF srednja vrednost intenziteta fluorescence
<b>AO</b>	<b>8.1 +/- 4.4</b>	<b>34.6 +/- 6.6</b>	<b>14.0 +/- 6.7</b>
<b>DA</b>	<b>35.8 +/- 9.0*</b>	<b>40.4 +/-12.1</b>	<b>9.9 +/- 9.4*</b>



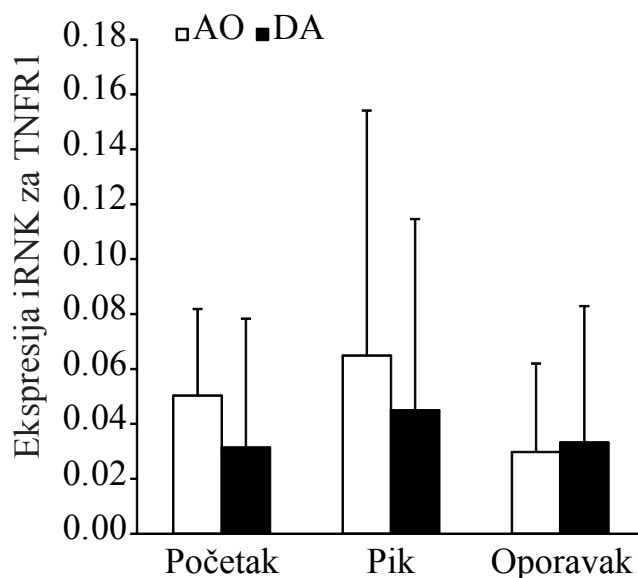
Slika 32: **Procenat CD4<sup>+</sup> i TNF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ćelija u infiltratima kičmene moždine AO i DA pacova.** Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine na piku bolesti i iz njih su izolovani infiltrati. Ćelije su stimulisane brefeldinom, PMA i jonomicinom 4 h, zatim su inkubirane u trajanju od 30 min sa fluorescentnim antitelom specifičnim za CD4. Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane, permeabilizovane, a zatim obojene fluorescentnim antitelom specifičnim za TNF. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost +/- standardna



devijacija 5 uzoraka po grupi (tabela). Na slici je prikazan jedan reprezentativni plot (slika gore i dole levo), kao i histogram na kome je prikazan procenat  $CD4^+TNF^+$  ćelija u odnosu na izotipsku kontrolu (slika gore i dole desno). \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.33 Ekspresija TNFR1 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

TNF ostvaruje svoje dejstvo vezujući se za dva receptora koji preferencijalno vezuju solubilnu, odnosno membransku formu ovog citokina (McCoy, 2008). Zato je nas dalje zanimalo da ispitamo da li postoje razlike na nivou ekspresije TNFR1 u CNS-u AO i DA pacova. U tu svrhu su iz pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene kičmene moždine u različitim fazama bolesti. Iz homogenata tkiva kičmene moždine je izolovana RNK, nakon čega je genska ekspresija određena „real time“ RT PCR metodom. Pokazano je da nema statistički značajne razlike u nivou ekspresije TNFR1 u homogenatima kičmene moždine između AO i DA pacova ni u jednoj fazi bolesti, kao ni u istom soju između različitih faza (Slika 33).

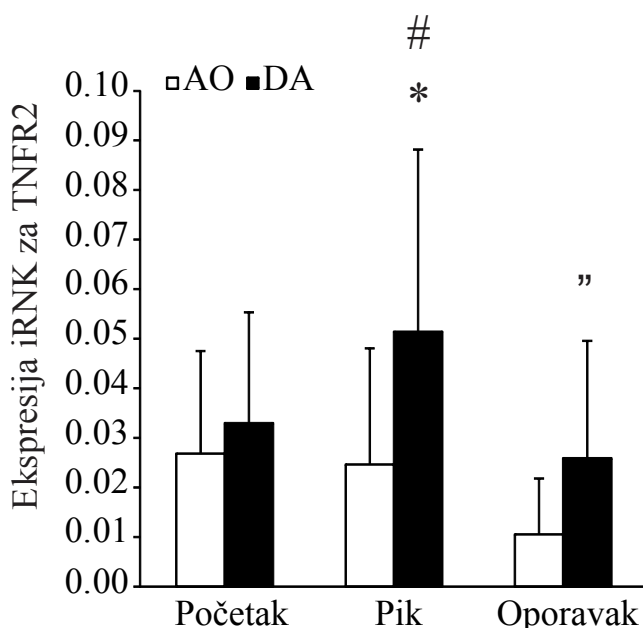


Slika 33: Ekspresija TNFR1 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vađene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz homogenata je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija

iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova.

#### 4.34 Ekspresija TNFR2 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

Pošto smo ispitali ekspresiju TNFR1 dalje nas je zanimalo da li postoje razlike u nivou ekspresije TNFR2 između AO i DA pacova. Zato su pacovi imunizovani SCH+CFA emulzijom, i žrtvovani u različitim fazama bolesti. Izolovane su kičmene moždine i iz homogenata tkiva je izolovana iRNK. Genska ekspresija je određena „real time“ RT PCR metodom. Pokazano je da je ekspresija TNFR2 u homogenatima kičmene moždine statistički značajno veća kod DA u odnosu na AO pacove na piku bolesti. Takođe, ekspresija TNFR2 kod DA pacova je statistički značajno rasla na piku bolesti, dok je u oporavku opadala. Kod AO pacova nisu uočene značajne razlike u ekspresiji (Slika 34).

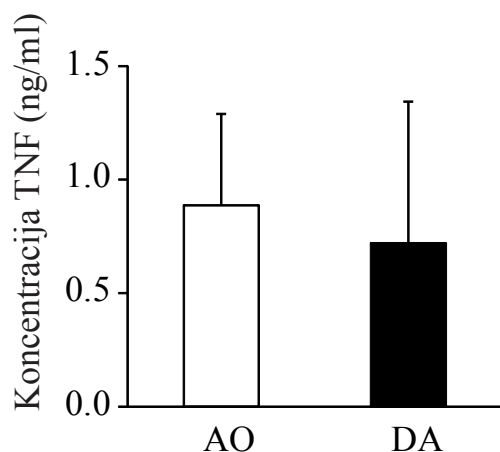


Slika 34: Ekspresija TNFR2 u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova. Iz životinja imunizovanih SCH+CFA emulzijom vadene su kičmene moždine u različitim fazama bolesti DA pacova. Iz homogenata je izolovana RNK, a zatim je merena ekspresija iRNK metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna

devijacija najmanje 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. #  $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze početka i pika kod DA pacova. "  $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između faze pika i oporavka kod DA pacova.

#### 4.35 Određivanje nivoa solubilnog TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova

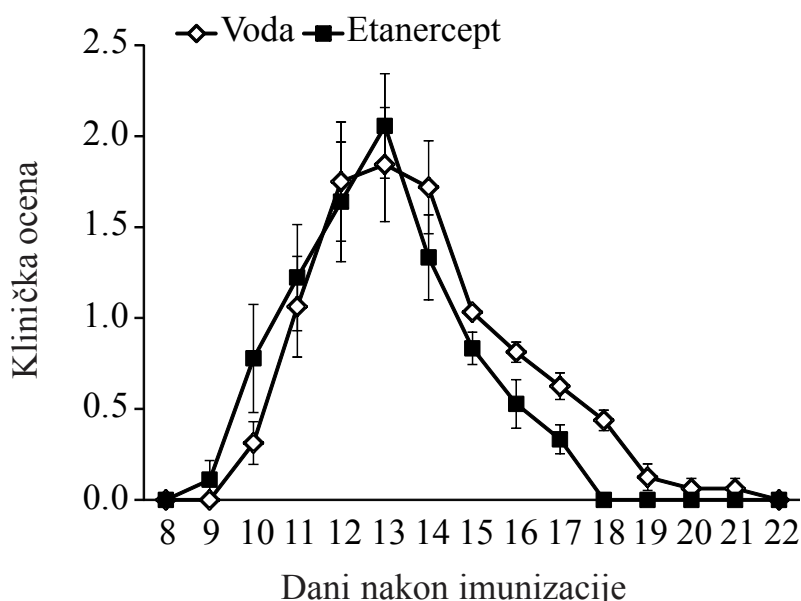
Pošto je poznato da postoje dve forme TNF, solubilna i membranska, želeli smo da ispitamo da li postoje razlike na nivou solubilnog TNF u CNS-u AO i DA pacova. Zato su pacovi imunizovani SCH+CFA emulzijom i žrtvovani u fazi pika bolesti kada su im izvađene kičmene moždine. Pripremljeni su homogenati koji su centrifugirani na visokim brzinama, a zatim su supernatanti iskorišćeni za određivanje koncentracije solubilnog TNF metodom ELISA. Pokazano je da se koncentracija solubilnog TNF izmerena u homogenatima kičmene moždine ne razlikuje između AO i DA pacova (Slika 35).



Slika 35: Nivo solubilnog TNF u homogenatima kičmene moždine AO i DA pacova. Iz pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom izvađene su kičmene moždine u fazi pika bolesti. Homogenati kičmenih moždina su centrifugirani na 12000g, pa je u dobijenim supernatantima određena količina citokina ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi.

#### 4.36 Klinička slika AO i DA pacova tretiranih etanerceptom

Kako bismo dalje ispitali ulogu TNF u neuroinflamaciji AO i DA pacova, životinje imunizovane SCH+CFA emulzijom su tretirane etanerceptom, neselektivnim inhibitorom TNF (Brambilla, 2011). Životinje su tretirane etanerceptom ili vodom subkutano 9., 12. i 15. dana nakon imunizacije. Životinje su posmatrane svakodnevno tokom 22 dana radi utvrđivanja kliničkih simptoma. Pokazano je da etanercept ne dovodi do prevazilaženja rezistentnosti na indukciju EAE-a kod AO pacova jer ni kod jednog AO pacova tretiranog etanerceptom nije došlo do pojave kliničkih simptoma EAE-a. Takođe je pokazano da etanercept ne utiče na jačinu EAE u DA pacova, odnosno da nema razlike u kliničkoj slici DA pacova tretiranih etanerceptom i onih koji su tretirani vodom, osim u dužini trajanja bolesti (Slika 36 i Tabela 1). Konačno, tokom perioda posmatranja, kod DA pacova nije došlo do pojave relapsa EAE pod uticajem etanercepta.



Slika 36: **Klinička slika DA pacova tretiranih etanerceptom.** Ženke DA pacova stare 2-4 meseca su imunizovane SCH+CFA emulzijom. 9., 12. i 15. dana nakon imunizacije životinje su subkutano tretirane etanerceptom (10 mg/kg pacova) ili vodom. Životinje su posmatrane svakodnevno tokom 22 dana radi utvrđivanja kliničke slike. Kliničke ocene su date na sledeći način: 1-atonija repa, 2-pareza zadnjih ekstremiteta, 3-paraliza zadnjih ekstremiteta, 4-

moribund. Rezultati kliničke ocene prikazani su kao srednja vrednost +/- standardna greška kliničke ocene 10 životinja po grupi.

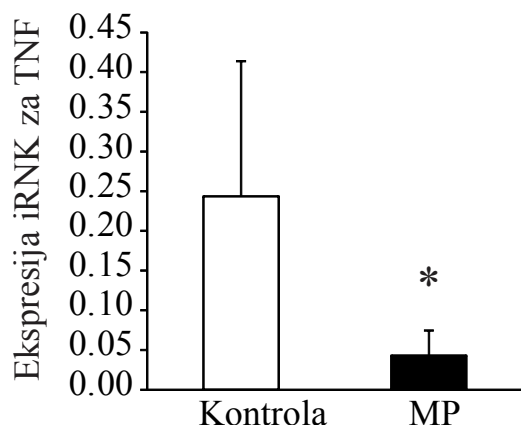
Tabela 1: **Klinički parametri EAE-a kod DA pacova tretiranih etanerceptom**

tretman	Incidenca (n/n)	Dan početka (SV +/- SD)	Trajanje (SV +/- SD)	S.V. k.o. (SV +/- SD)	Kumulativna k.o. (SV +/- SD)	Maksimum k.o. (SV +/- SD)
Voda	9/9	10.6 +/- 0.7	8.6 +/- 1.2	1.1 +/- 0.4	9.6 +/- 3.7	2.0 +/- 0.9
Etanercept	9/9	10.4 +/- 1.0	7.0 +/- 1.5*	1.2 +/- 0.5	8.5 +/- 4.4	2.3 +/- 0.9

n – broj životinja, k.o.-klinička ocena. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između pacova tretiranih vodom i pacova tretiranih etanerceptom.

#### **4.37 Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom**

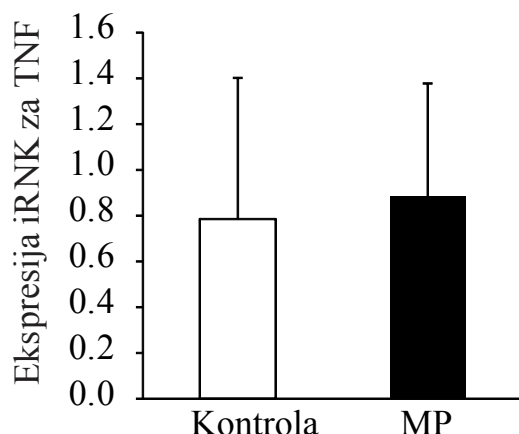
Kako bismo ispitali ekspresiju TNF u uslovima smanjene inflamacije, DA pacove koji su imunizovani SCH+CFA emulzijom smo tretirali MP-om. Životinje su ovaj tretman primale uzastopno tri dana od pojave prvih simptoma. Žrtvovane su tri sata nakon poslednjeg tretmana i izvađene su im kičmene moždine. Homogenati kičmene moždine su korišćeni za izolovanje RNK, a ekspresija TNF je određena metodom „real time“ RT PCR. Kao što je prethodno pokazano tretman MP-om je ublažio težinu kliničke slike EAE-a kod DA pacova (Slika 37). Pokazano je da tretman MP-om statistički značajno smanjuje ekspresiju TNF u homogenatima kičmene moždine DA pacova (Slika 33).



**Slika 37: Ekspresija TNF u homogenatima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom.** Ženke DA pacova 2-4 meseca stare imunizovane su SCH+CFA emulzijom. Od pojave prvih simptoma životinje su tretirane MP-om (50mg/kg) ili PBS-om uzastopno 3 dana. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine i iz njih je izolovana RNK. Ekspresija iRNK je merena metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između životinja tretiranih PBS-om (kontrola) i životinja tretiranih MP-om.

#### **4.38 Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom**

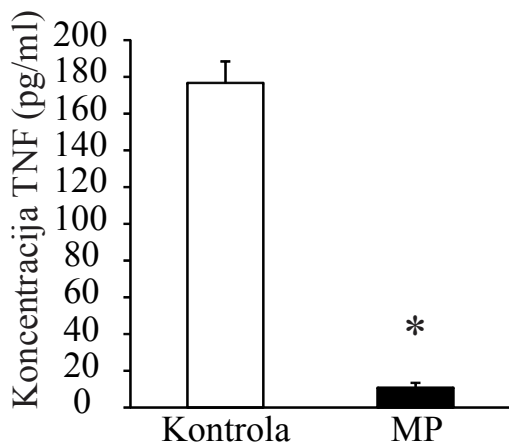
Dalje nas je zanimalo da li MP moduliše ekspresiju TNF u infiltratima kičmene moždine DA pacova. Pacovi su imunizovani SCH+CFA emulzijom i tretirani MP-om uzastopno tri dana od pojave prvih simptoma bolesti. Tri sata nakon poslednjeg tretmana životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine i iz njih su izolovani infiltrati. Genska ekspresija je određena metodom „real time“ RT PCR. Za razliku od efekta koji MP ima na homogenate, kada su u pitanju infiltrati kičmene moždine DA pacova, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji TNF između tretmana i kontrole (Slika 38).



Slika 38: **Ekspresija TNF u infiltratima kičmene moždine DA pacova tretiranih metilprednizolonom.** Ženke DA pacova 2-4 meseca stare imunizovane su SCH+CFA emulzijom. Od pojave prvih simptoma životinje su tretirane MP-om (50mg/kg) ili PBS-om uzastopno 3 dana. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane, izvađene su im kičmene moždine iz kojih su dobijeni infiltrati. Izolovana je RNK, a ekspresija iRNK je merena metodom „real time“ RT PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između životinja tretiranih PBS-om (kontrola) i životinja tretiranih MP-om.

#### **4.39 Produkcija TNF u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora DA pacova *in vitro* tretiranim metilprednizolonom.**

Pošto je pokazano da MP ne inhibira ekspresiju TNF u ćelijama koje infiltriraju CNS, zanimalo nas je da proverimo kako MP deluje na ćelije drenirajućeg limfnog čvora restimulisane antigenom *in vitro*. Za ovaj eksperiment pacovi su imunizovani MBP+CFA emulzijom i žrtvovani 6. dana nakon imunizacije. Ćelije poplitealnog limfnog čvora su restimulisane u kulturi MBP-om uprিসustvu ili odsustvu MP-a i nakon 24h su pokupljeni supernatanti koji su iskorišćeni za merenje koncentracije TNF metodom ELISA. Pokazano je da MP inhibira produkciju TNF u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora DA pacova restimulisanim MBP-om *in vitro* (Slika 39).

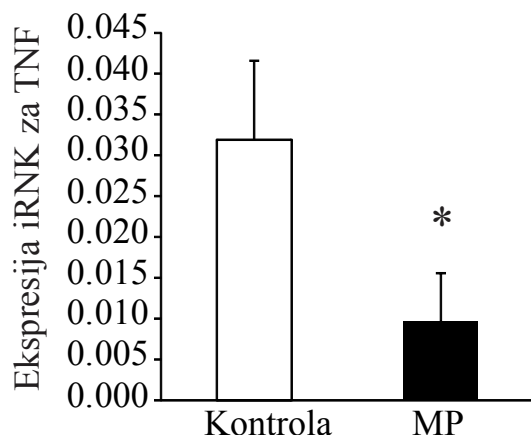


Slika 39: **Produkcija TNF u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora DA pacovain vitro tretiranih metilprednizolonom.** Poplitealni limfni čvorovi su izolovani iz AO i DA pacova 6. dana nakon imunizacije MBP+CFA. Ćelije limfnog čvora su stimulisane MBP-om u prisustvu ili odsustvu MP-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 6 uzoraka po grupi. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između ćelija koje nisu tretirane i onih koje su tretirane MP-om.

#### 4.40 Ekspresija TNF u astrocitima DA pacova tretiranim metilprednizolonom

Kako je pokazano da MP ima efekte na ekspresiju TNF u homogenatima, ali nema efekta na infiltrate, zanimalo nas je na koje ćelije deluje ovaj sintetski glukokortikoidu tkivu kičmene moždine. Zato su *in vitro* kultivisani astrociti stimulisani ConASn da bi se oponašali inflamatorni uslovi, a zatim su tretirani MP-om. Nakon 24h kultivacije izolovana je RNK i ekspresija TNF određena je metodom „real time“ RT PCR. Pokazano je da MP statistički značajno smanjuje ekspresiju TNF u astrocitima DA pacova (Slika 40).

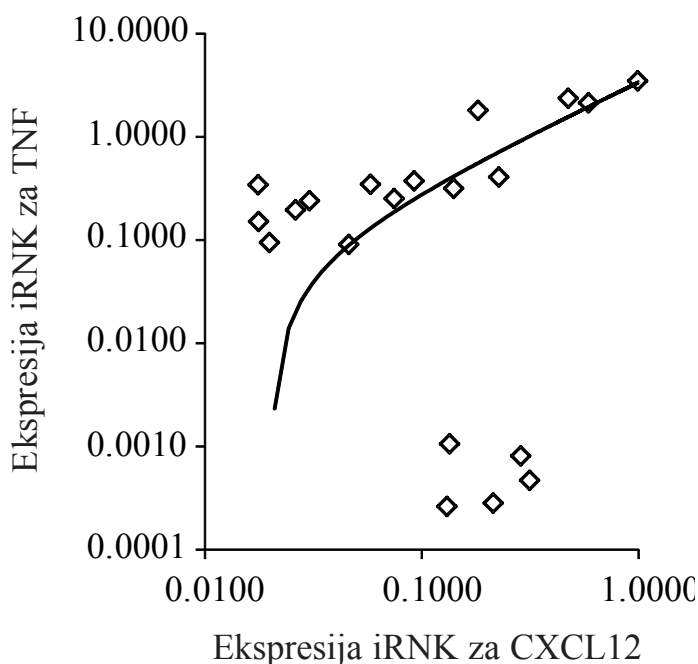




Slika 40: **Ekspresija TNF u astrocitima tretiranim MP-om.** *In vitro* uspostavljena kultura astrocita DA pacova. je stimulirana ConASn u osustvu ili prisustvu MP-a (100 ng/ml). Nakon 24 h kultivacije iz astrocita je izolovana RNK i izmerena je ekspresija iRNA „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 3 eksperimenta. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između kontrola i tretmana MP-om.

#### 4.41 Korelacija ekspresije gena za TNF i CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA pacova

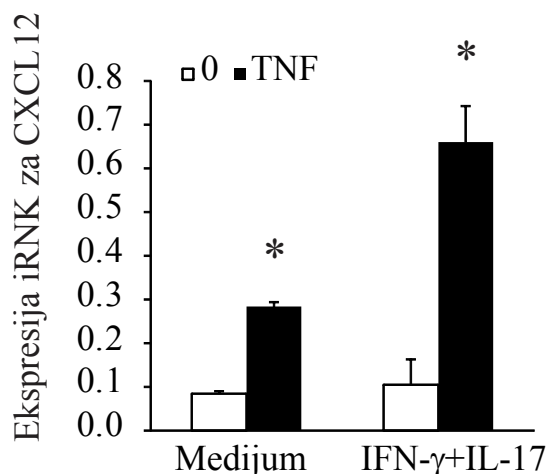
Pokazano je da je TNF u homogenatima kičmene moždine viši kod AO u odnosu na DA pacove. U našim ranijim istraživanjima je utvrđeno da ekspresija CXCL12 u homogenatima kičmene moždine prati isti trend (Miljković, 2011b), pa je izračunat koeficijent korelacije ekspresije gena ova dva molekula u homogenatima kičmene moždine. Korišćeni su homogenati kičmene moždine DA pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom i to po 5 zdravih, 5 u fazi početka, 5 u piku i 5 životinja u fazi oporavka. Na ovom uzorku ( $n=20$ ) je urađen Pirsonov test korelacije dobijen je koeficijent korelacije  $r=0.870$  sa verovatnoćom  $p < 0.01$ . Dakle, pokazano je da su ekspresije TNF i CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA pacova u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji (Slika 41).



Slika 41: **Korelacija ekspresije gena za TNF i CXCL12 u homogenatima kičmene moždine DA pacova.** Na uzorku od 20 homogenata kičmene moždine DA pacova imunizovanih SCH+CFA emulzijom urađen je Pirsonov test korelacije. Korišćene su vrednosti genske ekspresije za TNF i CXCL12 iz 5 zdravih, 5 u fazi početka, 5 na piku i 5 životinja u fazi oporavka. Kriva prikazana na grafiku je linija trenda korelacije uzoraka.

#### 4.42 Uticaj TNF na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova

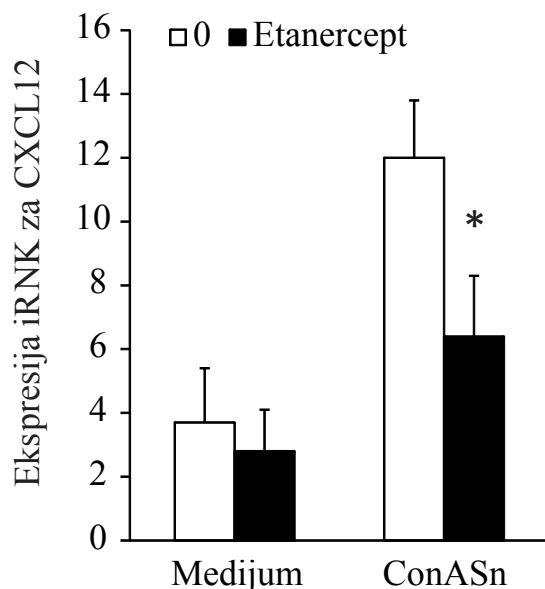
Kako je u prethodnom rezultatu pokazano da su TNF i CXCL12 u pozitivnoj korelaciji, dalje nas je zanimalo da ispitamo da li TNF ostvaruje uticaj na ekspresiju CXCL12 u astrocitima koji su osnovni proizvođači ovog hemokina u CNS-u u inflamaciji (Ambrosini, 2005). Zbog toga su kultivisani astrociti DA pacova i tretirani TNF u odsustvu ili prisustvu pro-inflamatornih citokina (IFN- $\gamma$ +IL-17). Nakon 24h *in vitro* kultivacije izmerena je genska ekspresija CXCL12 metodom „real time“ RT PCR. Pokazano je da TNF statistički značajno povećava ekspresiju CXCL12 kako sam, tako i u prisustvu IFN- $\gamma$ +IL-17 (Slika 42).



Slika 42: **Uticaj TNF na ekspresiju CXCL12 u astrocitima.** Astroцити су третирани TNF (10 ng/ml) u odsustvu ili prisustvu IFN- $\gamma$  (10ng/ml)+IL-17 (50 ng/ml). Nakon 24h kultivacije izolovana je RNK i izmerena je ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati 2 eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija. \*p<0.05 predstavlja statistički značajnu razliku između ćelija koje nisu tretirane i onih koje su tretirane TNF.

#### 4.43 Uticaj etanercepta na ekspresiju CXCL12 u astrocitima DA pacova

Kako bismo potvrdili da TNF povećava ekspresiju CXCL12 u astrocitima, uradili smo eksperimente u kojima smo koristili etanercept, inhibitor TNF. Astroцити су *in vitro* stimulisani ConASn, a potom su tretirani etanerceptom. Nakon 24h kultivacije je izolovana RNK i određena je genska ekspresija „real time“ RT PCR metodom. U astrocitima izolovanim iz DA pacova ConASn je povećavao ekspresiju CXCL12. Ovo povećanje ekspresije je inhibirano upotrebom etanercepta(Slika 43) što je potvrdilo da TNF ima stimulatorno dejstvo na ekspresiju CXCL12 u astrocitima.



Slika 43: **Uticaj etanercepta na ekspresiju CXCL12 u astrocitima.** Astroцити su gajeni u kulturi u medijumu ili stimulisani ConASnu prisustvu ili odsustvu etanercepta (250 ng/ml). Nakon 24h kultivacije izolovana je RNK i izmerena je ekspresija iRNK „real time“ RT PCR metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija 4 eksperimenta. \* $p < 0.05$  predstavlja statistički značajnu razliku između ConASn stimulisanih ćelija netretiranih i tretiranih etanerceptom.

# **5.DISKUSIJA**

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazan povećan nivo IL-10 u CNS-u DA pacova koji su podložni razvoju EAE-a u odnosu na AO pacove koji su rezistentni na indukciju bolesti. Pokazano je da ovaj citokin ekspimiraju CD4<sup>+</sup> ćelije koje su infiltrirale u CNS. Za razliku od CNS-a ovakav obrazac ekspresije IL-10 nije primećen u CD4<sup>+</sup> ćelijama drenirajućeg limfnog čvora. Dalje je pokazano da tretman imunizovanih DA pacova metilprednizolonom smanjuje ekspresiju IL-10 u homogenatu kičmene moždine, ali ne i u ćelijama koje infiltriraju CNS. Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je nivo TNF u CNS-u viši kod AO u odnosu na DA pacove. Ova razlika je karakteristična za CNS, pošto u imunskim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova kao ni u mononuklearnim ćelijama periferne krvi razlike između AO i DA soja nema. *In vivo* blokada TNF nije uticala na klinički tok bolesti, a *in vivo* primena metilprednizolona nije dovela do inhibicije ekspresije TNF u ćelijama koje infiltriraju u CNS. Na kraju, pokazano je da i IL-10 i TNF dovode do povećane ekspresije CXCL12 u astrocitima.

IL-10 je predstavnik anti-inflamatorne grupe citokina. Zbog potencijalnog terapijskog dejstva njegova uloga je dosta ispitivana u EAE-u. Subkutana administracija IL-10 umanjivala je simptome bolesti kod Lewis pacova imunizovanih MBP-om, smanjujući dužinu trajanja kao i broj infiltrišućih ćelija u CNS-u (Rott, 1994). Nazalna administracija IL-10 inhibirala je kako akutni EAE kod Lewis pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine, tako i relapsno-remitentni EAE kod DA pacova imunizovanih na isti način (Xiao, 1998). Kada je u pitanju mišji EAE, podaci se razlikuju. Jedna grupa autora je detektovala inhibiciju bolesti intravenskom primenom vakcine sa virusom koji je nosio gen za IL-10 kod SJL/J miševa imunizovanih homogenatom kičmene moždine (Willenborg, 1995). Međutim, druga grupa autora intravenskom primenom humanog rekombinantnog IL-10 kod istih miševa nije dobila nikakvo poboljšanje u kliničkoj slici EAE-a (Santambrogio, 1995). Ni kod pasivno indukovanih EAE-a kod SJL/J miševa intravenska primena IL-10 nije inhibirala bolest. Međutim, kod ovih miševa je primena neutrališućeg antitela za IL-10 dovela do pogoršanja kliničke slike (Cannella, 1996). Dalje, primena virusnog vektora koji je sadržao gen za IL-10 nije imala nikakav efekat na tok EAE-a kod Balb/c miševa imunizovanih homogenatom kičmene moždine (Broberg, 2001). Kontradiktornost navedenih podataka može se objasniti činjenicom da sistemska primena citokina ne može da oponaša stvarno delovanje citokina u tkivnoj mikrosredini, zbog njihovog

kratkog poluživota i otežanog dospevanja do odgovarajućeg ciljnog organa. Upotreba genetski modifikovanih životinja u istraživanju uloge IL-10 u razvoju EAE-a dodatno je ukazala na važnu ulogu koji bi ovaj citokin mogao da ima u imunosupresiji oboljenja. Kod C57Bl miševa koji nemaju IL-10 (IL-10 KO, od eng. knockout) imunizovanih MBP-om bolest je bila jača nego kod kontrolnih miševa (Segal, 1998). Takođe, kod istih miševa imunizovanih MOG peptidom (35-55) pokazano je da IL-10 KO miševi razvijaju težu bolest, nekad čak i bez oporavka (Samoilova, 1998). Takođe, encefalitogene T ćelije iz IL-10 KO miševa su nakon transfera u miševе primaoce dovodile do nastanka težeg oblika EAE-a (Betelli, 1998). Još je pokazano da su transgeni miševi kod kojih je prekomerno ekspimiran IL-10 bili potpuno rezistentni na razvoj EAE-a (Cua, 1999). Ipak, mora se naglasiti da upotreba „knockout“ životinja nije u potpunosti adekvatan model sistem za proučavanje uloge citokina u razvoju neke autoimunske bolesti. Kako citokini imaju različite biološke uloge, od kojih se neke međusobno preklapaju, može se očekivati da kod životinja deficijentnih u genu za jedan citokin, može doći do promena u različitim fiziološkim procesima kao i do toga da ulogu deficijentnog preuzme neki drugi citokin (Steinman, 1997).

Ova doktorska disertacija je pokazala viši nivo IL-10 u CNS-u DA pacova na piku EAE-a u odnosu na AO soj. Takođe, ekspresija ovog citokina u homogenatima kičmene moždine DA pacova je rasla na samom početku bolesti, ostajala visoka na piku, a zatim blago opadala u oporavku. U infiltratima kičmene moždine je obrazac ekspresije ovog citokina bio drugačiji, pošto je ekspresija IL-10 bila najveća na piku, posle čega je ostajala konstantna. Ovakav obrazac ekspresije bi mogao da ukaže da je imunosupresivni citokin IL-10 bitan za oporavak životinja od EAE-a. Drugi autori su takođe detektovali slične obrasce ekspresije IL-10 u CNS-u. Kod Lewis pacova imunizovanih MBP-om najviši nivo iRNK za IL-10 je dostignut na piku, nakon čega je u oporavku nivo opadao (Jander, 1998). Dalje, kod Lewis pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine iRNK za IL-10 je takođe rasla na početku bolesti, dok je kod DA pacova imunizovanih na isti način bila niska sve vreme trajanja bolesti (Diab, 1997). Bitno je naglasiti da su Lewis pacovi kod ove grupe autora razvijali akutnu monofaznu bolest, dok je kod istih autora kod DA pacova bolest relapsno-remitentna. U našoj laboratoriji DA pacovi razvijaju akutnu monofaznu bolest, pa se može pretpostaviti da IL-10 ima ulogu ne samo u oporavku, već i u onemogućavanju da

bolest dobije hroničnu formu. Zaista, kod DA pacova imunizovanih MBP-om koji razvijaju relapsno-remitentni oblik bolesti nema detektabilnog nivoa IL-10 ni na periferiji ni u CNS-u (Issazadeh, 1996), dok kod Lewis pacova nivo IL-10 raste na samom početku bolesti (Tanuma, 1997). Doduše, Tanuma i sar. (Tanuma, 2000) dobijaju i rezultate u kojima DA pacovi, u zavisnosti od načina imunizacije (MBP ili homogenat kičmene moždine) razvijaju akutnu ili hroničnu formu EAE-a, bez promene nivoa iRNK za IL-10 tokom bolesti. U našim rukama nakon SCH+CFA ili MBP+CFA imunizacije DA pacovi razvijaju akutni oblik bolesti, pa ovo može objasniti nepodudaranje rezultata koje su dobili Tanuma i sar. i rezultata naše laboratorije. Takođe, naše istraživanje pokazuje da AO pacovi koji su rezistentni na bolest imaju nizak nivo IL-10 celim tokom bolesti. Kod Brown Norway soja pacova koji su relativno rezistentni na razvoj EAE-a nivo IL-10 u drenirajućem limfnom čvoru je manji u odnosu na Lewis pacove podložne razvoju bolesti (Cautain, 2001). Ovo doprinosi pretpostavci da je IL-10 bitan za oporavak, pa je kod rezistentnih sojeva kod kojih je inflamatorna reakcija slaba i njegov nivo nizak.

Povećanje nivoa IL-10 kod DA pacova koji razvijaju EAE nakon imunizacije nije posledica tzv „citokinske oluje“ do koje dolazi usled inflamatorne reakcije. Viši nivo TGF- $\beta$  u CNS-u rezistentnih AO pacova u odnosu na DA pacove to jasno pokazuje. Ova doktorska disertacija pokazuje viši nivo TGF- $\beta$  kod AO pacova ne samo tokom razvoja bolesti, već i kod zdravih životinja, ukazujući na mogućnost da je TGF- $\beta$  bitan za rezistenciju AO soja. Nivo iRNK za ovaj citokin raste na početku bolesti kod oba soja u homogenatima kičmene moždine, dok je u ćelijskim infiltratima nivo iRNK najveći na piku. U akutnom monofaznom EAE-u indukovanom MBP-om kod Lewis pacova, nivo iRNK za TGF- $\beta$  je takođe najveći na piku (Issazadeh, 1995). Međutim isti autori kod DA pacova koji razvijaju relapsno-remitentni oblik bolesti ne pronalaze detektabilan nivo ovog citokina, ni u perifernim limfnim organima, ni u CNS-u. Ovo bi moglo da ukaže da DA pacovi sa akutnom monofaznom bolešću eksprimiraju TGF- $\beta$  kao mehanizam koji koriste da bi se oporavili od bolesti. O važnosti TGF- $\beta$  u regulaciji EAE-a govori podatak da je kod DA pacova imunizovanih homogenatom kičmene moždine, intravenska primena fibroblasta transformisanih vektorom koji je sadržao gen za TGF- $\beta$  dovela do smanjenja mortaliteta i poboljšanja kliničke slike



(Zargarova, 2004). Dalje, Cautain i sar. su pokazali viši nivo TGF- $\beta$  u serumu BN pacova rezistentnih na bolest u odnosu na podložne Lewis pacove nakon imunizacije MBP-om. Takođe, ovi autori su pokazali da intravenska primena neutrališućeg antitela za TGF- $\beta$  dovodi do razvoja bolesti kod ovih, inače rezistentnih pacova. Zajedno sa ovim rezultatima, ova doktorska disertacija ukazuje da bi viši nivo TGF- $\beta$  u CNS-u AO u odnosu na DA pacove zapravo mogao da bude faktor koji doprinosi rezistenciji AO pacova na razvoj EAE-a.

Kada je u pitanju TNF, brojna istraživanja potvrđuju njegovu pro-inflamatornu ulogu u EAE-u. Kada je humani rekombinantni TNF davan Lewis pacovima imunizovanim homogenatom kičmene moždine, dolazilo je do produžetka EAE-a i povećanja broja infiltrata u CNS-u (Kuroda, 1991). Tretman Lewis pacova imunizovanih MBP-om pomoću inhibitora TNF (TNFR1 vezan za polietilen glikol) je na dozno zavisani način umanjivao kliničke simptome bolesti, dovodeći do odlaganja početka i smanjenja dužine trajanja EAE-a (Martin, 1995). Kao i u modelu aktivnog EAE-a i u pasivnom EAE-u indukovanom kod SJL/J miševa transferom MBP specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita je nakon inhibicije TNF (subkutanom administracijom TNFR1) dolazilo do blokiranja kako kliničkih simptoma, tako i patoloških promena (demijelinizacije i infiltracije ćelija u CNS) kod životinja (Selmaj, 1995a). U pasivnom EAE-u indukovanom kod Lewis pacova (transfer MBP specifičnih ćelija) tretman TNF inhibitorom (TNFR1 vezan za IgG1) štiti je od pojave kliničkih simptoma (Klinkert, 1997). Nivo TNF u supernatantima mononuklearnih infiltrata CNS-a bio je povećan kod Lewis pacova imunizovanih MBP-om na početku bolesti, nakon čega je opadao, ukazujući na ulogu TNF u indukciji EAE-a (Iwahashi, 1997). Direktno uvođenje TNF u CNS dovodilo je do težeg oblika EAE-a koji je ranije počinjao kod (PLJxSJL)F1 miševa imunizovanih MBP-om (Dal Canto, 1999). TNF KO miševi C57Bl/6 genetičke podloge imunizovani MOG peptidom (35-55) imali su odložen početak bolesti i smanjenu dužinu trajanja, ali je bolest imala istu jačinu kao i kod kontrolnih miševa (Sean Riminton, 1998). Ovi autori pokazali su da TNF utiče na kretanje leukocita u CNS-u odnosno na prelazak T-limfocita iz perivaskularnog prostora u parenhim, kao i da nedostatak TNF ne utiče na demijelinizaciju. Još jedna grupa autora je dobila odložen početak i blažu kliničku sliku bolesti korišćenjem istog modela (Eugster, 1999), ali samo ako je u imunizaciji korišćen MOG peptid (35-55), dok prilikom imunizacije homogenatom kičmene moždine između

TNF KO i kontrolnih miševa razlike nije bilo. Kassiotis i saradnici (Kassiotis, 1999b) pokazali su da je TNF neophodan za inicijaciju bolesti, jer je TNF KO miševima imunizovanim MBP-om bio odložen početak bolesti, bez uticaja na kasnije stadijume, kao ni na jačinu bolesti.

Međutim, ista grupa autora je dve godine kasnije pokazala da pored poznate proinflatorne uloge, TNF može da ima i imunosupresivnu funkciju (Kassiotis, 2001). Korišćenjem TNF KO modela oni su pokazali da miševi bez TNF imaju produženu reaktivnost na MBP i da je ekspanzija aktiviranih/memorijskih T-limfocita kod ovih miševa produžena, dovodeći tako do pogoršanja EAE-a. Takođe, oni su pokazali da TNF štiti miševе imunizovane MOG peptidom (35-55) od pojave hronične bolesti, jer kod TNF KO miševa kod kojih je odložen početak i smanjena jačina bolesti, nakon oporavka od akutnog EAE-a dolazi do razvoja hronične progresivne bolesti. Da TNF može da ima i neuroprotektivnu ulogu u EAE-u nagovešteno je i ranije. Indukujući aktivni EAE imunizacijom MBP-om, Villarroya i saradnici (Villarroya, 1997) su kod dva pacovska soja, Lewis i DA, detektovali prisustvo TNF u CNS-u tokom svih faza bolesti, ali i mesec dana nakon oporavka životinja. Dalje, kod miševa bez TNF imunizovanih MOG peptidom (35-55) pokazana su teška neurološka oštećenja, visok mortalitet, inflamacija i demijelinizacija. Još je pokazano da nedostatak TNF dovodi do toga da inače rezistentni sojevi miševa postanu podložni razvoju EAE-a, kao i da tretman TNF smanjuje težinu bolesti kod ovih miševa (Liu, 1998). Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa protektivnom ulogom TNF prilikom razvoja EAE-a, pošto pokazuju povišen nivo ovog citokina u CNS-u AO pacova koji su rezistentni na indukciju bolesti. Nivo ovog citokina se kod AO pacova statistički značajno povećava odmah na početku bolesti i ostaje visok sve do faze oporavka, dok kod DA pacova koji su podložni razvoju EAE-a ni u jednoj fazi bolesti ne dolazi do povećanja TNF. Zanimljivo je da čak i zdravi AO pacovi imaju viši nivo TNF u odnosu na DA pacove, što ukazuje da bi povišen nivo ovog citokina mogao da bude jedan od faktora koji doprinosi njihovoj rezistenciji.

Poslednjih desetak godina počinje da se nagoveštava razlog ovakve dvostruke uloge TNF. Korišćenjem genetski modifikovanih C57Bl/6 miševa imunizovanih MOG peptidom (35-55) pokazano je da miševi bez TNFR1 imaju odložen početak, slabiju

progresiju i smanjenu demijelinizaciju, dok miševi bez TNFR2 imaju jaču bolest i isti stepen demijelinizacije kao kontrolni miševi (Eugster, 1999). Ovi rezultati prvi ukazuju na ključnu ulogu TNFR1 u razvoju EAE-a i na protektivnu ulogu signalnog puta pokrenutog vezivanjem za TNFR2 u kliničkom toku ove bolesti. Zatim slede brojna istraživanja koja potvrđuju gore navedeno. TNFR1 KO miševi imunizovani MOG peptidom (35-55) su bili potpuno rezistentni na indukciju bolesti, dok su TNFR2 KO imali jaču bolest nego kontrolni miševi, praćenu jakom inflamacijom i demijelinizacijom (Suvannavejh, 2000). U modelu pasivnog transfera indukovano MOG peptidom (35-55), TNFR1 KO miševi nisu pokazivali kliničke simptome bolesti. Takođe, pokazano je da je interakcija TNF i TNFR1 odgovorna za prelazak ćelija iz perivaskularnog prostora u parenhim CNS-a, pošto su se kod TNFR1 KO miševa T-ćelije zadržavale u perivaskularnom prostoru (Gimenez, 2006). Druga studija je pokazala da TNFR2 KO miševi imunizovani MOG peptidom (35-55) imaju pojačane simptome EAE-a (Tsakiri, 2012). Kod ovih miševa je pokazan povećan broj Th17 ćelija kako u kičmenoj moždini, tako i u perifernim limfnim organima. Takođe, u istim tkivima je detektovan smanjen broj i proliferativni kapacitet Foxp3<sup>+</sup> Treg, smanjen odlazak ovih ćelija u ciljna tkiva kao i njihova smanjena supresivna moć (Tsakiri, 2012). U revijskom radu Caminero i saradnici (Caminero, 2011) jasno ukazuju na razdvajanje uloge TNFR1 i TNFR2 u razvoju EAE-a, navodeći angažovanje TNFR1 kao ključno za inflamaciju i demijelinizaciju, a angažovanje TNFR2 za ograničavanje patologije EAE-a. U ovoj doktorskoj disertaciji nije pokazana razlika u nivou ekspresije TNFR1 u CNS-u između AO i DA pacova, kao ni u različitim fazama EAE-a unutar soja. Kada je u pitanju ekspresija TNFR2, pokazano je da je ona viša u CNS-u DA pacova na piku bolesti u odnosu na AO pacove, kao i da je TNFR2 ekspresija kod DA pacova na piku bolesti statistički značajno viša u odnosu na fazu početka i na fazu oporavka unutar ovog soja. Ovi rezultati pokazuju da rezistentnost AO pacova na indukciju EAE-a nije posledica niti smanjene ekspresije TNFR1, niti povećane ekspresije TNFR2. Sa druge strane, može se pretpostaviti da je povećana ekspresija TNFR2 kod DA pacova na piku bolesti važna za otpočinjanje procesa oporavka kod ovih pacova.

Dualna uloga TNF i razdvajanje signalnog puta koji se pokreće vezivanjem sTNF za TNFR1 od onog koji se pokreće vezivanjem tmTNF za TNFR2 je moguće objašnjenje

zašto klinička studija u kojoj je za lečenje obolelih od MS-a korišćen neselektivni inhibitor TNF (lenercept) nije donela očekivane rezultate. Zato se predlaže selektivno blokiranje sTNF/TNFR1 ose, a očuvanje tmTNF/TNFR2 signalnog puta kao mogući pristup za tretman MS-a (Van Hauwermeiren, 2011). Korišćenjem selektivnog antagonista TNFR1 (PEG-R1antTNF) dobijaju se smanjeni klinički simptomi i demijelinizacija na početku EAE-a kod C57Bl/6 miševa imunizovanih MOG peptidom (35-55), kao i smanjena infiltracija Th1 i Th17 u CNS (Nomura, 2011). Kod istih miševa korišćenjem selektivnog inhibitora sTNF Xpro1595 došlo je do značajnog smanjenja kliničkih simptoma u odnosu na kontrolne miševe (Taoufik, 2011; Brambilla, 2011). U ovoj doktorskoj disertaciji nije pokazana razlika u nivou solubilnog TNF u homogenatima kičmene moždine između imunizovanih AO i DA pacova na piku bolesti. Ovo ostavlja prostor da se pretpostavi da bi povišen nivo TNF kod AO pacova mogao da bude posledica povišenog nivoa protektivnog transmembranskog TNF, zbog čega su AO pacovi rezistentni na indukciju EAE-a. Ova pretpostavka nije ispitana u našem istraživanju.

Tretman pacova neselektivnim inhibitorom etanerceptom nije imao uticaj na kliničku sliku imunizovanih DA pacova, osim što je smanjio trajanje bolesti. Ovo je u skladu sa podacima koje su dobili Taoufik i Brambilla (Taoufik, 2011; Brambilla, 2011) gde, za razliku od primene selektivnog inhibitora za solubilnu formu TNF (Xpro1595), primena etanercepta nije dovela do poboljšanja EAE-a kod imunizovanih miševa. Postoji skorašnji podatak druge grupe autora koji su kod C57Bl/6 miševa imunizovanih MOG peptidom (35-55) dobili odložen početak i smanjenu incidencu bolesti korišćenjem etanercepta, ali kod već uspostavljene bolesti, tretman nije uticao na njenu težinu (Batoulis, 2013). Razlike između rezultata ove doktorske disertacije i rezultata koje su dobili Batoulis i saradnici mogu se pripisati različitom načinu tretmana životinja, pošto je protokol korišćen ovde (preuzet iz Taoufik, 2011; Brambilla, 2011) podrazumevao subkutanu aplikaciju etanercepta počevši od pojave prvih simptoma bolesti, dok su Batoulis i saradnici etanercept primenjivali intraperitonealno počevši već tri dana nakon imunizacije. Dalje, tretman AO pacova etanerceptom nije doveo do razvoja EAE-a. Međutim, iz svega gore navedenog, neselektivnom inhibicijom TNF blokiraju se njegova pro-inflamatorna, ali i imunosupresivna svojstva, pa tretman AO pacova etanerceptom verovatno nije dovoljan za prevazilaženje njihove rezistencije na

indukciju bolesti. Takođe, rezistentnost AO pacova verovatno nije posledica samo povećane ekspresije TNF, te multifaktorijalnost može biti razlog neprevazilaženja njihove rezistencije korišćenjem etanercepta (Miljkovic, 2006a).

Razlike u nivou IL-10 i TNF između imunizovanih DA i AO pacova se barem delimično mogu objasniti razlikama u ekspresiji ovih citokina u CD4<sup>+</sup> ćelijama infiltrata kičmene moždine. Naime, CD4<sup>+</sup> ćelije koje infiltriraju u CNS-u pokazuju veću ekspresiju IL-10 kod DA pacova u odnosu na iste ćelije AO soja. Mnogi radovi govore o važnosti produkcije IL-10 tokom razvoja EAE-a od strane T-ćelija. Tako je pokazano da T-ćelije Lewis pacova reaktivirane MBP-om ekspimiraju IL-10 (Sun, 1995), kao i da encefalitogena T ćelijska linija izolovana iz imunizovanih DA pacova produkuje ovaj citokin (Lenz, 1999). Th2 ćelije su pokazale sposobnost suprimiranja EAE-a u mišjem modelu, upravo preko IL-10 (Stohlman, 1999). Pored toga što je pokazano da klasične Treg ćelije koje produkuju IL-10 štite od EAE-a i u pasivnom transferu mogu da indukuju tolerancu (Rynda-Apple, 2011), zanimljivo je da je pokazano da od Th1 ćelijske populacije mogu da nastanu Treg ćelije odgovorne za suprimiranje EAE-a koje ne ekspimiraju Foxp3, a pored IFN- $\gamma$  sintetišu i IL-10 (Gabrisova, 2010). Takođe, i Th17 ćelije mogu da produkuju IL-10 i ovakve Th17 ćelije dovode do slabijeg razvoja EAE-a prilikom pasivnog transfera (Zhang, 2011). Ovaj mehanizam autoregulatorne povratne sprege koriste CD4<sup>+</sup> ćelije kako bi ograničile produkciju pro-inflamatornih citokina (Huss, 2011), pokazujući važnost produkcije IL-10 od strane CD4<sup>+</sup> ćelija za oporavak od bolesti. Zanimljivo je da su rezultati ove doktorske disertacije pokazali da u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora izolovanim u induktivnoj fazi bolesti razlika u nivou IL-10 postoji u korist imunizovanih DA pacova, dok razlike između AO i DA pacova nema u CD4<sup>+</sup> ćelijama ovih organa. Ranije je objavljen podatak da u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora nema razlike u produkciji IL-10 između imunizovanih AO i DA pacova na početku EAE-a (Lukić, 2001). Zajedno sa našim rezultatima ovo ukazuje na verovatnoću da milje CNS-a u inflamaciji kod imunizovanih DA pacova dovodi do povećane ekspresije IL-10 od strane infiltrirajućih CD4<sup>+</sup> ćelija, u cilju oporavka od EAE-a.

Kada je u pitanju TNF, ova doktorska disertacija je pokazala da CD4<sup>+</sup> koje infiltriraju u CNS tokom razvoja EAE-a produkuju ovaj citokin. Iako su Renno i saradnici (Renno,

1995) identifikovali makrofage kao osnovne proizvođače TNF među infiltrirajućim ćelijama CNS-a, postoje i literaturni podaci koji ukazuju na važnost CD4<sup>+</sup> ćelija. Kruglov i saradnici (Kruglov, 2011) pokazuju da su pored mijeloidnih ćelija upravo T-ćelije ključni izvor TNF tokom razvoja EAE-a. Dalje, ova disertacija je pokazala da nema razlike u nivou TNF između imunizovanih AO i DA pacova u perifernim limfnim organima, već da su ove razlike uočene u ciljnom tkivu (CNS). Ranije je pokazano da se aktivacioni status CD4<sup>+</sup> T ćelija ne razlikuje u ćelijama periferne krvi, već u CNS-u imunizovanih AO i DA pacova, odnosno da DA pacovi imaju veći broj aktiviranih, a manji broj naivnih CD4<sup>+</sup> ćelija u CNS-u u odnosu na AO soj (Miljković, 2011b). Takođe, pokazano je da se imunizovani AO i DA pacovi razlikuju po ekspresiji IL-17 i IFN- $\gamma$  u infiltratima CNS-a, ali da se ove razlike gube kada se ćelije restimulišu i gaje u kulturi (Miljković, 2011b). U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da nakon imunizacije upravo CD4<sup>+</sup> ćelije infiltrata rezistentnih AO pacova imaju veću ekspresiju TNF u odnosu na podložni DA soj. Ovi rezultati, zajedno sa rezultatima vezanim za IL-10 doprinose pretpostavci da je mijel CNS-a odgovoran za primećene razlike u podložnosti indukciji EAE-a između AO i DA soja.

O ulozi IL-10 i TNF u razvoju EAE-a posredno govori *in vivo* tretman metilprednizolonom koji dovodi do poboljšanja kliničke slike imunizovanih DA pacova. Tretman MP-om ne dovodi do povećanja ekspresije IL-10 u homogenatima kičmene moždine DA pacova. Kako se povećanje ekspresije IL-10 inače događa nakon imunizacije u odsustvu tretmana, može se zaključiti da u uslovima smanjene inflamacije do kojih dovodi MP nema ni potrebe za povećanom ekspresijom ovog citokina. Međutim, ono što je zanimljivo je da MP ipak dovodi do povećane ekspresije ovog anti-inflamatornog citokina u infiltratima kičmene moždine. Kao što je prethodno pokazano MP smanjuje ekspresiju i produkciju pro-inflamatornih citokina u infiltratima CNS-a u DA pacova (Miljković, 2009), a sada se njegovom pozitivnom efektu u tretmanu EAE-a može dodati i sposobnost povećanja ekspresije anti-inflamatornog citokina IL-10, kao mehanizma za ograničavanje neuroinflamacije. Ipak, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da *in vitro* tretman astrocita MP-om dovodi do smanjenja ekspresije IL-10. Od ranije se zna da MP može različito da deluje na različite tipove ćelija, npr smanjuje broj aktiviranih i memorijskih CD8<sup>+</sup> ćelija, a povećava broj naivnih i regulatornih ćelija kod pacijenata obolelih od MS-a (Aristimuno, 2008). Takođe, zna se da u povređenom

CNS-u glukokortikoidi mogu da dovedu i do pro-inflamatornog odgovora, u zavisnosti od primenjene koncentracije (Sorrells, 2007). Na osnovu navedenog, moguće je zaključiti da u EAE-u koji se indukuje u našoj laboratoriji MP ima različit uticaj na ćelije koje infiltriraju CNS i na astrocite koji predstavljaju rezidentnu ćelijsku populaciju, ali sumarno dovodeći do smanjenja EAE-a kod DA pacova.

Tretman DA pacova MP-om smanjuje ekspresiju TNF u homogenatima kičmene moždine, pri tome ne utičući na ekspresiju ovog citokina u ćelijama koje infiltriraju CNS. Pokazano je da MP zapravo deluje na astrocite, ćelije koje su identifikovane kao osnovni proizvođači TNF u CNS-u pacijenata obolelih od MS-a (Cannella i Raine, 1995). Oba primećena fenomena mogu biti protumačena kao pozitivno delovanje TNF na smanjenje inflamacije u CNS-u tokom EAE-a. Naime, smanjenje ekspresije TNF u astrocitima pod delovanjem MP-a može se tumačiti kao smanjenje potencijalnog štetnog delovanja koje TNF ispoljava tokom razvoja EAE-a, kao što je npr. njegova citotoksičnost za oligodendrocite (Selmaj i Raine, 1988). Sa druge strane, izostanak uticaja MP-a na ekspresiju TNF u ćelijama koje infiltriraju CNS takođe se može posmatrati kao pozitivno delovanje TNF na smanjenje inflamacije tokom razvoja EAE-a. Zanimljivo je da sam TNF posredno može da dovode do sekrecije glukokortikoida (Bernardi, 1990), pa bi očuvanje njegove lokalne produkcije u infiltratima moglo da bude blagotvorno, dovodeći da sekrecije glukokortikoida od strane neurona i na taj način umanjujući inflamaciju. Dalje, pokazano je da je jedan od mehanizama kojima MP dovodi do neuroprotekcije apoptoza T-ćelija koje infiltriraju CNS (Smidh, 2000). Sa druge strane, pokazano je da je sprovođenje signala preko TNFR1 odgovorno za apoptozu T-limfocita u inflamatornim lezijama miševa kod kojih je indukovana EAE (Bachmann, 1999). Dakle, očuvanje lokalne produkcije TNF od strane infiltrišućih ćelija CNS-a pod delovanjem MP bi moglo za posledicu imati indukciju apoptoze u T-ćelijama. Kada je u pitanju poređenje AO i DA pacova, veća stopa apoptoze je primećena u infiltratima rezistentnog AO soja (Lukić, 2001; Miljković, 2011b). Lukić i sar. su smanjenu stopu apoptoze kod DA podložnog soja objasnili izostankom delovanja TGF- $\beta$  na indukciju apoptoze. Kako je u ovoj disertaciji pored povišenog nivoa TGF- $\beta$  pokazan i povišen nivo TNF kod AO u odnosu na DA pacove, može se pretpostaviti da ova dva citokina zajedno doprinose rezistenciji AO soja indukujući apoptozu u ćelijama

koje infiltriraju CNS. Takođe, iz ovih rezultata je moguće zaključiti da TNF u CNS-u može da ima različitu ulogu u zavisnosti od tipa ćelija koje ga proizvode.

Konačno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da ispitivani citokini utiču na razvoj EAE-a povećanjem ekspresije CXCL12 hemokina u astrocitima. CXCL12 je molekul koji može da ograniči neuroinflamaciju tokom razvoja EAE-a (Momčilović, 2012). Pokazano je da CXCL12 inhibira EAE limitirajući prelazak imunskih ćelija iz perivaskularnog prostora u parenhim CNS-a (Mc Candles, 2006; 2008). Dalje je pokazano da CXCL12 dovodi do promene polarizacije Th1 ćelija u regulatorne ćelije koje sekretuju IL-10 (Meiron, 2008), kao i da može da dovede do apoptoze CD4<sup>+</sup> T-ćelija (Colamussi, 2001). U našoj laboratoriji je pokazano da je ekspresija CXCL12 kod AO pacova rezistentnih na EAE veća nego kod DA pacova koji podležu bolesti, kao i da primena inhibitora ovog hemokina dovodi do prevazilaženja rezistencije AO pacova na indukciju EAE-a (Miljković, 2011b). Astroцити su najpotentniji producenti CXCL12 u CNS-u obolelih od MS-a (Ambrosini, 2005). Takođe, oni imaju veoma važnu regulatornu ulogu u neuroinflamaciji (Miljković, 2011c). Ekspresijom CXCL12 astroцити mogu da privuku nezrele dendritske ćelije u CNS (Ambrosini, 2005) koje zatim, pod delovanjem IL-10 mogu da kontrolišu pro-inflamatorni odgovor u MS-u (Adikari, 2004). Kako je ova doktorska disertacija pokazala da IL-10 dovodi do povećanja ekspresije CXCL12 zanimljivo je pretpostaviti da IL-10 i CXCL12 u CNS-u DA pacova deluju jedan na drugog mehanizmom pozitivne povratne sprege. IL-10 koji je povišen u CNS-u DA pacova nakon imunizacije stimuliše ekspresiju CXCL12 u astrocitima. Ekspresija CXCL12 dovodi do još veće produkcije IL-10 od strane T-ćelija, kao i do privlačenja nezrelih dendritskih ćelija u CNS. Nezrele dendritske ćelije pod dejstvom IL-10 dovode do stvaranja pozitivnog miljea za razrešavanje neuroinflamacije, pa tako CXCL12 i IL-10 zajedno doprinose oporavku DA pacova od EAE-a. Sa druge strane, zna se da je TNF bitan za kretanje leukocita jer utiče na ekspresiju hemokina (Sedgwick, 2000). Međutim, njegov uticaj na povećanje ekspresije neuroprotektivnog CXCL12 bi mogao da bude jedan od faktora koji doprinose rezistenciji AO pacova na indukciju EAE-a.

Sumarno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da bi IL-10 mogao da bude važan faktor za otpočinjanje oporavka od EAE-a kod DA pacova, dok bi TNF i TGF- $\beta$  mogli



da imaju ulogu u smanjenju inflamacije, odnosno da predstavljaju faktore koji dovode do rezistencije AO pacova na indukciju bolesti.

# 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, a u skladu sa postavljenim ciljevima, došli smo do sledećih zaključaka:

- Ekspresija i produkcija IL-10 je veća kod DA u odnosu na AO pacove u drenirajućim limfnim čvorovima izolovanim u induktivnoj fazi bolesti, dok ove razlike nema u CD4<sup>+</sup> T-ćelijama ovih organa izolovanim u istoj fazi;
- Nema razlike u ekspresiji i produkciji TNF u drenirajućim limfnim čvorovima AO i DA pacova izolovanim u induktivnoj fazi bolesti, kao ni u CD4<sup>+</sup> T-ćelijama ovih organa izolovanim u istoj fazi;
- Ekspresija i produkcija IL-10 je veća u homogenatima CNS i infiltratima imunskih ćelija u kičmenoj moždini, kao i u CD4<sup>+</sup> T-ćelijama infiltrata kičmene moždine kod DA u odnosu na AO pacove na piku bolesti;
- Ekspresija TGF- $\beta$  je veća u homogenatima CNS i infiltratima imunskih ćelija u kičmenoj moždini, kao i u CD4<sup>+</sup> T-ćelijama infiltrata kičmene moždine kod AO u odnosu na DA pacove na piku bolesti;
- Ekspresija i produkcija TNF je veća u homogenatima i infiltratima imunskih ćelija u kičmenoj moždini, kao i u CD4<sup>+</sup> ćelijama infiltrata kičmene moždine kod AO u odnosu na DA pacove na piku bolesti;
- Tretman imunizovanih DA pacova metilprednizolonom dovodi do smanjenja ekspresije IL-10 u homogenatima kičmene moždine, kao i u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita, dok u infiltratima imunskih ćelija kičmene moždine povećava ekspresiju IL-10;
- Tretman imunizovanih DA pacova metilprednizolonom dovodi do smanjenja ekspresije TNF u homogenatima kičmene moždine, kao i u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita, ali ne utiče na ekspresiju TNF u infiltratima imunskih ćelija kičmene moždine;

- Tretman etanerceptom ne utiče na klinički tok EAE-a kod AO i DA pacova;
- IL-10 i TNF dovode do povećanja ekspresije CXCL12 u primarnoj ćelijskoj kulturi astrocita.

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje doprinosa IL-10, tipičnog anti-inflamatornog i TNF, tipičnog pro-inflamatornog citokina podložnosti, odnosno rezistenciji na indukciju EAE-a korišćenjem AO/DA modela. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da bi IL-10 mogao biti važan za oporavak DA pacova od EAE-a, dok bi TNF mogao biti jedan od faktora koji dovode do rezistencije AO pacova na indukciju bolesti.

# **7.LITERATURA**

1. Abromson-Leeman S, Bronson RT, Dorf ME. Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR $\gamma$ t consistently produce IFN $\gamma$  but have a spectrum of IL-17 profiles. *J Neuroimmunol.* 2009, 215:10–24.
2. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, Wherry EJ, Onami T, Lanier JG, Kokko KE, Pearson TC, Ahmed R, Larsen CP. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest.* 2003, 111:1887–1895.
3. Adikari SB, Pettersson A, Soderstrom M, Huang YM, Link H. Interleukin-10-modulated immature dendritic cells control the proinflammatory environment in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2004, 59:600–606.
4. Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF $\alpha$ . In *Cytokine Reference* Edited by: Oppenheim JJaFM. London: Academic Press; 2000a:414-434.
5. Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF Receptors. In *Cytokine Reference* Edited by: Oppenheim JJaFM. London: Academic Press; 2000b:1620-1632.
6. Aharoni R. New findings and old controversies in the research of multiple sclerosis and its model experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev.Clin. Immunol.* 2013, 9:423-440.
7. Alanära T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomäki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scand J Rheumatol.* 2010, 39:118–126.
8. Alexopoulou L, Kranidioti K, Xanthoulea S, Denis M, Kotanidou A, Douni E, Blackshear PJ, Kontoyiannis DL, Kollias G. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2006, 36:2768-2780.
9. Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM. Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005, 64:706-715.
10. Aristimuño C, Navarro J, de Andrés C, Martínez-Ginés L, Giménez-Roldán S, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S. Expansion of regulatory CD8 $^{+}$  T-lymphocytes and fall of activated CD8 $^{+}$  T-lymphocytes after i.v. methyl-

- prednisolone for multiple sclerosis relapse. *J Neuroimmunol.* 2008, 204:131-135.
11. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci.* 2001, 4:1116-1122.
  12. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003, 55:241–269.
  13. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol.* 2007a, 61:288–299.
  14. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann. Neurol.* 2007b, 61:504–13.
  15. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010, 9:599–612.
  16. Babbe, H. Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansion of CD8 T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 2000, 192:393–404.
  17. Bachmann R, Eugster HP, Frei K, Fontana A, Lassmann H. Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol.* 1999, 154:1417-1422.
  18. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005, 280:35760-35766.
  19. Balashov KE, Comabella M, Ohashi T, Khoury SJ, Weiner HL. Defective regulation of IFN- $\gamma$  and IL-12 by endogenous IL-10 in progressive MS. *Neurology* 2000, 55:192–198.
  20. Baranzini SE, Nickles D. Genetics of multiple sclerosis: swimming in an ocean of data. *Curr Opin Neurol.* 2012, 25:239-245.

21. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004, 55:458–468.
22. Batoulis H, Recks MS, Holland FO, Thomalla F, Williams RO, Kuerten S. Blockade of TNF- $\alpha$  in experimental autoimmune encephalomyelitis reveals differential effects on the antigen-specific immune response and central nervous system histopathology. *Clin Exp Immunol*. 2013 Sep 24. doi: 10.1111/cei.12209. [Epub ahead of print]
23. Bauer J, Bradl M, Hickey WF, Forss-Peter S, Breitschopf H, Li-nington C, Wekerle H, Lassmann H. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 1998, 153:715–724.
24. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand*. 1988, 78:318-323.
25. Bernardini R, Kamilaris TC, Calogero AE, Johnson EO, Gomez MT, Gold PW, Crousos GP. Interactions between tumor necrosis factor  $\alpha$ , hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinology*. 1990, 126:2876–2881.
26. Bettelli E, Baeten D, Jäger A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest*. 2006, 116:2393–2402.
27. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998, 161:3299-3306.
28. 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.
29. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 2000, 123:1174–1183.



30. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994, 172:151-154.
31. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1983, 62:219–232.
32. Boulland ML, Meignin V, Leroy-Viard K, Copie-Bergman C, Brière J, Touitou R, Kanavaros P, Gaulard P. Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 1998, 153:1229-37.
33. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2003, 3:725–731.
34. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, Bethea JR. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain*. 2011, 134:2736-54.
35. Broberg E, Setälä N, Røyttä M, Salmi A, Erälänna JP, He B, Roizman B, Hukkanen V. Expression of interleukin-4 but not of interleukin-10 from a replicative herpes simplex virus type 1 viral vector precludes experimental allergic encephalomyelitis. *Gene Ther*. 2001, 8:769-777.
36. Byrnes AA, McArthur JC, Karp CL. Interferon- beta therapy for multiple sclerosis induces reciprocal changes in interleukin-12 and interleukin-10 production. *Ann Neurol*. 2002, 51:165–174.
37. Calabrese M, Favaretto A, Martini V, Gallo P. Grey matter lesions in MS: from histology to clinical implications. *Prion*. 2013, 7:20-27.
38. Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), anti-TNF- $\alpha$  and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol*. 2011, 234:1-6.
39. Cannella B, Gao YL, Brosnan C, Raine CS. IL-10 fails to abrogate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 1996, 45:735-746.
40. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1995, 37:424-435.

41. Capitani S. Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4 T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway. *J Leukoc Biol.* 2001, 69:263–270.
42. Cautain B, Damoiseaux J, Bernard I, van Straaten H, van Breda Vriesman P, Boneu B, Druet P, Saoudi A. Essential role of TGF-beta in the natural resistance to experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 2001, 31:1132-1140.
43. Chabot S, Yong VW. Interferon-beta-1b increases interleukin-10 in a model of T cell–microglia interaction: relevance to MS. *Neurology* 2000, 55:1497–1505.
44. Chen ML, Yan BS, Kozoriz D, Weiner HL. Novel CD8(+) regulatory T cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur J Immunol.* 2009, 39:3423–3435.
45. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013, 328:222-225.
46. Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet.* 2005, 14:1709-1725.
47. Colamussi ML, Secchiero P, Gonelli A, Marchisio M, Zauli G, Capitani S. Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4 T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway. *J Leukoc Biol.* 2001, 69:263–270.
48. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008, 372:1502-1517.
49. Crisi GM, Santambrogio L, Hochwald GM, Smith SR, Carlino JA, Thorbecke GJ. Staphylococcal enterotoxin B and tumor necrosis factor-alpha-induced relapses of experimental allergic encephalomyelitis: protection by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995, 25: 3035–3040.
50. Croxford JL, Olson JK, Miller SD. Epitope spreading and molecular mimicry as triggers of autoimmunity in the Theiler's virus-induced demyelinating disease model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2002, 1:251–260.
51. Cua DJ, Groux H, Hinton DR, Stohlman SA, Coffman RL. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1999, 189:1005-1010.

52. Dal Canto RA, Shaw MK, Nolan GP, Steinman L, Fathman CG. Local delivery of TNF by retrovirus-transduced T lymphocytes exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 1999, 90:10-14.
53. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991, 174:1209-1220.
54. Dendrou CA, Bell JI, Fugger L. A clinical conundrum: the detrimental effect of TNF antagonists in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics.* 2013, 14:1397-1404.
55. Diab A, Zhu J, Xiao B G, Mustafa M, Link H. High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997, 56:641-650.
56. Domonkos A, Udvardy A, Laszlo L, Nagy T, Duda E. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur Cytokine Netw.* 2001, 12:411-419.
57. Ebner F, Brandt C, Thiele P, Richter D, Schliesser U, Siffrin V, Schueler J, Stubbe T, Ellinghaus A, Meisel C, Sawitzki B, Nitsch R. Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol.* 2013, 191:5594-5602.
58. El-behi M, Rostami A, Ciric. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010, 5:189-197.
59. Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur J Immunol.* 1999, 29:626-632.
60. Farooqi N, Gran B, Constantinescu CS. Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem.* 2010, 115: 829–844.
61. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996, 156: 5–7.
62. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis. *Brain.* 1997, 120:393–399.

63. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994, 6:341-360.
64. Filippi CM, von Herrath MG. IL-10 and the resolution of infections. *J Pathol.* 2008, 214:224–230.
65. Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1991, 129:318-320.
66. Finbloom DS, Winestock KD.. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol.*1995, 155:1079–1090.
67. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989, 170:2081–2095.
68. 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.
69. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 2001, 14: 547–560.
70. Fluhner R, Grammer G, Israel L, Condrón MM, Haffner C, Friedmann E, Bohland C, Imhof A, Martoglio B, Teplow DB, Haass C. A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol.* 2006, 8:894-896.
71. Friedmann E, Hauben E, MaylandtK, Schlegler S, Vreugde S, Lichtenthaler SF, Kuhn PH, Stauffer D, Rovelli G, Martoglio B. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol.* 2006, 8:843-848.
72. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 2003, 100:171-94.

73. Furlan R, Cuomo C, Martino G. Animal models of multiple sclerosis. *Methods Mol Biol.* 2002, 549:157–173.
74. Gabrysová L, Nicolson KS, Streeter HB, Verhagen J, Sabatos-Peyton CA, Morgan DJ, Wraith DC. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *J Exp Med.* 2009, 206:175–167.
75. Gabrysová L, Wraith DC. Antigenic strength controls the generation of antigen-specific IL-10-secreting T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 2010, 40:1386-1395.
76. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994, 370:555-557.
77. Germain RN. Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology. *Nat Immunol.* 2012, 13:902-906.
78. Gimenez MA, Sim J, Archambault AS, Klein RS, Russell JH. A tumor necrosis factor receptor 1-dependent conversation between central nervous system-specific T cells and the central nervous system is required for inflammatory infiltration of the spinal cord. *Am J Pathol.* 2006, 168:1200-9.
79. Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, Lovett-Racke AE. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol.* 2007, 178:1341–1348.
80. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006, 129:1953–1971.
81. Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol.* 1990, 30:213-217.
82. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012, 248:87–103.
83. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, Poschmann G, Kaur G, Lambert L, Leach OA, Prömel S, Punwani D, Felce JH, Davis SJ, Gold R, Nielsen FC, Siegel RM, Mann M, Bell JI, McVean G, Fugger

- L. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012, 488:508-511.
84. Grewal IS. Overview of TNF superfamily: a chest full of potential therapeutic targets. *Adv Exp Med Biol*. 2009, 647:1-7.
  85. Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95:570-575.
  86. Grell M. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm*. 1995, 47:8-17.
  87. Griot C, Vandeveld M, Richard A, Peterhans E, Stocker R. Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun*. 1990, 11:181-193.
  88. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010, 5:499-503.
  89. Harashima S, Horiuchi T, Hatta N, Morita C, Higuchi M, Sawabe T, Tsukamoto H, Tahira T, Hayashi K, Fujita S, Niho Y. Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol*. 2001, 166:130-136.
  90. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006, 2:201-211.
  91. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991, 28:254-260.
  92. Higuchi M, Nagasawa K, Horiuchi T, Oike M, Ito Y, Yasukawa M, Niho Y. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation—characterization of membrane TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997, 82:133-140.
  93. Ho AS, Wei SH, Mui AL, Miyajima A, Moore KW. Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol Cell Biol*. 1995, 15:5043-5053.

94. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 1989, 170:607-612.
95. Hofmann SR, Rösen-Wolff A, Tsokos GC, Hedrich CM. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin Immunol.* 2012, 143:116-127.
96. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005a, 237:123–130.
97. Hofstetter HH, Targoni OS, Karulin AY, Forsthuber TG, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Does the frequency and avidity spectrum of the neuroantigen-specific T cells in the blood mirror the autoimmune process in the central nervous system of mice undergoing experimental allergic encephalo-myelitis? *J Immunol.* 2005a, 174:4598–4605.
98. Hoppenbrouwers IA, Hintzen RQ. Genetics of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1812:194–201.
99. Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. TGF- $\beta$  signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *Eur J Immunol.* 2011, 41:2987-2996.
100. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor super-family: structure function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000, 50:184-195.
101. Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol.* 2006, 176:2197-2207.
102. Issazadeh S, Lorentzen J C, Mustafa M I, Höjeberg B, Müssener A, Olsson T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol.* 1996, 69:103-115.
103. Issazadeh S, Mustafa M, Ljungdahl A, Höjeberg B, Dagerlind A, Elde R, Olsson T. Interferon gamma, interleukin 4 and transforming growth factor beta in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: dynamics of cellular

- mRNA expression in the central nervous system and lymphoid cells. *J Neurosci Res.* 1995, 40:579-590.
104. Iwahashi T, Koh CS, Inoue A, Yanagisawa N. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta production by isolated mononuclear cells from the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Tohoku J Exp Med.* 1997, 183:123-133.
  105. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006, 116:1218–1222.
  106. Jander S, Pohl J, D'Urso D, Gillen C, Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol.* 1998, 152:975-982.
  107. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest.* 1942, 21:571-577.
  108. Kalman B, Lublin FD. The genetics of multiple sclerosis. A review. *Biomed Pharmacother.* 1999, 53:358–370.
  109. Kassiotis G, Pasparakis M, Kollias G, Probert L. TNF accelerates the onset but does not alter the incidence and severity of myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1999a, 29:774-780.
  110. Kassiotis G, Bauer J, Akassoglou K, Lassmann H, Kollias G, Probert L. A tumor necrosis factor-induced model of human primary demyelinating diseases develops in immunodeficient mice. *Eur J Immunol.* 1999b, 29:912-917.
  111. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med.* 2001, 193:427-34.
  112. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol.* 1992, 149:2496–2505.



113. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor-beta, interleukin-4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992, 176:1355–1364.
114. Kirchner S, Boldt S, Kolch W, Haffner S, Kazak S, Janosch P, Holler E, Andreesen R, Eissner G. LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *J Leukoc Biol.* 2004, 75:324-331.
115. Klinkert WE, Kojima K, Lesslauer W, Rinner W, Lassmann H, Wekerle H. TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997, 72:163-168.
116. Klose J, Schmidt NO, Melms A, Dohi M, Miyazaki J, Bischof F, Greve B. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. *J Neuroinflammation.* 2013, 10:117.
117. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002, 169:4712–4716.
118. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007, 13:423–31.
119. Kornek B, Lassmann H. Axonal pathology in multiple sclerosis: a historical note. *Brain Pathol.* 1999, 9:651–656.
120. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive and remyelinated lesions. *Am J Pathol.* 2000, 157:267–276.

121. Kragstrup TW, Otkjaer K, Holm C, Jørgensen A, Hokland M, Iversen L, Deleuran B. The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine*. 2008, 41:16–23.
122. Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur. J Immunol*. 2009, 39:2031–2035.
123. Kruglov AA, Lampropoulou V, Fillatreau S, Nedospasov SA. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *J Immunol*. 2011, 187:5660-5670.
124. Kuerten S, Rottlaender A, Rodi M, Velasco VB, Jr., Schroeter M, Kaiser C, Addicks K, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. The clinical course of EAE is reflected by the dynamics of the neuroantigen-specific T cell compartment in the blood. *Clin Immunol*. 2010, 137:422–432.
125. Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol*. 1991, 34:159-164.
126. Kurtzke JF, Page WF, Murphy FM, Norman JE Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans. 4. Age at onset. *Neuroepidemiology*. 1992, 11:226-235.
127. Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Neves P, Shen P, Stervbo U, Boudinot P, Anderton SM, Fillatreau S. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol Rev*. 2010, 233:146–161.
128. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005, 201:233–240.
129. Laouar Y, Town T, Jeng D, Tran E, Wan Y, Kuchroo VK, Flavell RA. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105:10865-108670.
130. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005, 106:1901-1910.

131. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy, *Trends Mol Med.* 2001, 7:115-121.
132. Lassmann, H. Multiple sclerosis pathology. In McAlpine's Multiple Sclerosis (3rd edn) (Compston, A., ed.), Churchill Livingstone. 1998.
133. Lee TH, Huang Q, Oikemus S, Shank J, Ventura JJ, Cusson N, Vaillancourt RR, Su B, Davis RJ, Kelliher MA. The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2003, 23:8377-8385.
134. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of autoantigen. *Nature.* 1992, 358:155–157.
135. Lenz DC, Wolf NA, Swanborg RH. Strain variation in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999, 163:1763-1768.
136. Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol.* 2008, 84:116-131.
137. Li MO, Flavell RA. TGF-beta a master of all T cell trades. *Cell* 2008a, 134:392-404.
138. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008b, 28:468-476.
139. Libbey JE, Fujinami RS. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine.* 2011, 29:3356-3362.
140. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML: Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86:6348-6352.
141. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* 1998, 130:443–454.

142. Liu J, Marino MW, Wong G, Grail D, Dunn A, Bettadapura J, Slavin AJ, Old L, Bernard CC. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med.* 1998, 4:78-83.
143. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke.* 1994, 25:1481-1488.
144. Liu X, Alli R, Steeves M, Nguyen P, Vogel P, Geiger TL. The T cell response to IL-10 alters cellular dynamics and paradoxically promotes central nervous system autoimmunity. *J Immunol.* 2012, 189:669-678.
145. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med.* 2006, 12:518–525.
146. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bisho D, Misgeld T, Kerschensteiner M. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* 2011, 17:495–499.
147. LoPachin, RM, Lehning, EJ. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997, 143:233–244.
148. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996, 46:907–911.
149. Lukic ML, Mensah-Brown E, Galadari S, Shahin A. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Dev Immunol.* 2001, 8:193-200.
150. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 2002, 14:477-492.
151. Maimone D, Gregory S, Arnason BGW, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1991, 32:67-74.

152. Maloy K, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immunopathology. *Nat Immunol.* 2001, 2:816–822.
153. Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol. Immunol.* 2009, 47:141–146.
154. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.* 2004, 3:709–718.
155. Martin D, Near SL, Bendele A, Russell DA. Inhibition of tumor necrosis factor is protective against neurologic dysfunction after active immunization of Lewis rats with myelin basic protein. *Exp Neurol.* 1995, 131:221–228.
156. Matuszevicius D, Kivisaakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999, 5:101–104.
157. Maynard C, Weaver C. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 2008, 226:219–233.
158. McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS. Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008, 172:799–808.
159. McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006, 177:8053–8064.
160. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005, 175:3025–3032.
161. McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1995, 182:75–85.
162. Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2006, 6:557–569.

163. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med*. 2008, 205:2643–2655.
164. Menezes JS, van den Elzen P, Thornes J, Huffman D, Droin NM, Maverakis E, Sercarz EE. A public T cell clonotype within a heterogeneous autoreactive repertoire is dominant in driving EAE. *J Clin Invest*. 2007, 117:2176–2185.
165. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 2006, 84:431–442.
166. Merrill JE. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci*. 1991, 13:130-137.
167. Merrill JE. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immuno-deficiency syndrome. *J Immunother*. 1992, 12:167–170.
168. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004, 172:2731–2738.
169. Micheau O, Tschopp J: Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003, 114:181-190.
170. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012, 11:157–169.
171. Miljković Z, Momčilović M, Miljković D, Mostarica-Stojković M. Methylprednisolone inhibits IFN- $\gamma$  and IL-17 expression and production by cells infiltrating central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2009, 6:37.
172. Miljkovic D, Mostarica-Stojkovic M. Resistance to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis-a tool for studying pathogenesis of the central nervous system autoimmunity. *Iugoslavi Physiol Pharmacol Acta*. 2006a, 42:1-18.

173. Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Popadic D, Cvetkovic I, Mostarica-Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *J Neurosci Res.* 2006b, 84:379-388.
174. Miljković D, Momčilović M, Stanojević Z, Rašić D, Mostarica-Stojković M. It is still not for the old iron: adjuvant effects of carbonyl iron in experimental autoimmune encephalomyelitis induction. *J Neurochem.* 2011a, 118:205-214.
175. Miljković D, Stanojević Z, Momcilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology.* 2011b, 216:979-987.
176. Miljković D, Timotijević G, Mostarica Stojković M. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011c, 585:3781-3788.
177. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 2003, 24:36-43.
178. Momcilović M, Mostarica-Stojković M, Miljković D. CXCL12 in control of neuroinflammation. *Immunol Res.* 2012, 52:53-63.
179. Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001, 19:683-765.
180. Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, Stocker R, Trentz O, Kossmann T: Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry.* 1997, 2:133-136.
181. Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Cellular and genetic basis of the relative resistance to the induction of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in albino oxford (AO) rats. *Adv Exp Med Biol.* 1982, 149:699-702.
182. Mostarica-Stojković M, Vukmanović S, Ramić Z, Lukić ML. Evidence for target tissue regulation of resistance to the induction of experimental allergic encephalomyelitis in AO rats. *J Neuroimmunol.* 1992, 41:97-104.

183. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer TA, Kishimoto T. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93:14726-14729.
184. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol*. 1998, 10:179-185.
185. Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012, 42:26-34.
186. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Shibata H, Kayamuro H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Serada S, Naka T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Control Release*. 2011, 149:8-14.
187. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *New Engl J Med*. 2000, 343:938–952.
188. O'Connor P, Canadian Multiple Sclerosis Working Group. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. *Neurology*. 2002, 59(6 Suppl. 3):S1–S33.
189. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007, 7:425–428.
190. Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002, 8:500–508.
191. Ottoboni L, Frohlich IY, Lee M, Healy BC, Keenan BT, Xia Z, Chitnis T, Guttman CR, Houry SJ, Weiner HL, Hafler DA, De Jager PL. Clinical relevance and functional consequences of the TNFRSF1A multiple sclerosis locus. *Neurology*. 2013, 81:1891-1899.



192. Owens GP, Gilden D, Burgoon MP, Yu X, Bennett JL. Viruses and multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2011, 17:659–676.
193. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*. 1987, 1:893–895.
194. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004, 22:929–979.
195. Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett*. 2011, 585:3747-3757.
196. Pocsik E, Duda E, Wallach D: Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *J Inflamm*. 1995, 45:152-160.
197. Ponomarev ED, Dittel BN. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2005, 174:4678– 4687.
198. Ponomarev ED, Novikova M, Yassai M, Szczepanik M, Gorski J, Dittel BN. Gamma delta T cell regulation of IFN-gamma production by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells: correlation with recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2004, 173:1587–1595.
199. Porrini AM, Gambi D, Reder AT. Interferon effects on interleukin-10 secretion: mononuclear cell response to interleukin-10 is normal in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 1995, 61:27–34.
200. Prineas, JW. The neuropathology of multiple sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology*. (Vol 47. Demyelinating diseases) (Koetsier, J.C., ed.), pp. 337–395, Elsevier Science. 1985.
201. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92:11294-11298.
202. Raine CS, Bonetti B, Cannella B. Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated plaque. *Rev Neurol (Paris)*. 1998, 154:577-585.

203. Rao P, Hsu KC, Chao MV. Upregulation of NF-kappa B-dependent gene expression mediated by the p75 tumor necrosis factor receptor. *J Interferon Cytokine Res.* 1995, 15:171-177.
204. Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:15434–15439.
205. Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol.* 1995, 154:944-953.
206. Rieckmann P, Albrecht M, Kitzte B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Helwig A, Poser S. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol.* 1995, 37:82-88.
207. Rieckmann P, Albrecht M, Kitzte B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Poser S. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 1994, 44:1523.
208. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006, 212:28–50.
209. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 2001, 22:117–139.
210. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.* 1995, 83:1243-1252.
211. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1994, 78:681-692.
212. Rott O, Fleischer B, Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 1994, 24:1434-1440.

213. Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, Lingenheld EG, Grunnet ML, Padula SJ, Clark RB. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1990, 172:1193-1200.
214. Rudick RA, Ransohoff RM, Pepler R, VanderBrug Medendorp S, Lehmann P, Alam J. Interferon-beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1996, 40:618–627.
215. Rynda-Apple A, Huarte E, Maddaloni M, Callis G, Skyberg JA, Pascual DW. Active immunization using a single dose immunotherapeutic abates established EAE via IL-10 and regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011, 41:313-323.
216. Sadovnick AD, Baird PA. Sex ratio in offspring of patients with multiple sclerosis. *New Engl J Med.* 1982, 306:1114–1115.
217. Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, Corsini E, La Mantia L, Massa G, Nespolo A, Milanese C. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurol.* 1996, 243:13–17.
218. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol.* 1998, 188:118-124.
219. Santambrogio L, Crisi GM, Leu J, Hochwald GM, Ryan T, Thorbecke GJ. Tolerogenic forms of auto-antigens and cytokines in the induction of resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1995, 58:211-222.
220. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010, 10:170–181.
221. Schievella AR, Chen JH, Graham JR, Lin LL. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997, 272:12069-12075.
222. Schmidt J, Gold R, Schönrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV. T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain.* 2000, 123:1431-1441.
223. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein

- R, Kabelitz D, Schütze S. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*. 2004, 21:415-428.
224. Schönemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol*. 2008, 510:207-220.
225. Sean Riminton D, Körner H, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD. Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient, mice. *J Exp Med*. 1998, 187:1517-1528.
226. Seckinger P, Isaacs S, Dayer JM. A human inhibitor of tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1988, 167:1511-1516.
227. Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today*. 2000, 21:110-113.
228. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med*. 1998, 187:537-546.
229. Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990, 144:129-135.
230. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest*. 1991a, 87:949-954.
231. Selmaj K, Raine CS, Cross AH. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol*. 1991b, 30:694-700.
232. Selmaj K, Papierz W, Glabiński A, Kohno T. Prevention of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor I. *J Neuroimmunol*. 1995a, 56:135-141.
233. Selmaj KW, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology*. 1995b, 45:S44-49.

234. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol*. 1988, 23:339-346.
235. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1991, 325:467-472.
236. Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* 2008, 181:7205–7213.
237. Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93:13973-13978.
238. Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol*. 2006, 176:721-725.
239. Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1999, 103:807–815.
240. Sorrells SF, Sapolsky RM: An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun*. 2007, 21:259-272.
241. Sriram S, Steiner I Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2005, 58: 939–945.
242. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol*. 2005, 26: 565–571.
243. Steinman L. Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J Exp Med*. 1997, 185:2039-2041.
244. Stohlman SA, Pei L, Cua DJ, Li Z, Hinton DR. Activation of regulatory cells suppresses experimental allergic encephalomyelitis via secretion of IL-10. *J Immunol*. 1999, 163:6338-6344.
245. Storch MK, Bauer J, Linington C, Olsson T, Weissert R, Lassmann H. Cortical demyelination can be modeled in specific rat models of autoimmune

- encephalomyelitis and is major histocompatibility complex (MHC) haplotype-related. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006, 65:1137–1142.
246. Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol*. 2004, 136:49-55.
247. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006a, 1: 1810–1819.
248. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006b, 1: 1952–1960.
249. Sun D, Hu X Z, Shah R, Coleclough C. The pattern of cytokine gene expression induced in rat T cells specific for myelin basic protein depends on the type and quality of antigenic stimulus. *Cell Immunol* 1995, 166:1-8.
250. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009, 31:331–341.
251. Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, Dal Canto MC, Barrett TA, Miller SD. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2000, 205:24-33.
252. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999, 10:39–49.
253. Tansey MG, Wyss-Coray T. Cytokines in CNS inflammation and disease. In *Central Nervous System Diseases and Inflammation* Edited by: Lane TE, Carson M, C B, T W-C. W-C: Springer; 2008.
254. Tanuma N, Kojima T, Shin T, Aikawa Y, Kohji T, Ishihara Y, Matsumoto Y. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1997, 73:197-206.

255. Tanuma N, Shin T, Matsumoto Y. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol.* 2000, 108:171-180.
256. Taoufik E, Tseveleki V, Chu SY, Tselios T, Karin M, Lassmann H, Szymkowski DE, Probert L. Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor-kappaB. *Brain.* 2011, 134:2722-2735.
257. Targoni OS, Baus J, Hofstetter HH, Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Forsthuber TG, Lehmann PV.. Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 2001, 166:4757–4764.
258. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* 1993, 268:18542-18548.
259. Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ. Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-alpha gene and their associations with multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet.* 2003, 11:509-515.
260. Tischner D, Reichardt HM. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol.* 2007, 275:62-70.
261. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008, 31:247-269.
262. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl J Med.* 1998, 338:278–285.
263. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007, 204:239–243.
264. Tsakiri N, Papadopoulos D, Denis MC, Mitsikostas DD, Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3+ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *Eur J Immunol.* 2012, 42:403-412.
265. Tuohy VK, Yu M, Yin L, Mathisen PM, Johnson JM, Kawczak JA. Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development

- of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2000, 111:55–63.
266. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008, 172:146–155.
267. van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Dräger AM, Adèr HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12-p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1999, 45:695–703.
268. Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011, 22:311-319.
269. Villarroya H, Marie Y, Ouallet JC, Le Saux F, Tchélingérian JL, Baumann N. Expression of TNF alpha in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. *J Neurosci Res.* 1997, 49:592-599.
270. Vukmanović S, Mostarica Stojković M, Lukić ML. Experimental autoimmune encephalomyelitis in "low" and "high" interleukin 2 producer rats. I. Cellular basis of induction. *Cell Immunol.* 1989, 121:237-246.
271. Vukmanović S, Mostarica-Stojković M, Zalud I, Ramić Z, Lukić ML. Analysis of T cell subsets after induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in susceptible and resistant strains of rats. *J Neuroimmunol.* 1990, 27:63-69.
272. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2000, 165:548–557.
273. Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, Bloomfield G, Wallach D, Roufogalis BD, Chaudhri G: A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* 1999, 18:2119-2126.



274. Waubant E, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Cotleur A, Rudick R, Goodkin D. Relationship between serum levels of IL-10, MRI activity and interferon beta-1a therapy in patients with relapsing remitting MS. *J Neuroimmunol.* 2001, 112:139–145.
275. Weiss HA, Millward JM, Owens T. CD8+T cells in inflammatory demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 2007, 191:79–85.
276. Weissert R, Wallström E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, Olsson T. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest.* 1998, 102:1265–1273.
277. Wekerle H. Immunology of multiple sclerosis. In McAlpine's Multiple Sclerosis (3rd edn) (Compston, A., ed.), Churchill Livingstone. 1998.
278. Willenborg DO, Fordham SA, Cowden WB, Ramshaw IA. Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scand J Immunol.* 1995, 41:31-41.
279. Winston BW, Lange-Carter CA, Gardner AM, Johnson GL, Riches DW. Tumor necrosis factor alpha rapidly activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade in a MAPK kinase kinase-dependent, c-Raf-1-independent fashion in mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92:1614-1618.
280. Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. Suppression of acute and protracted-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by nasal administration of low-dose IL-10 in rats. *J Neuroimmunol.* 1998, 84:230-237.
281. Yang Y, Weiner J, Liu Y, Smith AJ, Huss DJ, Winger R, Peng H, Cravens PD, Racke MK, Lovett-Racke AE. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med.* 2009, 206:1549– 1564.
282. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittleman B, Schiffman R, Payne S, Longenecker G, Mozes E, Karlsson S. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood.* 1996, 87:1439-1445.
283. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012, 491:264-268.

284. Zargarova T, Kulakova O, Prassolov V, Zharmukhamedova T, Tsyganova V, Turobov V, Ivanov D, Parfenov M, Sudomoina M, Chernajovsky Y, Favorova O. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats by grafting primary skin fibroblasts engineered to express transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol.* 2004, 137:313-319.
285. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One.* 2011, 6:e28432.
286. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009, 30:646–655.

**Lista najčešće korišćenih skraćenica:**

MS- multipla skleroza

CNS- centralni nervni sistem

CD- cluster of differentiation (eng.)

MHC- major histocompatibility complex (eng.)

GWAS- genome wide association studies (eng.)

IL- interleukin

IFN- interferon

Th- T helper (eng.)

TNF- tumor necrosis factor (eng.)

EAE-eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

MBP- mijelin bazni protein

PLP- proteolipidni protein

MOG- mijelin oligodendrocitni glikoprotein

TCR- T cell receptor (eng.)

DA- Dark Agouti

BN- Brown Norway

AO- Albino Oxford

iRNK- informaciona ribonukleinska kiselina

TACE- TNF-alpha converting enzyme (eng.)

SCH- spinal cord homogenate (eng.)

PBS- phosphate buffer saline (eng.)

CFA- complete Freund's adjuvant (eng.)

d.p.i.- dan posle imunizacije

MP- metilprednizolon

FCS- fetal calf serum (eng.)

RS- rat serum (eng.)

BSA- bovine serum albumin (eng.)

GFAP- glial fibrillary acidic protein (eng.)

ConASn- konkanavalin A supernatant

DEPC- diethylpyrocarbonate (eng.)

PCR- polymerase chain reaction (eng.)

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay (eng.)

dNTP- dezoksiribonukleotid-trifosfat

PMA- phorbol myristate acetate (eng.)

PB- permeabilization buffer (eng.)

KO- knockout (eng.)

## **Biografija**

Jana (Vladimir) Blaževski rođena je 29.08.1984. u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004 na studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija i isti završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,6. Diplomski rad pod naslovom: „Efekat rezveratrola i oleuropeina na gensku ekspresiju i produkciju IL-17 i IFN- $\gamma$  u ćelijama limfnog čvora pacova”, pod mentorstvom dr Đorđa Miljkovića, završila je sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisala 2010/2011. godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9.82.

Jana Blaževski se 2011. godine zaposlila kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “Ćelijski i molekularni mehanizmi oporavka pacova od eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa” (ON173035) pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića. Zvanje istraživač saradnik stiče januara 2012. godine. Jana Blaževski je do sada učestvovala kao autor/koautor na 6 radova u međunarodnim časopisima, ima četiri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i deset saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Jana Blaževski je aktivni član Društva imunologije Srbije, Društva za Neuronauke Srbije i Biohemijškog društva Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Jana Blaževski

број уписа B 3024 / 2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Експресија, продукција и могућа улога interleukina 10 и фактора некрозе тумора током експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса у пасова сојева АО и ДА

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

Потпис докторанда

У Београду, 13.03.2014.

Jana Blaževski

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Jana Blaževski

Број уписа: В 3024 / 2010

Студијски програм: Биологија-Имунологија

Наслов рада: Експресија, продукција и могућа улога интерлеукина 10 и фактора некрозе тумора током експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса у пасова сојева АО и DA

Ментор: dr Miljana Momčilović

Потписани: Jana Blaževski

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 13.03.2014.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Ekspresija, produkcija i moguća uloga interleukina 10 i faktora nekroze tumora tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa u pacova sojeva AO i DA

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 13.03.2014.

*Јана Blažewski*

---



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

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

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

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

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

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