

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

mr Danijela Savić

**UTICAJ PURINSKIH NUKLEOZIDNIH
ANALOGA, RIBAVIRINA I TIAZOFURINA,
NA AKTIVACIJU MIKROGLIJE U
USLOVIMA INFLAMACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

MSc Danijela Savić

**THE EFFECT OF PURINE NUCLEOSIDE
ANALOGUES, RIBAVIRIN AND
TIAZOFURIN, ON MICROGLIAL
ACTIVATION UNDER INFLAMMATORY
CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

Dr Sanja Peković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Članovi komisije:

Dr Irena Lavrnja, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Dr Biljana Božić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Datum odbrane: _____2012. godine

ZAHVALNICA

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za Neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom prof dr Mirjane Stojiljković.

Najveću zahvalnost dugujem upravo prof dr Mirjani Stojiljković koja je oblikovala moj naučno-istraživački rad počevši od diplomskog rada, magistarske teze i sada doktorske disertacije. Velika je stvar kada vam neko otvori vrata neurobiologije i poželi dobrodošlicu u taj neverovatni svet, a to je ona učinila za mene.

Dr Sanji Peković, mom mentoru, se zahvaljujem baš na tome, na mentorisanju, jer bez dobrih mentora nema kvalitetnih kandidata.

Dr Nadeždi Nedeljković se zahvaljujem na ukazanom poverenju da kao član komisije učestvuje u odbrani ovog rada, kao i na kritičkom čitanju i sugestijama kako da posmatram dobijene rezultate iz različitih perspektiva.

Dr Ireni Lavrnji veliko hvala jer je uvek bila tu da mi pomogne i podeli svoje znanje i iskustvo sa mnom, ali pre svega hvala joj na tome što svaki dan na poslu demonstrira efikasnost.

Dr Biljani Božić se zahvaljujem jer je ona zaslužna za moje prve korake u u ćelijskoj kulturi.

Posebno se zahvaljujem dr Tomasu Herdegenu, koji mi je ukazao poverenje i priužio mogućnost tri meseca obuke u njegovoj laboratoriji kako bi stekla i usavršila znanje o mikroglijskoj ćelijskoj kulturi.

Veliko hvala mojim kolegicama, Sanji, Ivani, Ani i Ivi, za dobru atmosferu u labu, za radnu atmosferu u labu, ali pre svega za prijateljsku atmosferu u labu.

Hvala devojkama iz laboratorije 32, našim susedima, što su uvek spremne za naturalnu i intelektualnu razmenu, jer nauka u Srbiji ne može ništa bez dobrosusedskih odnosa.

Hvala mom suprugu Nenadu, na ljubavi i podršci. Posebno mu se zahvaljujem na pomoći u izvođenju morfometrijskih analiza u ovoj disertaciji, što je iziskivalo dosta strpljivog rada.

Hvala mojim roditeljima i bratu, što su uvek i bespogovorno tu za mene.

Uticaj purinskih nukleozidnih analoga, ribavirina i tiazofurina, na aktivaciju mikroglije u uslovima inflamacije

REZIME:

Aktivacija mikroglije jedno je od glavnih obeležja eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE) i drugih neuroloških poremećaja koje odlikuje hronična inflamacija. Cilj ove studije bio je da se proceni sposobnost dva analoga purinskih nukleozida, ribavirina (RBV) i tiazofurina (TR), da modulišu inflamatorni odgovor aktivirane mikroglije, *in vivo* i *in vitro*.

U *in vivo* studiji, koja je izvedena na EAE modelu indukovanom ubrzavanjem encefalitogene emulzije u šapu Dark Agouti pacova, pokazano je da tretman životinja kombinacijom oba analoga, počev od pojave prvih simptoma pa tokom sledećih 15 dana, dovodi do smanjenja težine bolesti, a na histološkom planu do smanjenja broja i stepena aktivacije mikroglije. Budući da kombinovani tretman RBV i TR dovodi do supresije simptoma EAE i do redukcije reaktivne mikroglioze, formulisana je hipoteza da ovaj tretman, pored ranije opisanih sistemskih efekata u imunskom i vaskularnom sistemu, ostvaruju centralni efekat i to delujući prvenstveno na ćelije mikroglije.

Uticaj RBV i TR, kao i kombinovane primene oba analoga detaljnije je ispitan u primarnoj kulturi mikroglijskih ćelija. Aktivacija mikroglije, indukovana lipopolisaharidom bakterijskog zida gram negativnih bakterija, (LPS), izazvala je tipičan odgovor reaktivne mikroglioze. Antiinflamatorni potencijal RBV, TR i RBV+TR ispitan je u pogledu citotoksičnosti, indukcije morfoloških promena, produkcije azot monoksida (NO), oslobađanja proinflamatornih citokina i nuklearne translokacije NF- κ B. Ispitan je citotoksični potencijal RBV (1 – 20 μ M), TR (1 – 20 μ M) i kombinovanog tretmana (10 μ M RBV + 5 μ M TR) i određene su EC₅₀ doze pri kojima se postiže polovina maksimalnog citotoksičnog efekta. RBV, TR i kombinovani tretman smanjuju ukupnu produkciju NO u kulturi

stimulisanoj LPS-om, a taj efekat se pripisuje smanjenju ukupnog broja ćelija u kulturi. RBV, TR i RBV+TR menjaju ameboidnu morfologiju aktivirane mikroglije, tako što smanjuju prosečnu površinu ćelija u kulturi. Tretman RBV, TR i RBV+TR smanjuju translokaciju NF- κ B/p65 u jedro. Primenjeni tretmani smanjuju ukupno oslobađanje TNF- α i IL-6, što je verovatno posledica smanjenja ukupnog broja aktiviranih ćelija, a RBV i kombinovani tretman povećavaju ekspresiju IL-1 β . U primarnoj kulturi mikroglijskih ćelija potvrđena je genska i proteinska ekspresija uravnotežujućih nukleozidnih transportera 1 i 2 (ENT1, 2), koji učestvuju u transportu RBV i TR u ćelije.

Ukupno gledano, rezultati dobijeni ovom studijom ukazuju da RBV i TR, pojedinačno ili u kombinaciji, deluju citotoksično na aktiviranu mikrogliju i menjaju njenu morfologiju, a ispoljavaju i imunomodulatorno dejstvo tako što snižavaju produkciju NO, smanjuju signalizaciju posredovanu NF- κ B/p65 i redukuju produkciju proinflamatornih citokina.

KLJUČNE REČI: centralni nervni sistem, inflamacija, mikroglija, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, ćelijska kultura

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: [611.81+611.82]:616-002.2(043.3)

616.8:615.27(043.3)

The effect of purine nucleoside analogues, ribavirin and tiazofurin, on microglial activation under inflammatory conditions

RESUME:

Activation of microglia is the hallmark of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and other neurodegenerative disorders associated with chronic neuroinflammation. The present study addressed the potency of purine nucleoside analogues ribavirin (RBV) and tiazofurin (TR) to modulate the microglial inflammatory response *in vivo* and *in vitro*.

In this study, we induced animal model of multiple sclerosis – experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by subcutaneous injection of encephalitogenic emulsion in the hind paw of Dark Agouti rats and showed that therapeutic treatment of EAE animals with combination of these two nucleoside analogues reduced disease severity. In addition, histological analysis indicated that RBV and TR also decreased the number and activation status of microglial cells. Since the combined treatment with RBV and TR leads to suppression of EAE symptoms and reduction of reactive microgliosis, we proposed hypothesis that this treatment, in addition to previously described effects in immune and vascular system, may act in central nervous system targeting primarily microglial cells.

Therefore, in further experiments we examined effect of RBV, TR and their combination (RBV+TR) on primary microglial cell culture. Activation of microglial cells with bacterial lipopolysaccharide (LPS) triggers typical microglial responses to inflammation. Anti-inflammatory potential of RBV, TR and RBV+TR was tested in terms of influencing microglial morphological changes, NO production, nuclear factor- κ B translocation and proinflammatory cytokines release, after LPS stimulation. The cytotoxic effects of RBV (1 – 20 μ M), TR (1 – 20 μ M) and their combination (10 μ M RBV + 5 μ M TR) are determined, as well as the dosages that achieved half-maximal inhibitory effect (EC₅₀). RBV, TR and combination

treatment lowered NO levels in LPS stimulated cultures as a result of decreased cell number. RBV, TR and RBV+TR induced shrinkage of average cell surface of LPS activated amoeboid microglial cells. Treatment with RBV, TR and RBV+TR of activated microglia strongly reduced the nuclear translocation of NF- κ B/p65 and suppressed proinflammatory immune response genes. Applied treatments also exerted suppression of TNF- α and IL-6 release in activated microglia mainly by reduction of cell number. At the same time, RBV and RBV + TR treatment additionally increased LPS-induced IL-1 β gene expression and release. In primary microglial cell culture, gained results confirmed gene and protein expression of equilibrative nucleoside transporters (ENTs), proteins that are responsible for the putative entry of RBV and TR into cells.

Results obtained in this study indicate that RBV and TR, alone or in a combination, attenuate neuroinflammatory response, probably by exerting cytotoxicity on activated microglial cells, reduction of NO levels, attenuation NF- κ B signaling and decrease of proinflammatory cytokine release.

KEY WORDS: central nervous system, inflammation, microglia, experimental autoimmune encephalomyelitis, cell culture

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Neurobiology

UDC NUMBER: [611.81+611.82]:616-002.2(043.3)

616.8:615.27(043.3)

SKRAĆENICE

AB - Alchajmerova bolest

ALS - amiotrofična lateralna skleroza

AP-1 - protein aktivacije-1

BDNF (eng. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) – neurotrofni faktor mozga

CNS - centralni nervni sistem

CNT (eng. *Concentrative nucleoside transporters*) - koncentrativni nukleozidni transporteri

CO - ugljen monoksid

DA - Dark Agouti

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EGFP (eng. *Enhanced Green Fluorescence Protein*) – poboljšani zeleni fluorescentni protein

ENT (eng. *Equilibrative nucleoside transporters*) - uravnotežujući nukleozidni transporteri

GM-CSF (eng. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) - faktor stimulacije kolonije granulocita/makrofaga

GTP - guanozin-5'-trifosfat

HO-1 - hem oksigenaza-1

IFN - interferon

IGF-1 (eng. *Insulin-like growth factor-1*) – faktor rasta-1 nalik insulinu

IL-1 - interleukin-1

IL-10 - interleukin-10

IL-6 – interleukin-6

IMP – inozin monofosfat

IMPDH - inozin 5'-monofosfat dehidrogenaze

JAK – janus kinaza

JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinases*) – c-Jun kinaze sa N-krajem

KMB - krvno-moždana barijera

LPS – lipopolisaharid

MAPK - mitogenom-aktivirane proteinske kinaze

M-CSF (eng. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) - faktor stimulacije kolonije makrofaga

MS - multipla skleroza

NAD - nikotinamid adenin dinukleotid

NF κ B (eng. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) – jedarni transkripcijski faktor κ B

NK ćelije (eng. *natural killer*) – ćelije prirodne ubice

NMDA – N-metil-D- aspartat

NO – azot monoksid

NT3 - neurotrofin 3

PB – Parkinsonova bolest

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza

RBV - ribavirin

RDP - ribavirin-difosfat

RMP - ribavirin-monofosfat

RTP - ribavirin-trifosfat

STAT– signalni transduktor i aktivator transkripcije

TAD - tiazol-4-karboksiamid adenin dinukleotid

TGF- β (eng. *Transforming Growth factor*) - faktor transformacije rasta beta

Th ćelije (eng. *T helper*) - pomoćne T ćelije

TLR (eng. *Toll-like Receptors*) – receptori nalik Toll-u

TNFR – receptor faktora nekroze tumora- α

TNF- α - faktor nekroze tumora- α

TR - tiazofurin

TWEAK (eng. *TNF like Weak inducer of apoptosis*) – slabi induktor apoptoze sličan TNF

VCAM-1 (eng. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) – adhezioni molekul-1 vaskularnih ćelija

XMP – ksantozin monofosfat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Osnovne karakteristike mikroglije	1
1.1.1. Aktivaciona stanja mikroglije	3
1.1.2. Mikroglija <i>in vitro</i>	5
1.1.3. Identifikacija mikroglije	7
1.2. Mikroglija u neurodegeneraciji	8
1.2.1. Multipla skleroza	9
1.2.2. Uloga mikroglije u multiploj sklerozi	10
1.2.3. Citokini u neurodegeneraciji	12
1.2.3.1. Faktor nekroze tumora- α (TNF- α)	12
1.2.3.2. Interleukin-1 (IL-1)	15
1.2.3.3. Interleukin-6 (IL-6)	16
1.2.3.4. Interleukin-10 (IL-10)	17
1.3. Primena ribavirina i tiazofurina u neuropatološkim stanjima	18
1.3.1. Transport nukleozidnih analoga u ćelije	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Materijal	23
3.1.1. Eksperimentalne životinje	23
3.1.2. Reagensi, rastvori i medijumi	23
3.1.3. Antitela	27
3.2. Metode	29
3.2.1. <i>In vivo</i> eksperiment	29
3.2.1.1. Aktivna indukcija i evaluacija EAE	29
3.2.1.2. Eksperimentalne grupe i tretman životinja	29
3.2.1.3. Parametri bolesti	30
3.2.1.4. Priprema životinjskog tkiva	30
3.2.1.5. Histochemija i imunohistochemija	31
3.2.2. <i>In vitro</i> eksperiment	32
3.2.2.1. Priprema ćelijske kulture	32
3.2.2.2. Tretman mikroglijskih ćelijskih kultura	34
3.2.2.3. Imunocitohemija i morfometrijska analiza	34
3.2.2.4. Imunofluorescentni esej	36
3.2.2.5. Test citotoksičnosti	37
3.2.2.6. Određivanje koncentracije nitrita	38
3.2.2.6.1. Normalizacija produkcije nitrita na ćelijsku gustinu	39
3.2.2.7. RT-PCR	39
3.2.2.7.1. Izolacija RNK	40
3.2.2.7.2. DNazni tretman i reakcija reverzne transkripcije	41
3.2.2.7.3. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)	42
3.2.2.8. Enzimski imunitest - ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	43
3.2.2.9. Statistička analiza podataka	44
4. REZULTATI	45
4.1. <i>In vivo</i>	45
4.1.1. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na težinu simptoma EAE	45

4.1.2. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na histopatološku sliku EAE	46
4.1.3. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na aktivaciju mikroglije u EAE	46
4.2. In vitro	48
4.2.1. Karakterizacija nestimulisane i LPS stimulisane mikroglijske ćelijske kulture	48
4.2.2. Uticaj ribavirina i tiazofurina na vijabilnost mikroglijskih ćelija	49
4.2.3. Uticaj ribavirina i tiazofurina na produkciju azot monoksida u kulturi mikroglijskih ćelija	52
4.2.4. Uticaj ribavirina i tiazofurina na morfometrijske karakteristike mikroglijskih ćelija u kulturi	55
4.2.5. Uticaj ribavirina i tiazofurina na aktivaciju NF- κ B signalnog puta	57
4.2.6. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju citokinskih iRNK u kulturi mikroglijskih ćelija	57
4.2.7. Uticaj ribavirina i tiazofurina na oslobađanje citokina u kulturi mikroglijskih ćelija	63
4.2.8. Uticaj ribavirina i tiazofurina na gensku i proteinsku ekspresiju nukleozidnih transportera ENT1 i ENT2 u kulturi mikroglijskih ćelija	66
5. DISKUSIJA	71
5.1. Uticaj ribavirina i tiazofurina na odgovor mikroglije u <i>in vivo</i> modelu neuroinflamacije	71
5.2. Uticaj ribavirina i tiazofurina na odgovor mikroglije u <i>in vitro</i> modelu neuroinflamacije	72
5.2.1. Citotoksičnost ribavirina i tiazofurina	73
5.2.2. Uticaj ribavirina i tiazofurina na produkciju NO	75
5.2.3. Uticaj ribavirina i tiazofurina na morfologiju aktivirane mikroglije	76
5.2.4. Uticaj ribavirina i tiazofurina na signalizaciju preko NF- κ B	77
5.2.5. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju i oslobađanje citokina	79
5.2.6. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju uravnotežujućih nukleozidnih transportera ENT1 i ENT2	82
6. ZAKLJUČCI	86
7. LITERATURA	89

1. UVOD

1.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE MIKROGLIJE

Mikrogliju je prvi put opisao Pio del Rio-Hortega (1932), koji je istovremeno postavio i vizionarske postulate o ovim ćelijama (Kettenmann i sar., 2011):

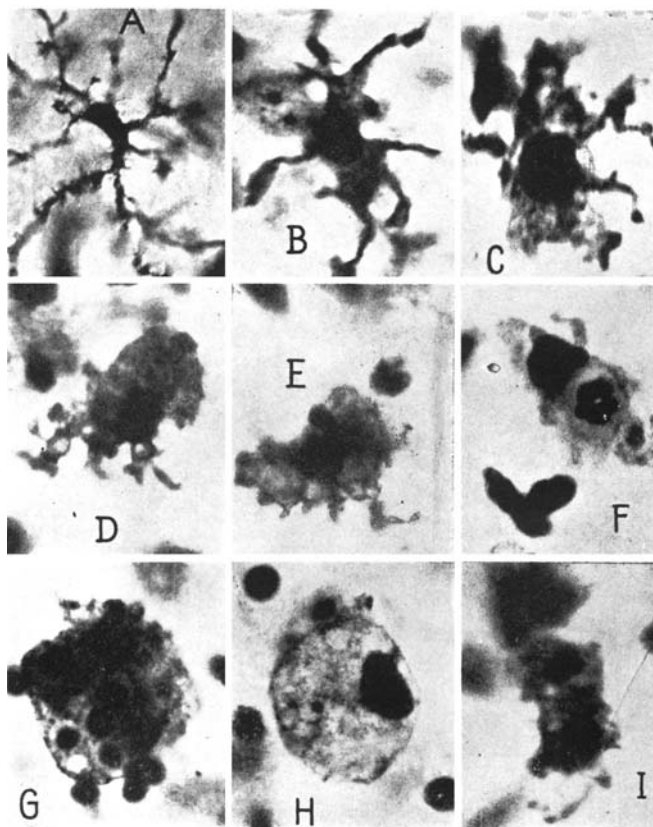
1. ćelije-prethodnice mikroglije ulaze u mozak tokom ranog embrionalnog razvića;
2. te ćelije su mezodermalnog porekla i imaju ameboidnu morfologiju;
3. prilikom migracije koriste krvne sudove i puteve bele mase kako bi dospele u sve regione mozga;
4. u adultnom mozgu transformišu se u granati tj. ramifikovani fenotip (poznat kao *mirujuća* mikroglija);
5. ravnomerno su distribuirane u adultom centralnom nervnom sistemu (CNS);
6. svaka ćelija zauzima tačno definisanu teritoriju;
7. nakon patoloških događaja, ćelije se transformišu i
8. prelaze u ameboidnu formu sličnu onoj koja se zapaža tokom ranog embrionalnog razvića;
9. transformisane ćelije imaju sposobnost migracije, proliferacije i fagocitoze.

Del Rio-Hortega formulisao je ove, i danas važeće postulate, na osnovu ispitivanja preseka moždanog tkiva impregniranih srebro-karbonatom (SL. 1).

Mikroglijske ćelije čine 5 do 20 % svih ćelija mozga i oko 20 % populacije glijskih ćelija (Polazzi i Monti, 2010; Lawson i sar., 1990), pri čemu je njihova gustina region-specifična.

Kada je reč o poreklu mikroglije, opšte je prihvaćeno stanovište da ove ćelije potiču od prethodnika koji dolaze sa periferije i da su mezodermalnog/mezenhimalnog porekla (Chan i sar., 2007). Kod glodara ove ćelije potiču iz koštane srži i migriraju iz krvnog sistema kao monocitne ćelije do

desetog dana postnatalnog razvića, dok je kod adultnih životinja razmena između krvi i parenhima mozga u fiziološkom stanju minimalna (Ajami i sar., 2007). Kad nasele parenhim CNS, mikroglijske ćelije se transformišu u ramifikovani fenotip.



SLIKA 1. Morfološka evolucija mikroglije tokom njene fagocitne aktivnosti (mikrografija preuzeta iz del Rio-Hortega, 1932). **A:** ćelija sa debelim i trnolikim nastavcima; **B:** ćelija sa kratkim nastavcima i uvećanim telom; **C:** hipertrofična ćelija sa pseudopodijama; **D i E:** ameboidne i pseudopodične forme; **F:** ćelija sa fagocitiranim leukocitom; **G:** ćelija sa brojnim fagocitiranim eritrocitima; **H:** debela-granularna ćelija; **I:** ćelija u mitotičkoj deobi.

Danas se mnogo više zna o činiocima koji kontrolišu aktivaciju mikroglije, nego o činiocima koji je preobraćaju u ramifikovani fenotip. Istraživanja na ćelijskoj kulturi dala su o tome neke nagoveštaje, pa je tako ustanovljeno, da se kod monocita gajenih u kondicioniranom medijumu astrocita, povećava stepen ramifikacije (Sievers i sar., 1994), a dodavanje ATP ili adenzina medijumu izaziva još izraženije grananje (Wollmer i sar., 2001). Ostali kandidati su citokini koje

oslobađaju astrociti: TGF- β (faktor transformacije rasta beta), M-CSF (faktor stimulacije kolonije makrofaga) i GM-CSF (faktor stimulacije kolonije granulocita/makrofaga) (Schilling i sar., 2001). Takođe, pokazano je da je za ramifikaciju mikroglije potrebna aktivnost kanala za transport hlora (Cl⁻) (Eder i sar., 1998).

1.1.1. Aktivaciona stanja mikroglije

U zdravom adultnom CNS-u mikroglija ima malo ćelijsko telo sa finim dugim nastavcima, koji se na krajevima granaju. Ovakav izgled mikroglije često se naziva *mirujuće* stanje. Infekcija, trauma (Cho i sar., 2006; Ladeby i sar., 2005), ishemija (Rupalla i sar., 1998), neurodegenerativne bolesti (Ponomarev i sar., 2006) i izmenjena neuronska aktivnost, tj. bilo kakvo narušavanje ili gubitak homeostaze koje ukazuje na realnu ili potencijalnu opasnost po CNS, izaziva temeljne promene oblika mikroglije, genske ekspresije i funkcije, što definiše stanje koje se naziva aktivirana mikroglija (Kettenmann i sar., 2011). Tokom ovog procesa mikroglija iz ramifikovanog, prelazi u ameboidni oblik, što podrazumeva povlačenje nastavaka. Formiraju se pseudopodije, mikroglija postaje pokretljiva i kreće se ka leziji ili izvoru patogena. Lokalna gustina mikroglije može se povećati i proliferacijom, kako bi se obezbedilo više ćelija za odbranu i uspostavljanje tkivne homeostaze. Tokom aktivacije dolazi i do indukcije i preuređivanja površinskih molekula za interakciju sa drugim ćelijama i komponentama vanćelijskog matriksa. Takođe, dolazi i do promene u aktivnosti unutarćelijskih enzima i otpuštanja mnogobrojnih faktora sa proinflamatornim i imunomodulatornim efektima. U sledećoj fazi aktivacije, mikroglija ispoljava fagocitnu aktivnost kojom se uklanjaju ostaci oštećenog tkiva i ćelija i neutrališu patogeni. Fagocitna forma mikroglije oslobađa i hemokine koji privlače imunske ćelije u CNS. Aktivirana mikroglija ima ulogu i antigen-prezentujućih ćelija, te tako pomaže stečenom imunskom sistemu u borbi protiv virusnih i bakterijskih patogena. U ovaj širok opseg mikroglijske aktivnosti spada i produkcija neurotrofnih faktora, kao i fizička povezanost sa ugroženim neuronima. Ne treba zaboraviti da se mikroglijske ćelije nalaze u parenhimu mozga koji je „imuno-privilegovano“ mesto, što znači da poseduje

mehanizme zaštite od potencijalno štetnih posledica imunske reakcije (Galea i sar., 2007), pa je aktivacija mikroglije strogo regulisan proces.

Mikroglija je u zdravom adultnom CNS-u ramifikovana i vrlo malo ili uopšte ne eksprimira markere aktivacije (Kreutzberg, 1996), pa se smatra da je ona funkcionalno uspavana, a termin ramifikovana mikroglija se skoro uvek izjednačava sa terminom „mirujuća“ mikroglija, naglašavajući tesnu vezu između morfologije i funkcije (Streit i sar., 1999). Međutim, ove „mirujuće“ ćelije u stvari, neprekidno proveravaju sopstveno okruženje. Svojim pokretljivim nastavcima mikroglija konstantno „nadgleda“ vanćelijski prostor i susedne ćelije, integriše i interpretira znake koje dobija od okruženja, kako bi bila spremna da se transformiše u aktivnu formu, a da pri tome ne naruši osetljivu neuronsku mrežu. Ti fini i konstantni pokreti ćelijskih nastavaka pokazani su u *in vivo* studijama oslikavanja mozga EGFP (eng. *Enhanced Green Fluorescence Protein*) obeleženom mikroglijom (Davalos i sar., 2005; Nimmerjahn i sar., 2005).

Pored konstantnog nadgledanja, mikroglija ima ulogu „kućepazitelja“, o kojoj se malo zna i verovatno dobrim delom prolazi neopaženo (Hanisch i Kettenmann, 2007). Primera radi, mikroglija čak i u slučaju malog vaskularnog deficita ili prilikom izolovanog neuronskog oštećenja, deluje trenutno kako bi pružila zaštitu i trofičku podršku. Ona može i da redukuje aktivirajući sinaptički ulazni signal procesom koji se naziva sinaptičko ogoljavanje (eng. – *synaptic stripping*) (Wake i sar., 2009; Trapp i sar., 2007). Stoga se može zaključiti da prelazak mikroglije iz režima nadgledanja u aktivno stanje pre predstavlja promenu stanja, nego aktivaciju po sebi, što znači da zapravo, nema perioda inaktiviranosti mikroglije (Kettenman i sar., 2011). Postoji sve više dokaza da aktivacija mikroglije nije proces sve-ili-ništa, niti stereotipni put sa unapred poznatim ishodom, već, na protiv, da se sastoji od prelaza iz jednog u drugo funkcionalno stanje (Colton, 2009; Hanisch i Kettenmann, 2007). Na primer, aktivacija mikroglije može započeti kao rani odgovor u vidu ispoljavanja odbrambenih funkcija, kako bi se pobedila infekcija ili ograničila dalja oštećenja nakon povrede. Ta aktivirana mikroglija koja je inicijalno odabrala odbrambeni program može se preobratiti u

mikrogliju koja je orijentisana ka popravci i obnavljanju tkiva (Kettenmann i sar., 2011).

Šta se dešava sa post-aktiviranom mikroglijom nakon okončanja mikroglijskog odgovora? Pretpostavlja se da svaka aktivacija mikroglije, čak i ona minimalnog intenziteta i trajanja, ostavlja tragove u vidu suptilnih funkcijskih promena. Naime, na morfološkom nivou post-aktivirana mikroglija može da izgleda prividno isto kao „mirujuća“ ćelija, a da ipak nosi neka dugotrajna obeležja prethodne aktivacije. Postojanje lokalne populacije mikroglije koja je već iskusila aktivaciju, može da omogući bržu i efikasniju reakciju pri ponovnom izazovu. Sa druge strane, povećava se verovatnoća nastanka nekog oblika disfunkcije sa starošću, koji može da ima ulogu u nastanku neurodegenerativnih procesa (Block i sar., 2007; Conde i Streit, 2006).

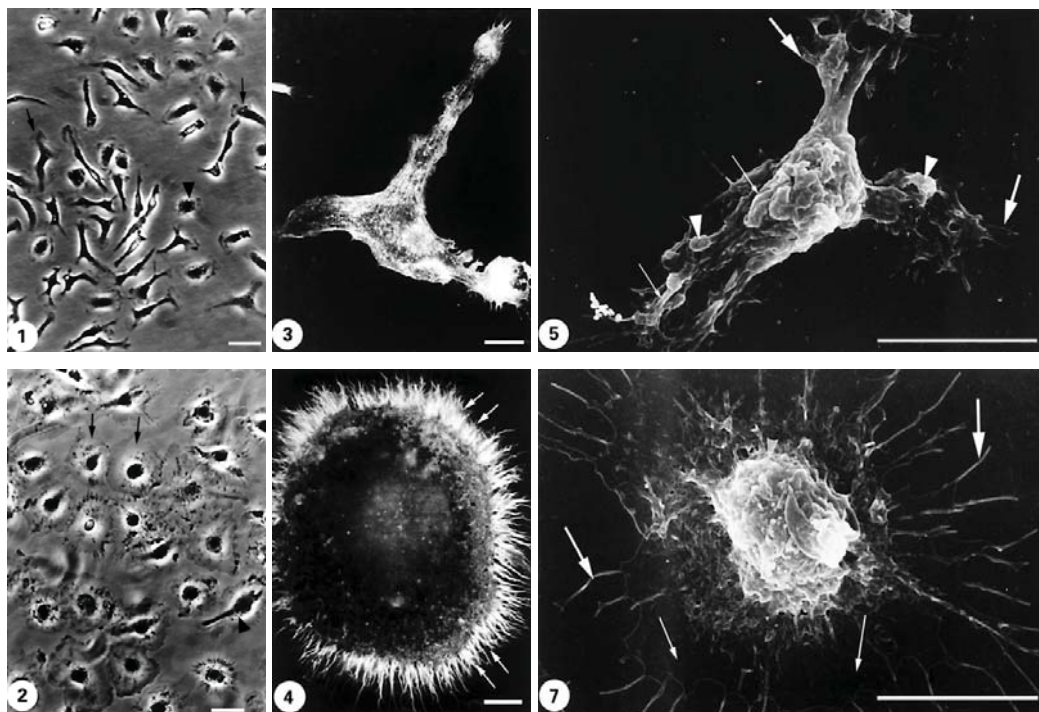
Jedan od faktora koji utiče na profil ekspresije i osobine mikroglije je i osnovna arhitektura CNS-a. Naime, mikroglija bele i sive mase se razlikuje u nivou ekspresije imunoregulatornog receptora Tim-3 (Anderson i sar., 2007). Ova razlika može da utiče na osetljivost prema inflamaciji (Hristova i sar., 2010). Interesantno je da je ova heterogenost mikroglije u korelaciji sa heterogenošću oligodendroglijskih populacija u sivoj i beloj masi (Kitada i Rowitch, 2006).

Morfologija nije uvek pouzdani pokazatelj funkcijskog stanja mikroglije. Pokazano je da indukcija određenih gena ili aktivacija može da se desi i u odsustvu očigledne morfološke promene (Eskes i sar., 2003), pa je zaključeno da gubitak ramifikovane i sticanje više amebodne forme ne mora uvek da bude odraz aktuelnog reaktivnog fenotipa (Markovic i sar., 2009).

1.1.2. Mikroglija *in vitro*

Uprkos činjenici da je *in vitro* kultura mikroglijskih ćelija opisana još 1930-ih godina od strane Costera, njeno uvođenje kao eksperimentalnog modela za izučavanje osobina i funkcija mikroglije desilo se skoro pola veka kasnije, nakon razvijanja metoda za dobijanje velikog broja ovih ćelija iz postnatalnog mozga glodara (Giulian i Baker, 1986). Naime, Giulian i Baker su utvrdili da u mešovitoj glijskoj kulturi postoji mikroglija ameboidnog oblika, koja se nalazi na sloju

astrocita i ima slične osobine kao makrofagi, uključujući sposobnost da proliferiše, vrši fagocitozu, luči citokine i reaktivne kiseonične vrste. Takođe, identifikovali su i populaciju mikroglijskih ćelija sa ramifikovanim fenotipom, koja ima smanjenu sposobnost fagocitoze i proliferacije, a nalazi se unutar ili ispod sloja astrocita. Sa vremenom, u mešovitoj kulturi se povećava broj ramifikovane forme jer se mikroglija sve više integriše u sloj astrocita (Kalla et al, 2003; Tanaka et al., 1999). Budući da je ameboidna mikroglija slabo vezana za sloj koji formiraju astrociti, izolacija ovih ćelija iz mešovitih glijskih kultura postao je pouzdan, ponovljiv i dobro okarakterisan *in vitro* model za izučavanje mikroglijskih ćelija. Ipak, izolovane mikroglijske ćelije prepoznaju sredinu ćelijske kulture kao stranu, pa stoga *in vitro* studije ne oslikavaju verno osobine mikroglije u fiziološkom stanju mozga.



SLIKA 2. Mikroglijske ćelije u kulturi (slike preuzete od Abd-El-Basset, 2000). **1, 2:** Fazno-kontrastne mikrografije mikroglije u kulturi. Pre LPS tretmana, **(1)** ćelije imaju ameboidni oblik sa mnogo kratkih nastavaka, koji se na krajevima šire i formiraju lamelipodije (crne strelice). Neke mikroglijske ćelije su male i okrugle (crni vrh strelice). Mikroglija tretirana pet dana sa 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS **(2)**, većina ćelija postaje veća, pljosnata i okrugla (crne strelice). **3, 4:** Fluorescentne

mikrografije mikroglije obeležene rodaminom. Čelije pre LPS tretmana **(3)**, imaju mrežu F-aktina koja je više granularna, nego filamentozna. Mikroglija tretirane pet dana sa 5 µg/ml LPS **(4)**, poseduje debela klupka F-aktina u mikronastavcima koji nalikuju bodljama na velikim, pljosnatim i okruglim ćelijama. **5, 7:** Mikrografije sa elektronskog mikroskopa. Mikroglija pre LPS tretmana **(5)** ima brojne nastavke koji se šire u lamelipodije (bele strelice), dok površina ćelije ima nekoliko velikih membranskih nabora i mehura (beli vrh strelice). Čelije tretirane pet dana sa 5 µg/ml LPS **(7)** imaju pljosnat i okrugao oblik sa mikronastavcima koji nalikuju bodljama (bele strelice), bez membranskih nabora, dok se u centru ćelije nalaze mnogi mali membranski mehuri.

Mikroglijske ćelije *in vitro* obično nemaju ramifikovanu strukturu koja se viđa u normalnom CNS ili čak u mešovitoj glijskoj kulturi. Javljaju se u raznim oblicima, od vretenastih i cilindričnih ili ameboidnih verzija sa kratkim, debelim nastavcima, koji se šire u vidu lamelipodija, do potpuno okruglih ćelija (SL. 2, Abd-el-Basset, 2000). Tako se gajenjem u kondicioniranom medijumu astrocita povećava ramifikacija ovih ćelija (Wollmer i sar., 2001; Sievers i sar., 1994), dok lipopolisaharid (LPS) poreklom iz ćelijskog zida gram-negativnih bakterija uzrokuje brojne ćelijske odovore koji igraju ključnu ulogu u patogenezi inflamatornih odgovora. Zbog toga se LPS koristi za izazivanje proinflamatorne i neurotoksične aktivacije mikroglije (SL. 2) (Kaneko i sar., 2009; Qin i sar., 2007; Hanisch, 2002; Abd-El-Basset, 2000).

U raznim eksperimentalnim postavkama, kao validna zamena za primarnu mikroglijsku kulturu, često se upotrebljava imortalizovana mikroglijska ćelijska linija BV-2, dobijena iz miša.

1.1.3. Identifikacija mikroglije

Mikroglija se identifikuje na presecima mozga čoveka i eksperimentalnih životinja, kao i u kulturi ćelija, zahvaljujući specifičnim membranskim i unutarćelijskim markerima. Neki od tipičnih markera mikroglije su:

- *Griffonia simplicifolia* izolectin B4 (ILB4) ili lektin iz paradajza (Boya i sar., 1991; Streit i Kreutzberg, 1987), koji prepoznaju funkcionalne grupe glikana

ekspimiranih na površini mikroglije. ILB4 takođe intenzivno boji i krvne sudove, ali se oni jasno morfološki razlikuju od mikroglije;

- $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18, komplement receptor 3, CR3, MAC1), koji vezuje komplement C3b, zatim proteine plazme i vanćelijskog matriksa i ima ulogu u fagocitozi opsonizovanog i neopsonizovanog materijala (Ma i sar., 2003);
- antitela specifična za Iba1, protein za koji se pretpostavlja da ima ulogu u održanju stalne koncentracije kalcijuma (Imai i Kohsaka, 2002); veoma je pogodan za detaljnu vizualizaciju nastavaka mikroglije;
- u neuropatologiji i eksperimentalnim istraživanjima sledeći molekuli su korisni za identifikaciju makrofaga/mikroglije sa manje ili više izraženim preklapanjem: imunoglobulinski receptori (CD16/32/64, Fc RIII/II/I); CD45 (ili LCA- eng., *leukocyte common antigen*), CD68 (makrosialin, glikoprotein koji se veže za proteine niske gustine), CD163 (receptor M130, ED2), CD169 (sijaloadhezin, siglec-1), CD204 (MSR), F4/80 antigen, β -glukozni receptor dektin-1, ili manozni receptor (CD206).

Nivo ekspresije mnogih od ovih molekula, kao što je npr. Iba1, povećava se sa aktivacijom mikroglije (Ito i sar., 2001). Neke klase molekula eksprimira samo aktivirana mikroglija, kao što su molekuli MHC kalase II, uključujući i pomoćne molekule za prezentaciju antigena (B7.1 ili B7.2 tj. CD80/86). Bitni su i markeri koji jasno razlikuju aktiviranu mikrogliju od infiltrirajućih monocita. Jedan od molekula koji ima takvu sposobnost, barem u tkivu čoveka, je glukozni transporter 5 (GLUT5) (Vannucci i sar., 1997; Maher i sar., 1994). Što se tiče pacova za tu svrhu pogodna su antitela specifična za keratin sulfatni epitop 5D4 (Bertolotto i sar., 1998).

1.2. MIKROGLIJA U NEURODEGENERACIJI

Moderno doba izučavanja mikroglije počelo je u kasnim 1960-im sa Blinzingerom i Kreutzbergom i njihovim modelom lezije facijalnog nerva, koji je pomogao da se uspostavi koncept uloge mikroglijskih ćelija, kako u degeneraciji

tako i u regeneraciji mozga. Disregulacija u funkcionisanju aktivirane mikroglije može doprineti patološkim događajima u Parkinsonovoj bolesti (PB), Alchajmerovoj bolesti (AB), multiploj sklerozi, amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (ALS), kao i demenciji izazvanoj HIV-om (Saijo i Glass, 2011; Glass i sar., 2010).

1.2.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je heterogeno i složeno autoimunsko oboljenje CNS-a koje odlikuje inflamacija, demijelinizacija i degeneracija aksona. Kod ovog oboljenja ćelije imunskog sistema napadaju komponente mijelinskog omotača, što dovodi do oštećenja i samih neurona. Oboljenje se manifestuje gubitkom funkcija motornog, autonomnog i vizuelnog sistema, kao i kognitivnim deficitima. Bolest se uglavnom javlja između 20. i 30. godine života i to 2-3 puta češće kod osoba ženskog pola. U ranoj fazi MS, oko 87 % pacijenata ima relapsno-remitentni oblik bolesti (Weiner, 2008). Međutim, vremenom se akumulira sve više oštećenja, pa dolazi do ireverzibilne progresije bolesti, tj. razvija se sekundarno-progresivna forma MS (Runmarker and Andersen, 1993). Oko 10 % pacijenata oboli od teškog oblika MS, koji se odlikuje odsustvom remisija i konstantnom progresijom neuroloških deficita (Goverman, 2009; Sospedra i Martin, 2005). Za sada je nepoznato koji bi to faktor mogao da bude inicijator bolesti, ali se smatra da je za razvoj MS neophodna kombinacija sredinskih i genetskih faktora koji vode ka autoimunskom odgovoru usmerenom ka mijelinskom omotaču.

Veoma dobar i uobičajeni animalni model za izučavanje patoloških događaja u MS je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE). EAE se indukuje kod osetljivih sojeva glodara, a može biti indukovano i kod nekih primata. Kada su pacovi u pitanju, osetljivi sojevi su Lewis i Dark Agouti (DA) (Stošić-Grujičić i sar., 2004; Happ i sar., 1988), a rezistentni Albino Oxford (AO) (Miljković i sar., 2006) i Brown Norway (BN) (Staykova i sar., 2005; Happ i sar., 1988), dok je Wistar soj relativno rezistentan (Dimitrijević i sar., 1995). EAE se uglavnom ne pojavljuje spontano, već je za njegovu indukciju, pored genetički osetljivog soja životinja, neophodna aktivna imunizacija životinja, antigenima koji potiču iz mijelina, ili

pasivni transfer aktiviranih T limfocita koji prepoznaju epitope mijelina (za detalje videti: Pender, 1995).

Jedno od glavnih obeležja i MS i EAE jeste pojava lezija, uglavnom u beloj masi CNS-a. MS lezija predstavlja oblast gubitka mijelina (demijelinizacija), kojoj prethodi infiltracija limfocita u perivaskularne prostore i belu masu kičmene moždine, kao i aktivacija mikroglije i astrocita (Lassmann i sar., 2001). Oko demijelinizacionih lezija uočeno je i nagomilavanje antitela (Frohman i sar., 2006). Kada je inflamatorni odgovor prolazan, remijelinizacija aksona se odvija tokom oporavka, međutim kada je, kao kod MS, prisutna hronična inflamacija, proces remijelinizacije je narušen, pa bolest vodi ka progresivnoj degeneraciji aksona i smrti neurona (Trapp i Nave, 2008).

Za razliku od PB, AB i ALS, u kojima su neadekvatni proteinski agregati glavni patološki faktori nastanka bolesti, inflamatorna priroda bolesti i sličnost sa animalnim modelima autoimunske demijelinizacije, ukazuju da se kod MS primarni deficit dešava u regulaciji stečenog imunskog odgovora (Graeber i sar., 2011; Weiner, 2009; Lassmann i Ransohoff, 2004). Preovladava stanovište da sistemski aktivacija autoreaktivnih T ćelija dovodi do ekspanzije i migracije mijelin-reaktivnih ćelija sa periferije u parenhim mozga i kičmene moždine, što izaziva inflamaciju i demijelinizaciju. Dugo se smatralo da pomoćne T ćelije tipa 1 (Th1) igraju ključnu ulogu u patogenezi bolesti, međutim karakterizacija specifičnih funkcija IL-12 i IL-23 otkrila je da veoma bitnu ulogu u patogenezi MS igra podgrupa T pomoćnih ćelija, koje se nazivaju Th-17 ćelije (Cua i sar., 2003).

1.2.2. Uloga mikroglije u multiploj sklerozi

Kad su u pitanju inicijacija i progresija MS, osim deficita u regulaciji stečenog imunskog odgovora, suštinski doprinos ima i urođeni imunski odgovor od strane rezidentnih imunskih ćelija CNS-a (Sriram, 2011).

Aktivacija mikroglije može doprineti početku MS i EAE, prezentovanjem antigena i sekrecijom proinflamatornih citokina (Benveniste, 1997). Mikroglija oslobađa citokine, kao što su IL-6, IL-23, IL-1 β i TGF β , koji su neophodni za diferencijaciju i aktivaciju Th-17 ćelija (Saijo i Glass, 2011). U relapsno-

remitentnom obliku EAE zabeležena je produžena aktivacija mikroglije, koja je u korelaciji sa gubitkom sinapsi (Rasmussen i sar., 2007). Preterana aktivacija mikroglije, povezana sa inflamacijom bele mase, javlja se i kod MS pacijenata i to češće kod onih sa sekundarno-progresivnim tipom bolesti (Kutzelnigg i sar., 2005). Uloga mikroglije kao antigen-prezentujućih ćelija zasniva se na ekspresiji molekula MHC klase II, markera zrelih dendritičnih ćelija CD83 i ko-stimulatornog molekula CD40, koji su neophodni za interakciju sa efektorskim T i B ćelijama (Raivich and Banati, 2004). Uz to, mikroglija eksprimira sve poznate TLR receptore (eng. *Toll-like receptors*), koji igraju ključnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru CNS-a (Aravalli i sar., 2007; Jack i sar., 2007). Ekspresija ovih receptora je povećana u demijelinizacionim lezijama i u EAE i MS (Andersson i sar., 2008; Bsibsi i sar., 2002). Mikroglija učestvuje u procesima demijelinizacije i fagocitozi degradovanog mijelina (Bauer i sar., 1994), što dovodi do ekspresije mijeloperoksidaze (Gray i sar., 2008), koja u interakciji sa reaktivnim kiseoničnim vrstama uzrokuje oštećenje neurona (Raivich and Banati, 2004; Benveniste, 1997). Mikroglija može da luči i TWEAK (eng. *TNF like weak inducer of apoptosis*), inflamatorni citokin koji pokreće brojne procese uključujući proliferaciju, angiogenezu, inflamaciju i indukciju ćelijske smrti. Ekspresija ovog molekula je povećana u MS lezijama (Serafini i sar., 2008). Mikroglija koja eksprimira TWEAK uključena je u gubitak mijelina, oštećenje neurona i vaskularne izmene u kortikalnim lezijama (Gandhi i sar., 2010). Neke mikroglijske ćelije u EAE ekspimiraju IL-17 i njegov receptor, koji autokrinim delovanjem povećavaju produkciju IL-6, NO, adhezivnih i inflamatornih proteina i tako dovede do pogoršanja bolesti (Kawanokuchi i sar., 2008).

Međutim, osim doprinosa u razvoju bolesti, postoje dokazi o pozitivnim ulogama ovih ćelija u MS i EAE. Mikroglija, zavisno od citokinskog miljea koji je okružuje, produkuje i anti-inflamatorne citokine, IL-10 i TGF- β , kao i neurotrofne faktore, BDNF (eng. *brain-derived neurotrophic factor*), IGF-1 (eng. *insulin-like growth factor-1*) i NT3 (neurotrofin 3) (Napoli i Neumann, 2009; Napoli i Neumann, 2010). Stoga se danas smatra da mikroglija, zavisno od faze bolesti i

kontrole regulacije, ima dvojnu prirodu, odnosno, da ostvaruje neurodestruktivno i neuroprotektivno dejstvo (Napoli i Neumann, 2010; Aravalli i sar., 2007).

1.2.3. Citokini u neurodegeneraciji

Jedan od najvažnijih aspekata aktivacije mikroglije je produkcija proinflamatornih citokina, kao što su TNF α , IL-1 β i IL-6. Primarna uloga ovih citokina je zaštita CNS-a od daljeg oštećenja prilikom narušavanja njegovog integriteta bilo povredom, ishemijom ili infekcijom. Međutim, isti citokini mogu, pod određenim uslovima, biti i toksični za neurone i druge glijske ćelije (SL. 3, Smith i sar., 2012). To se naročito dešava u uslovima hronične aktivacije mikroglije, kada ona doprinosi razvoju i daljoj progresiji neurodegenerativnih oboljenja (Block i sar., 2007). Efekti proinflamatornih citokina, kako u neuroprotekciji, tako i u neurodegeneraciji, otežavaju procenu uloge mikroglije u ovim oboljenjima. Stvar dodatno komplikuju astrociti, koji nakon oštećenja CNS-a i sami započinju produkciju proinflamatornih medijatora, uključujući i citokine, pa na taj način doprinose pojačavanju inflamacije (Lu i sar., 2011). Potom i sama interakcija aktivirane mikroglije i astrocita može da pojača inflamatorni odgovor i da doprinese produkciji neurotoksičnih faktora. Na primer, u LPS stimulisanoj kokulturi mikroglije i astrocita, svaki tip ovih ćelija proizvodi značajno veću količinu neurotoksičnih faktora, nego iste ćelije u monokulturi (Saijo i sar., 2009). To ukazuje na postojanje pozitivne povratne sprege između astrocita i mikroglije u produkciji proinflamatornih faktora (Saijo i Glass, 2011). Interakciju mikroglije i astrocita još je teže definisati u *in vivo* sistemu.

1.2.3.1. Faktor nekroze tumora- α (TNF- α)

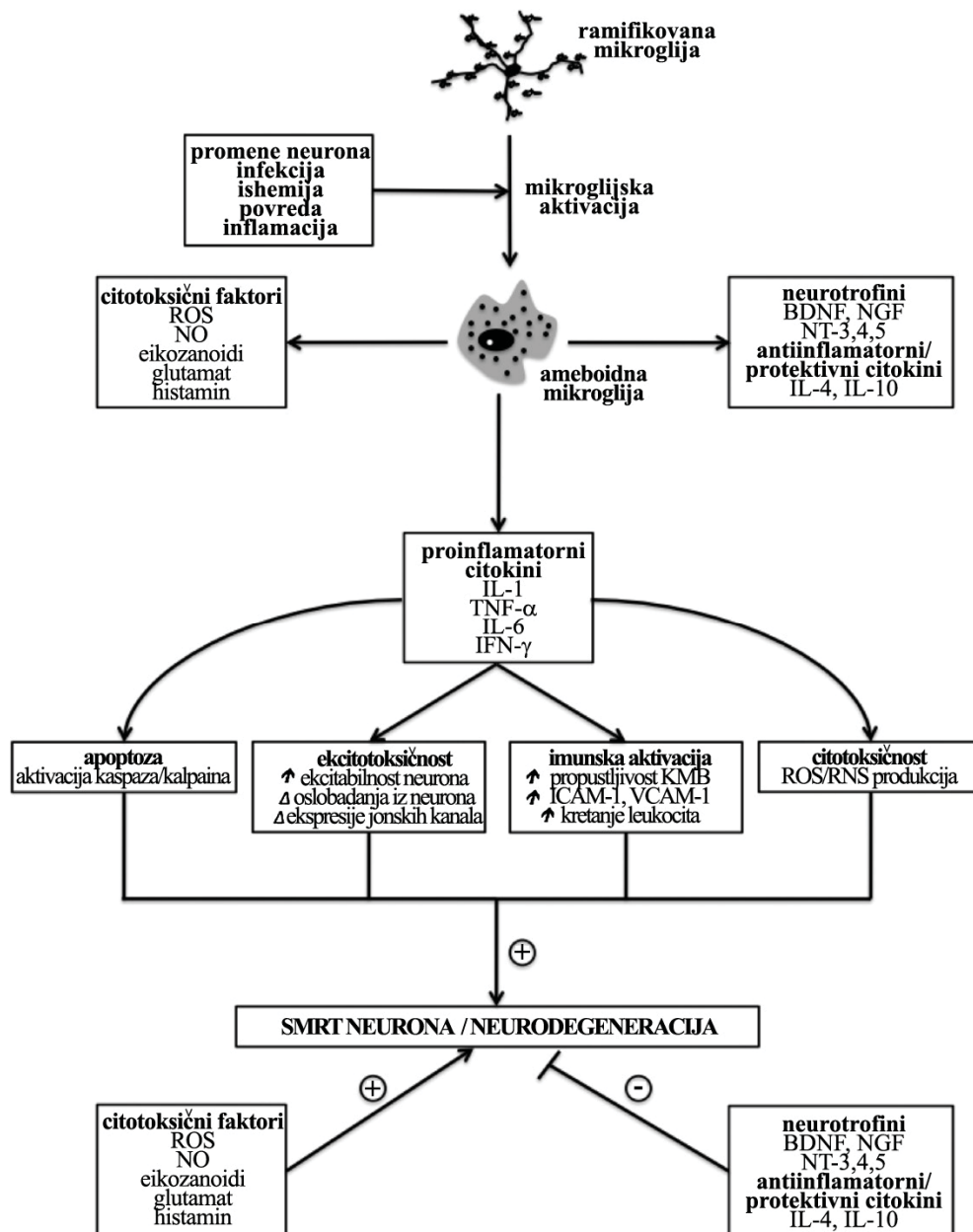
TNF- α je mali polipeptid koji se može naći u dve forme: kao membranski protein od 26 kDa ili kao solubilna forma od 17 kDa. Iako je mikroglija glavni izvor ovog proinflamatornog citokina, TNF- α oslobađaju i neuroni i astrociti (Breder i sar., 1994, Lee i sar., 1993). TNF- α deluje preko dva receptora: TNFR1 i TNFR2. Interakcija TNF- α sa receptorom 1 pokreće signalizaciju posredstvom kompleksa I ili kompleksa II. Usled interakcije komponenti kompleksa I, aktivira se I κ B kinaza

(IKK), koja fosforiliše I κ B, što omogućava translokaciju NF κ B u jedro i transkripciju gena koji su pod njegovom kontrolom, uključujući antiapoptotske proteine (npr. IAP, Bcl-2, Bcl-xL) kao i proinflamatorne faktore (npr. citokine, hemokine, COX-2) (Ahn i Aggarwal, 2005). Kompleks I može da aktivira i JNK i p38 kinaze i tako inicira transkripciju proinflamatornih molekula i enzima (Guicciardi i Gores, 2003; Wajant i Scheurich, 2001). Sve ovo ukazuje da formiranje kompleksa I po aktivaciji TNFR1 igra važnu ulogu i u inflamaciji i u ćelijskom preživljavanju. TNFR1 može da pokrene signalizaciju i preko alternativnog kompleksa II (Bender i sar., 2005), čije komponente onda stupaju u interakciju sa sličnim domenima na proformama kaspaze-8 i kaspaze-10, što vodi njihovoj aktivaciji (Sheikh i Huang, 2003; Chinnaiyan i sar., 1995). Ove kaspaze potom iniciraju apoptozu direktno, cepanjem kaspaze-3 ili indirektno preko aktivacije Bax što se završava oslobađanjem citohroma c iz mitohondrija (Zhao i sar., 2001). Međutim, ostaje nepoznato šta pokreće anti- ili pro-apoptotsku signalizaciju preko kompleksa I, ili kompleksa II.

Što se tiče signalizacije preko TNFR2, ovaj receptor prevashodno odgovara na membranski TNF- α (Grell i sar., 1995). Kod TNFR2 postoji slična signalana kaskada kao kod TNFR1, pa tako vezivanje TNF- α za TNFR2 vodi ka aktivaciji NF- κ B i JNK/p38 kinaza (Rothe i sar., 1995). Na membrani neurona, TNFR2 je sposoban da aktivacijom fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K)/Akt signalnog puta pojača transkripciju posredovanu faktorom NF- κ B (Gustin i sar., 2004) i na taj način, barem delom, učestvuje u protektivnim i regulatornim efektima ovog citokina u CNS-u.

Praćenje uloge ovog citokina u MS i EAE ukazalo je da se ekspresija TNF- α povećava sa pogoršanjem simptoma bolesti, kako kod životinja kod kojih je indukovana EAE, tako i kod MS pacijenata (Issazadeh i sar., 1996, 1995; Merrill i Benveniste, 1996). Takođe, pokazano je da TNF- α ispoljava citotoksični efekat na oligodendrocite *in vitro* i *in vivo*, kao i na njihove progenitore (Arnett i sar., 2001; Akassoglou i sar., 1998; Selmaj i Raine, 1988). U skladu sa ovim rezultatima, aplikacija antitela specifičnih za TNF- α dovela je do potpune redukcije simptoma

EAE-a kod jednog soja miševa, uz izostanak inflamacije i demijelinizacije (Selmaj i sar., 1991).



SLIKA 3. Važeci mehanizam neurodegenerativne kaskade izazvane aktivacijom mikroglije i oslobađanjem proinflamatornih citokina (slika preuzeta iz Smith i sar., 2012). ↑ - porast; Δ – promena.

Ovaj efekat je bio još izraženiji kada se sa blokadom započelo u ranoj fazi inflamatornog procesa pre prvih simptoma bolesti (Körner i sar., 1997). Sa druge

strane, kod TNF- α nokaut miševa razvija se težak oblik EAE praćen jakom infiltracijom i demijelinizacijom, a egzogena aplikacija TNF- α kod ovih miševa dovodi do redukcije kliničkih manifestacija bolesti (Liu i sar., 1998). Treba napomenuti i da tretman MS pacijenata antitelom specifičnim za TNF- α dovodi do značajnog pogoršanja bolesti (Titelbaum i sar., 2005).

1.2.3.2. Interleukin-1 (IL-1)

U IL-1 familiju citokina spadaju IL-1 α , IL-1 β i endogeni antagonist IL-1 receptora (IL-1RA). IL-1 α je vezan za membranu, dok je IL-1 β solubiln, a oba se sintetisu u vidu pro-formi koje se transformišu u aktivnu zrelu formu dejstvom proteaza (npr. kaspaza-1 za IL-1 β) (Netea i sar., 2010). Oba navedena citokina deluju na tip I IL-1 receptora (IL-1RI). Nakon vezivanja liganda dolazi do konformacione promene IL-1RI i on vezuje pomoćni protein IL-1 receptora (IL-1RAcP). Ovaj kompleks pokreće brojne adapterske proteine, što vodi aktivaciji brojnih kinaza uključujući: kinaze 1 i 4 vezane za IL-1 receptor (IRAK1 i IRAK4), kinazu koja aktivira faktor transformacije rasta β (TAK), kao i članove kaskade protein kinaza aktiviranih mitogenima (p38, JNK i ERK1/2) (za detalje videti Smith i sar., 2012). Ove kinaze aktiviraju NF- κ B i protein aktivacije-1 (AP-1) (Weber i sar., 2010), koji potom omogućavaju transkripciju selektivnih gena. IL-1R podstiče hidrolizu sfingomijelina i produkciju ceramida u neuronalnoj membrani (Hofmeister i sar., 1997). Akumulacija ceramida u ćeliji može da aktivira apoptotske puteve Src kinaza i da dovede do promene elektrofizioloških karakteristika neurona (Davis i sar., 2006; Chik i sar., 1999; Brugg i sar., 1996).

U EAE-u aktivirani makrofagi/mikroglia pojačano izlučuju IL-1 β (Bauer i sar., 1993). Interleukin 1 β stimuliše astrogliozu *in vivo*, u traum i EAE-u (Giulian i sar., 1988), dok *in vitro* izaziva smrt oligodendrocita u ko-kulturi sa astrocitima i mikrogljom, ali ne i u monokulturi oligodendrocita (Takahashi i sar., 2003). Takođe je pokazano da IL-1 za indukciju apoptoze neurona zahteva prisustvo dodatnih citokina kao što su TNF- α ili IFN- γ (Hu i sar., 1997; Chao i sar., 1995). Pretpostavlja se da IL-1 β , sam ili u kombinaciji sa drugim faktorima, može imati

ulogu u oštećenju aksona i neurona u MS-u i EAE-u. Sa druge strane, miševi deficitarni za IL-1 β nemaju kapacitet za pravilnu remijelinizaciju (Mason i sar., 2001). Istovremeno, kod ovih miševa je registrovan nedostatak IGF-1, koga proizvode mikroglija i makrofagi, usled čega dolazi do odlaganja diferencijacije prekursora oligodendrocita u zrele ćelije (Mason i sar., 2001). Takođe je pokazano da IL-1 β pospešuje produkciju faktora rasta neurona (NGF) *in vitro* (Carlson i sar., 1999), što ukazuje da ovaj citokin može imati i neuroprotektivno dejstvo.

1.2.3.3. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 je glikoprotein od 26 kDa koji aktivira receptor sastavljen od tri subjedinice: membranski vezana α subjedinica (IL-6R) i dve gp130 subjedinice koje su odgovorne za signalnu transdukciju (Manning i Cantley, 2007; Skiniotis i sar., 2005). Kada se IL-6 veže za ovaj proteinski kompleks, dolazi do homodimerizacije gp130 subjedinica, što omogućava aktivaciju Janus kinaza, kao što su JAK1, JAK2 i TYK2. Ove kinaze potom fosforilišu signalne transduktore i aktivatore transkripcije, tzv. STAT proteine, naročito STAT1 i STAT3 (Jenab i Quinones-Jenab, 2002; Bellido i sar., 1997). Smatra se da je STAT1 važan regulator signalizacije interferonima (IFN) koji su uključeni u urođeni imunski odgovor (Arulampalam i sar., 2011; Lin i Lin, 2010). Nasuprot tome, STAT3 posreduje u ćelijskom preživljavanju, proliferaciji i supresiji apoptoze (Aggarwal i sar., 2006; Hirano i sar., 2000). Aktivirani IL-6R-gp130 receptor kompleks može da inicira signalizaciju kojom se aktiviraju brojni članovi MAPK familije uključeni i u ćelijsko preživljavanje i u odgovore na stres (Cunnick i sar., 2002; Takahashi-Tezuka i sar., 1998; Schiemann i sar., 1997). IL-6 može takođe da indukuje PI3K/Akt signalizaciju (LoPiccolo i sar., 2008; Manning i Cantley, 2007; Brunet i sar., 2001) i tako podstakne preživljavanje ćelija.

Podaci iz literature pokazuju da primena antitela specifičnih za IL-6 smanjuje incidencu i težinu simptoma EAE kod SJL soja miševa (Gijbels i sar., 1995). Nokaut miševi na IL-6 su otporni na indukciju EAE posredstvom mijelin-oligodendrocitnog glikoproteina, MOG (Eugster i sar., 1998; Mendel i sar., 1998; Samoilova i sar., 1998). Za razliku od divljeg soja miševa kod kojih indukcija EAE

izaziva značajnu ushodnu regulaciju VCAM-1, kod EAE IL-6 nokauta detektuju se veoma nizak nivo ekspresije VCAM-1 (Eugster i sar., 1998). Ovi podaci ukazuju na ključnu ulogu IL-6 u regulaciji interakcija između limfocita i endotelnih ćelija tokom autoimunskih procesa u CNS-u. Uz to, Carlson i sar. (1999), pokazali su da IL-6 ima neuroprotektivno dejstvo nakon ekscitotoksičnog dejstva NMDA.

Opisani signalni putevi predstavljaju samo deo složene mreže preko koje nabrojani proinflamatorni citokini ostvaruju svoje dejstvo. Jedan isti citokin može ćeliju usmeriti u različitim pravcima, od preživljavanja do apoptoze. Stoga, ne čudi što postoje kontradiktorni podaci o ulozi proinflamatornih citokina u neurodegeneraciji. Pa ipak, sve veći broj eksperimentalnih i kliničkih studija ukazuju na to da inhibicija jednog ili više proinflamatornih citokina predstavlja dobru opciju u tretmanu neurodegenerativnih oboljenja (za detalje videti Smith i sar., 2012). Mora se, naime, imati u vidu da inflamacija ima pre svega protektivnu ulogu u CNS-u, tako da terapija usmerena samo na inflamatornu komponentu neurodegenerativne bolesti može biti kratkoročna, pa čak i nepovoljna.

1.2.3.4. Interleukin-10 (IL-10)

Zbog svih navedenih razloga, predmet brojnih istraživanja je rasvetljavanje regulatornih mehanizama koji kontrolišu prelazak mikroglije iz aktiviranog stanja indukovanog akutnom inflamacijom, u fenotipska stanja koja su povezana sa oporavkom tkiva i sa održavanjem homeostaze CNS-a. Veliki broj faktora doprinosi smirivanju aktivacije mikroglije i njenom povratku u „mirujuću“ formu, a jedan od njih je IL-10 (Sawada i sar., 1999).

IL-10 je dobro poznati Th2 citokin sa anti-inflamatornim delovanjem, kao i potencijalni terapeutik za tretman organ-specifičnih autoimunskih oboljenja (Cua i sar, 2001). IL-10 deluje imunosupresivno na monocite i makrofage, te snažno suprimira produkciju proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1) od strane ovih ćelija (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991). Receptor za IL-10 spada u klasu receptora koji aktiviraju signalizaciju preko JAK/STAT puta, nakon čega sledi transkripcija selektivnih gena, čiji produkti podstiču proliferaciju ili imaju antiapoptotsko delovanje (Donnelly i sar., 1999). Takođe je pokazano da je IL-10

aktivator PI3K signalnog puta, pa može na taj način da podstakne preživljavanje mikroglije i astrocita (Strle i sar., 2002). Međutim, za anti-inflamatorno delovanje IL-10 potrebna je aktivacija p38/MAPK signalnog puta nakon čega sledi transkripcija gena za enzim Hem oksigenazu-1 (HO-1) (Lee i Chau, 2002). HO-1 je uključena u biosintezu hema i katališe reakciju u kojoj nastaju ugljen monoksid (CO), slobodno gvožđe i hem prekursor biliverdin. Antiinflamatorno delovanje HO-1 je izgleda zavisno od signalizacije preko CO koga ovaj enzim produkuje, budući da uklanjanje CO blokira anti-inflamatorno delovanje IL-10. U terapijske svrhe može da se primenjuje direktno IL-10 ili može da se moduliše aktivnost HO-1.

Na ulogu IL-10 u CNS-u, ukazale su studije na animalnim modelima i ćelijskoj kulturi. Pokazano je da IL-10 deluje neuroprotektivno nakon povrede neurona izazvane hipoksijom (Grilli i sar., 2000; Dietrich i sar., 1999), kao i nakon neurotoksičnog dejstva glutamata (Bachis i sar., 2001). Pored toga, u kulturi oligodendrogljijskih ćelija tretiranih LPS-om ili interferonima, IL-10 sprečava smrt ovih ćelija (Molina-Holgado i sar., 2001). Takođe, IL-10 značajno redukuje inflamatorni odgovor u LPS-stimulisanim mikrogljijskim ćelijama (Kremlev i Palmer, 2005).

1.3. PRIMENA RIBAVIRINA I TIAZOFURINA U NEUROPATHOLOŠKIM STANJIMA

Ribavirin (1- β -D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksamid; VIRAZOL) je sintetski nukleozid, analog guanozina, sa dejstvom protiv velikog broja DNK i RNK virusa (Crotty i sar., 2000), u koje spada i nekoliko RNK virusa odgovornih za neurološka oštećenja kod ljudi i životinja (Colombo i sar., 2011; Hosoya i sar., 2004; Solbrig i sar., 2002). Ribavirin (RBV) je već u kliničkoj upotrebi kod pacijenata obolelih od hepatitisa C (Feld i Hoofnagle, 2005), kao i kod pacijenata obolelih od hepatitisa C ko-inficiranih HIV virusom (Soriano i sar., 2007).

Tiazofurin (TR, 2- β -D-ribofuranozil-tiazol-4-karboksiamid) je sintetski nukleozid sa potentnom antitumorskom aktivnošću pokazanom *in vitro* i *in vivo* (Tímár i sar., 1996; Tóvári i sar., 1996; Weber i sar., 1996a; Carney i sar., 1985).

Tiazofurin (TR) je dospelo u klinička ispitivanja kao lek izbora za tretman pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u blast krizama, ali se pokazao previše toksičnim u drugim malignitetima, pa nema izveštaja o kliničkoj primeni TR od 2002. godine (Chen i Pankiewicz, 2007).

RBV i TR su pro-lekovi što znači da svoje delovanje ispoljavaju tek nakon enzimске konverzije u aktivni metabolit. RBV se tako u ćelijama fosforiliše u ribavirin-trifosfat (RTP), ribavirin-difosfat (RDP) i ribavirin-monofosfat (RMP). TR se konvertuje u tiazofurin-monofosfat (TMP) koji delovanjem NAD-fosforilaze prelazi u aktivni metabolit TAD (tiazol-4-karboksiamid adenin dinukleotid). RBV je kompetativni, a TR nekompetativni inhibitor enzima inozin 5'-monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), koja ima ključnu ulogu u *de novo* sintezi guanozin-5'-trifosfata (GTP) (Weber i sar., 1996). Aktivni metabolit tiazofurina, TAD, inhibira enzim IMPDH na NAD/NADH mestu, dok aktivni metabolit ribavirina, RMP, inhibira enzim na IMP/XMP mestu. To omogućava kombinovanu primenu ovih lekova, pa je registrovano sinergističko antitumorsko i antivirusno dejstvo RBV i TR (Franchetti i sar., 1996; Huggins i sar., 1984). Inhibicija IMPDH snižava koncentraciju GTP-a u ćeliji, što predstavlja osnovu za antivirusne, antitumorske i imunosupresivne efekte nukleozidnih analoga (Tam i sar., 2001; Pankiewicz, 1999; Maisch i sar., 1995).

Postoje dve tetramerne izoforme enzima IMPDH, koje kodiraju različiti geni (Franchetti i sar., 1996). Upotrebom specifičnih cDNK proba za tip I i tip II IMPDH, pokazano je da je iRNK za tip I dominantno eksprimirana u leukocitima i limfocitima čoveka, dok tip II predominira u ćelijama tumora jajnika čoveka, leukemičnim ćelijskim linijama K562 i HL-60 i leukemičnim ćelijama pacijenata obolelih od različitih tipova leukemija (Franchetti i sar., 1996; Nagai i sar., 1992). Oba tipa IMPDH su polipeptidi od 514 aminokiselina sa 84 % homologije u strukturi i sa sličnim afinitetom za supstrate. Pokazano je da rast i diferencijacija leukocita čoveka zavisi od *de novo* puta sinteze purinskih nukleotida (Colby i sar., 1999; Laliberté i sar., 1998). Uloga IMPDH II u regulaciji ćelijske proliferacije i

diferencijacije (Colby i sar., 1999) ukazuje na mogućnost primene inhibitora IMPDH II kao hemioterapeutskih agenasa u imunosupresivnoj terapiji.

U poslednjih deset godina urađene su studije u kojima je pokazano povoljno dejstvo ova dva purinska analoga u smanjenju težine simptoma EAE. Prvo je demonstriran protektivni efekat TR u EAE, zasnovan na smanjenju propustljivosti krvno-moždane barijere usled smanjenja ekstravazacije T limfocita kroz krvne sudove mozga, što je uslov neophodan za progresiju autoimunskih procesa usmerenih ka CNS-u (Stosic-Grujicic i sar., 2002). Povoljni efekat RBV u snižavanju težine simptoma i poboljšanju histopatološke slike EAE indukovano kod DA pacova pokazan je prvi put od strane naše grupe (Milicevic i sar., 2003). Potom je utvrđeno da RBV redukuje produkciju proinflammatoryh citokina oslobođenih iz ćelija drenirajućeg limfnog čvora, što za posledicu ima smanjenje inflamatornih odgovora u CNS-u (Lavrnja i sar., 2008). Takođe smo pokazali da primena kombinovanacije ova dva nukleozidna analoga u terapiji EAE ima snažniji efekat u supresiji bolesti nego njihova pojedinačna primena (Stojkov i sar., 2008, 2006; Lavrnja i sar., 2005).

Sve ove studije ukazale su da su povoljna dejstva RBV i TR uglavnom posledica njihovog delovanja na perifernu inflamatornu komponentu bolesti, a da je bolja očuvanost tkiva kičmene moždine tretiranih EAE životinja zapravo posledica smanjenog ulaska imunskih ćelija u CNS. Međutim, imajući u vidu da obe supstance prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (Colombo i sar., 2011; Janac i sar, 2004; Gilbert i Wade, 1988), naročito kad je ona narušena u patološkim stanjima kao što je EAE, ne može se isključiti i centralni efekat RBV i TR. Stoga su potrebna ispitavanja delovanja ovih supstanci na sve ćelije CNS-a, kako bi se pravilno procenio njihov potencijalni terapijski efekat u EAE. S' obzirom da su mikroglijske ćelije rezidentni makrofagi CNS-a i da imaju veoma značajnu ulogu u nastanku i razvoju MS, one su prvi kandidati za ispitivanje delovanja RBV i TR.

1.3.1. Transport nukleozidnih analoga u ćelije

Nukleozidni analozi transportuju se u ćelije posredstvom dve klase nukleozidnih transportera: uravnotežujućih i koncentrativnih.

Uravnotežujući nukleozidni transporteri (eng. *Equilibrative Nucleoside Transporter - ENT*) obavljaju olakšanu difuziju nukleozida niz gradijent njihove koncentracije (Kong i sar., 2004). Glavni predstavnici ove klase transportera, ENT1 i ENT2, ispoljavaju široku supstratnu specifičnost.

Koncentrativni nukleozidni transporteri (eng. *Concentrative Nucleoside Transporters - CNT*) obavljaju sekundarno aktivni Na⁺-zavisni ko-transport nukleozida (Kong i sar., 2004). Nekoliko studija koje su se bavile ovom problematikom pokazalo je da se RBV u ćelije transportuje posredstvom ENT1, ENT2, CNT2 i CNT3 ali ne i CNT1, (Fukuchi i sar., 2010; Endres i sar, 2009; Yamamoto i sar., 2007), dok se TR transportuje posredstvom svih članova ENT i CNT klase (Damaraju i sar. 2005). Do sada je poznato da mikroglija ispoljava ENT1 (Liou i sar., 2008), pa postoji mogućnost da RBV i TR upravo preko ovih transportera ulaze u ćeliju i potom ostvaruju svoja dejstva.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Do sada opisani povoljni efekti ribavirina i tiazofurina u animalnom modelu multiple skleroze (MS) - eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), zasnivaju se na perifernom dejstvu ovih analoga, odnosno njihovom uticaju na ćelije i procese van centralnog nervnog sistema. Imajući u vidu da ovi nukleozidni analozi prolaze kroz krvno-moždanu barijeru, osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj ribavirina i tiazofurina na funkcije ćelija mikroglije, koje, zbog svoje uloge u razvoju i progresiji MS, predstavljaju centralnu metu delovanja potencijalnih terapeutika i kliničkih tretmana. U skladu sa postavljenim ciljem ove doktorske teze formulisani su sledeći eksperimentalni zadaci:

In vivo:

- ispitati uticaj ribavirina i tiazofurina na težinu EAE, pojavu demijelinizacije, infiltraciju T-limfocita i makrofaga, morfologiju i brojnost mikroglijskih ćelija u kičmenoj moždini EAE životinja;

In vitro:

- ispitati potencijalno citotoksične efekte ribavirina i tiazofurina u primarnoj kulturi nestimuliranih i LPS stimuliranih mikroglijskih ćelija;
- ispitati uticaj ribavirina i tiazofurina na morfologiju nestimuliranih i LPS stimuliranih mikroglijskih ćelija;
- ispitati antiinflamatorno delovanje ribavirina i tiazofurina u modelu LPS stimulirane mikroglije, procenom njihovog dejstva na:
 - produkciju azot monoksida
 - aktivaciju NF-κB signalnog puta
 - gensku ekspresiju i oslobađanje citokina;
- ispitati gensku i proteinsku ekspresiju uravnotežujućih nukleozidnih transportera (ENT1 i ENT2).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Eksperimentalne životinje

U *in vivo* eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova genetski visokosrodnog soja Dark Agouti (DA) starosti 12 nedelja i prosečne težine 200 – 250 g. Tokom eksperimenta životinje su bile smeštene u kavezima (3 – 5/kavezu), pri standardnim uslovima u prostoriji (temperatura: 23 ± 2 °C; relativna vlažnost vazduha: 60 – 70 %), sa slobodnim pristupom vodi i briketiranoj hrani, pri svetlosnom režimu 12 časova dan/12 časova noć. Tokom perioda paralize, životinje su dobijale vodu i hranu iz ruke.

Za *in vitro* eksperimente tj. pripremu primarnih mikroglijskih ćelijskih kultura korišćeni su pacovi Wistar soja starih do 3 dana.

Životinje su uzgajane i dobijene iz odgajališta Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Svi eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (rešenje broj 55/10).

3.1.2. Reagensi, rastvori i medijumi

Tabela 1. Reagensi

Naziv	Proizvođač
BSA	eng. <i>Bovine Serum Albumin</i> , Goveđi serum albumin, (Sigma, Nemačka)
EDTA	Etilendiaminotetra-sirćetna kiselina-dinatrijumova so, dihidrat, (Kemika, Hrvatska)
Fluorescentne boja za jedra	DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen, USA) HOECHST 33342 (Sigma, Nemačka)
HEPES	2-Hidroksietil piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina, (SERVA Electrophoresis, Nemačka)

Li-karbonat	Litijum karbonat (Kemika, Hrvatska)
LPS - lipopolisaharid	Lipopolisaharid zida <i>Escherichia coli</i> O26:B6, (Sigma, Nemačka)
NaNO ₂	Natrijum-nitrit, (Merck, Nemačka)
NaOH	Natrijum hidroksid, (Merck, Nemačka)
RBV	Ribavirin, 1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksiamid, (MP Biomedicals, LLC, Francuska)
Saharoza	(Sigma, Nemačka)
Sulforodamin B	(SRB, Sigma, Nemačka)
TR	Tiazofurin, 2-β-D-ribofuranoziltiazol-4-karboksamid, (ICN Pharmaceuticals, SAD)
Tris	Tris (hidroksimetil) amino-metan (SERVA Electrophoresis, Nemačka)

Tabela 2. Rastvori za nesterilni rad

Naziv	Sastav i proizvođač
0,01 M PBS	<u>Rastvor Na-fosfatnog pufera:</u> 50 ml 0,2 M PB 8,7 g NaCl (Merck, Nemačka) do 1000 ml mqH ₂ O
0,2 M PB (eng. <i>Phosphate buffer</i>)	<u>0,2 M Fosfatni pufer:</u> 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (Merck, Nemačka) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, Nemačka) mqH ₂ O pH 7,4
2-metil butan	(Sigma, Nemačka)
4 % PFA, pH 7,4	40 g paraformaldehid (Sigma, Nemačka) 500 ml dH ₂ O 1M NaOH 500 ml 0,2 M PB
Etanol	100 %, 96 %, 70 %, (Moss Hemos, Srbija)
DAB	(3,3-diaminobenzedine, DAKO, SAD)
DPX	(Fluka, Švajcarska)
Encefalitogena emulzija za imunizaciju	dobija se mešanjem jednakih zapremina KFA i HKM: HKM - Homogenat 1 g kičmene moždine pacova soja Dark Agouti u 1 ml PBS

	KFA - Kompletni Frojndov adjuvans koji sadrži 1 mg/ml <i>Micobacterium tuberculosis</i> (Sigma, Nemačka)
Eozin rastvor	1 g Eozina (SERVA, Nemačka) 20 ml dH ₂ O 80 ml 95 % alkohola
Fiziološki rastvor	0,9 % NaCl, (Hemofarm, Srbija)
Grisov reagens	1% sulfanilamid (Sigma, Nemačka) i 0,1% N-(naftil)-etilenediamin dihidrohlorid (Fluka, Švajcarska) u 2% H ₃ PO ₄ (Merck, Nemačka)
H ₂ O ₂	33 % (Centrohem, Beograd)
Hematoksilin	Hematoksilin, Mayer-ov rastvor spreman za upotrebu (J.T. Baker, SAD)
Kisser-ov gel za montiraje	10 g želatina (Sigma, Nemačka) 35 ml dH ₂ O 30 ml glicerola (Lach Ner, Češka)
Krezil-ljubičasto, rastvor	0,1 % rastvor Krezil-ljubičastog (Sigma, Nemačka) u 1 % sirćetnoj kiselini
Kristal-ljubičasto rastvor	0,5 % vodeni rastvor kristal-ljubičastog (Sigma, Nemačka)
LFB rastvor	0,1 g Luxol Fast Blue – MBS (Sigma, Nemačka) 100 ml 95 % alkohola 0,5 ml sirćetne kiseline
Moviol	9,6 g Mowiol-a (Calbiochem, EMD Millipore, SAD) 24 ml glicerola (Lach Ner, Češka)
sirćetna kiselina	min. 99,5 %, (Kemika, Hrvatska)
TCA	eng. <i>trichloroacetic acid</i> , trihlor-sirćetna kiselina, (Kemika, Hrvatska)
Tripan plavo 0.4 % rastvor	eng. <i>Trypan Blue solution</i> , 0.4%, tečan, sterilan, pogodan za ćelijsku kulturu (Sigma, Nemačka)

Tabela 3. Sterilni rastvori za PCR u realnom vremenu

Naziv	Sastav i proizvađač
DEPC	dietil-pirokaronat, potentni inhibitor RNKaze, (Sigma, Nemačka)

DEPC tretirana voda	dodati 1ml 0,1% dietil-pirokarbonata u 1000 ml dH ₂ O, promešati, autoklavirati
Komplet za DNazni tretman	(Fermentas, Litvanija) 10x reakcioni pufer sa MgCl ₂ DNaza I/bez RNaze 25 mM EDTA
Komplet za sintezu cDNK	High Capacity cDNA reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems, SAD): 10× RT pufer 10× RT nasumični prajmeri 25× dNTP Mix MultiScribe™ Reverzna Transkriptaza
Rastvori za izolaciju RNK	PeqGold, (PepLab, Biotechnologie, Nemačka); hloroform, (Zorka, Srbija); izopropanol (J.T. Baker, SAD); 70 % etanol napravljen u DEPC
SYBR Green	eng. <i>PCR Master Mix gene expression assay</i> (Applied Biosystems, UK)
Ultra čista destilovana voda bez DNaze i RNaze	upH ₂ O, eng. <i>UltraPure™ DNase /RNase Free Distilled Water</i> (Invitrogen™/GIBCO, USA)

Tabela 4. Medijumi i reagensi za kulturu

Naziv	Sastav i proizvođač
10X PBS, sterilni	Dulbecco-ov bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ , (PAA Laboratories, Austrija)
1X PBS, sterilni	900 ml streilne vode 100 ml 10X PBS sterilnog bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (Gibco, InvitrogenCo, SAD)
DNaza I bez RNaze	(Sigma, Nemačka)
FCS	eng. <i>Fetal Calf serum</i> , Fetalni teleći serum, (PAA Laboratories, Austrija), inaktiviran od 44°C - 53°C u periodu od 10 min
kDMEM (medijum za primarnu mešovitu glijsku kulturu)	DMEM 10 % FCS 1 % streptomycin/penicilin
Kondicionirani medijum za mikroglijsku kulturu	100 % (v/v) kDMEM skupljen nakon izolacije mikroglijskih ćelija posle inkubacije sa mešovitom

– KM	glijskom kulturom
Rastvor za disocijaciju	za 6 životinja: 10 ml DMEM; 0,024 g HEPES; 0,002 g EDTA; 0,020 g tripsina
Sterilna voda	(PAA Laboratories, Austrija)
strep/pen	smeša antibiotika streptomicina i penicilina, 100X, (PAA Laboratories, Austrija)
Tripsin	tip XI, iz goveđeg pankreasa (Sigma, Nemačka)

3.1.3. Antitela

Tabela 5. Primarna antitela:

Specifično za	poreklo	reaktivnost na vrste	Proizvođač	Razblaženje
ED1	miš monoklonsko	pacov	Serotec	1:100 (<i>in vivo</i>); 1:400 (<i>in vitro</i>)
ENT1	zec poliklonsko	pacov	dobijeno od Lauri Alanko	1:500
ENT2	zec poliklonsko	pacov	dobijeno od Lauri Alanko	1:500
GFAP	zec poliklonsko	miš, pacov, mačka, pas, ovca, krava, čovek	Dako	1:700
Iba1	koza poliklonsko	pacov, morsko prase, svinja, čovek	Abcam	1:700
NF-kB/ p65	zec poliklonsko	miš, pacov, čovek	Santa Cruz	1:200

Tabela 6. Komplet za ELISA (*eng. - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – enzim-vezani imunosorbent test, R&D Systems, SAD*):

Imunotest na primarno antitelo:	Sekundarno antitelo
<i>E. coli</i> eksprimirano rekombinantno monoklonsko anti-TNF- α /TNFSF1A specifično za pacova	poliklonsko anti-pacovsko TNF- α konjugovano sa peroksidazom rena
<i>E. coli</i> eksprimirano rekombinantno poliklonsko anti-IL-1 β /IL-1F2	poliklonsko anti-pacovsko IL-1 β konjugovano sa peroksidazom rena

specifično za pacova <i>E. coli</i> eksprimirano rekombinantno monoklonsko anti-IL-6 specifično za pacova	poliklonsko anti-pacovsko IL-6 konjugovano sa peroksidazom rena
<i>E. coli</i> eksprimirano rekombinantno monoklonsko anti-IL-10 specifično za pacova	poliklonsko anti-pacovsko IL-10 konjugovano sa peroksidazom rena

Tabela 7. Sekundarna antitela

specifično st za vrstu	Konjugovano sa	Porekl o	Proizvođa č	razblažen je
anti-mišje	HRP (peroksidaza rena)	koza	Santa Cruz	1:200
anti-kozje	HRP (peroksidaza rena)	magarac	Dako	1:200
anti-zečje	Alexa Flour 488	magarac	Invitrogen	1:200
anti-zečje	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
anti-mišje	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:200
anti-mišje	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
TSA™ Komplet	<i>eng.</i> - Tyramide signal amplification KIT (Invitrogen, USA), tiramid signalni amplifikujući komplet, sadrži: Alexa Fluor 488 tiramid (komponenta A), Dimetilsulfoksid (DMSO; komponenta B) anti-zečje HRP konjugovano sekundarno antitelo IgG iz koze (komponenta C) Blokirajući reagens (komponenta D) Puffer za amplifikaciju (komponenta E; sadrži 0.02% timerosal) Vodonik- peroksid (30% H ₂ O ₂ ; komponenta F), stabilan rastvor			

3.2. METODE

3.2.1. *In vivo* eksperiment

3.2.1.1. *Aktivna indukcija i evaluacija EAE*

EAE je indukovan podkožnim injeciranjem 100 µl encefalitogene emulzije za imunizaciju u zadnju desnu šapu životinje.

Kod imunizovanih životinja svakodnevno je praćena pojava simptoma bolesti. EAE se manifestuje atonijom repa, parezom i paralizom zadnjih ekstremiteta, kao i inkontinencijom fecesa i urina. Težina bolesti izražena je na osnovu subjektivne procene evaluatora (slepi test*, eng. *single-blind experiment*), po arbitrarnoj skali od 0 do 5: 0 – odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 1 – parcijalna ili kompletna atonija repa; 2 – pareza zadnjih ekstremiteta; 3 – paraliza zadnjih ekstremiteta; 4 – potpuna paraliza zadnje polovine tela (moribundno stanje); 5 – smrt životinje.

* Evaluator nije bio upoznat sa podacima o tretmanu grupa.

3.2.1.2. *Eksperimentalne grupe i tretman životinja*

Eksperimentalne životinje kod kojih je izazvan EAE aktivnom imunizacijom podeljene su u dve grupe:

1. **EAE grupa** - intraperitonealno (i.p.) je injecirano po 0,2 ml/kg telesne težine (t.t.) fiziološkog rastvora svakog dana od pojave prvog simptoma bolesti (atonija repa), sledećih 15 dana.
2. **RBV+TR-tretirana grupa** - tretirana kombinacijom RBV i TR (Tab. 1, rastvoreni u fiziološkom rastvoru, neposredno pred upotrebu). RBV je davan i.p. u dozi od 30 mg/kg t.t. svakog dana, a TR u dozi od 10 mg/kg t.t. svakog drugog dana od pojave prvog simptoma bolesti. Period tretiranja trajao je 15 dana.

Potrebno je naglasiti da smo u ranijim eksperimentima primetili vremensko variranje u pojavi prvog simptoma bolesti, pa smo u ovom eksperimentu tretman započinjali nakon pojave atonije kod svake jedinke individualno (od 7. do 11. dana

nakon imunizacije), kako bismo bili sigurni da ispitivane supstance nisu bile u interakciji sa efektorskom fazom EAE. Životinje su žrtvovane pod dubokom etarskom anestezijom 15 dana nakon početka tretmana tj. od 21 – 25. dana nakon imunizacije u zavisnosti od početka bolesti.

3.2.1.3. Parametri bolesti

U cilju detaljnije analize EAE, praćeni su sledeći parametri bolesti:

- **Srednja dnevna vrednost težine bolesti** – suma težine simptoma bolesti za sve pacove unutar grupe po danu podeljena sa brojem pacova (16) u grupi.
- **Srednja vrednost težine bolesti u toku perioda tretiranja** – zbir srednjih dnevnih vrednosti težine bolesti podeljen sa brojem dana tretiranja (15 dana).
- **Maksimalna težina bolesti** – zbir maksimalnih stepena bolesti koju je dostigla svaka životinja unutar grupe u periodu tretiranja (15 dana) podeljena sa brojem životinja (16 pacova po grupi);
- **Trajanje paralize** – zbir broja dana kada je svaka životinja unutar grupe imala paralizu u periodu tretiranja (15 dana) podeljena sa brojem životinja.

3.2.1.4. Priprema životinjskog tkiva

Kičmena moždina je izolovana iz pacova nakon petnaestodnevnog tretiranja fiziološkim rastvorom ili kombinacijom RBV+TR. Lumbalni delovi kičmenih moždina su 12 časova fiksirani u 4 % PFA, nakon čega su radi kriozaštite stavljeni u rastuće koncentracije rastvora saharoze (10 %, 20 % i 30 %) u 0.2 M fosfatnom puferu (pH 7,4) na 4 °C. Tkivo je zatim zamrznuto u 2-metil butanu na – 80 °C, uvijeno u parafilm i skladišteno na – 80 °C do sećenja na kriotomu.

3.2.1.5. Histochemija i imunohistochemija

Radi ispitivanja patološke slike histohemijskim i imunohistochemijskim metodama, na kritomu su sečeni poprečni preseći lumbalnog dela kičmene moždine debljine 16 μm .

Kluweer & Burrera metoda za bojenje mijelina i infiltrata – Luxol fast blue (LFB)/krezil ljubičasto:

- Lumbalni kriopreseći kičmene moždine su prvo isprani u 95 % alkoholu.
- Zatim su inkubirani 2 sata u LFB-rastvoru na + 60 °C.
- Preseći su ponovo ispirani u 95 % alkoholu, pa u dH₂O.
- Nakon toga je izvršeno odbojavanje u vodenom rastvoru 0,05 % Li-karbonata.
- Poslednja tri koraka se ponavlja do trenutka kada se siva masa jasno razlikovala od bele, što se proveravalo na mikroskopu. U ovom stadijumu nukleusi su bili bezbojni, a mijelin tirkizan na veoma bleđoj sivo-plavoj podlozi.
- Preseći su potom tretirani 10 min u rastvoru krezil-ljubičastog.
- Potom su pločice sa presećima isprane u dH₂O, pa su preseći odbojavani u 70 % alkoholu dok se nukleusi i Nislova supstanca nisu obojili ljubičasto, a mijelin plavo.
- Preseći su kratko isprani u 100 % alkoholu, držani 10 min u ksilolu i montirani DPX.

Imunohistochemijsko obeležavanje lumbalnih kriopreseka kičmene moždine sa ED₁ markerom za mikroglijske ćelije/makrofage.

Za vizualizaciju reakcije antigen-antitelo na kojoj se zasniva imunohistochemijsko obeležavanje, korišćeno je imunoperoksidazno bojenje, gde je primarno antitelo neobeleženo, a sekundarno je konjugovano sa peroksidazom rena, koja pokreće bojenu reakciju. Kao hromogen za ovakav tip reakcije korišćen je DAB, koji nakon razlaganja enzimom peroksidaza rena razvija specifičnu braon boju.

- Pločice sa kriopresecima su prvo isprane u 0,01 M PBS-u.
- Nakon toga kriopreseci su inkubirani 20 min u 0,3 % H₂O₂ u metanolu, kako bi se blokirala endogena peroksidaza.
- Kriopreseci su posle ispiranja u 0,01 M PBS-u, 30 min inkubirani sa 5 % kozjim serumom, čime su blokirana sva mesta za koje antitelo može nespecifično da se veže.
- Potom su kriopreseci preko noći inkubirani sa primarnim anti-ED1 antitelom iz miša, na 4 °C.
- Sutradan su antitela koja se nisu vezala za odgovarajući antigen uklonjena dužim ispiranjem u 0,01 M PBS-u, nakon čega su kriopreseci inkubirani 2 sata na sobnoj temperaturi sa anti-mišjim sekundarnim antitelom poreklom iz kože i konjugovanim sa peroksidazom rena.
- Za vizualizaciju kompleksa, kao supstrat peroksidazi rena ponuđen je DAB
- Reakcija je nakon nekoliko min prekinuta u česmenskoj vodi, nakon čega su preseci dehidratirani serijom alkohola rastućih koncentracija (70 %, 96 % i 100 %), prosvetljeni u ksilolu i montirani DPX.

Imunoreaktivnost mikroglijskih ćelija je kvantifikovana po sledećoj skali: 0 nema imunoreaktivnosti, + minimalna, ++ umerena, i +++ jaka imunoreaktivnost. Rezultati su bazirani na subjektivnoj proceni evaluatora (slepi test*, eng. *single-blind experiment*) lumbalnih regiona kičmene moždine 3 do 4 životinje po ispitivanoj grupi.

* Evaluator nije bio upoznat sa podacima o tretmanu grupa.

3.2.2. In vitro eksperiment

3.2.2.1. Priprema ćelijske kulture

Primarna ćelijska kultura mikroglije dobijena je iz mozгова pacova starih do tri dana. Mozak je izolovan i uklonjene su moždane ovojnice, a hemisfere su isprane tri puta u hladnom i sterilnom PBS-u. Tkivo je zatim mehanički homogenizovano u 35-mm Petri posudama (3 do 4 hemisfere u 2 ml PBS-a).

Homogenat je prebačen u 15 ml-epruvete, tkivo je staloženo gravitacionom sedimentacijom, nakon čega je držano u rastvoru za disocijaciju 30 min u inkubatoru (37 °C / 5 % CO₂). Po uklanjanju rastvora za disocijaciju, u homogenat je dodato 2 ml kDMEM zagrejanog na 37 °C uz dodatak DNaze I. Dalja mehanička homogenizacija izvršena je provlačenjem tkiva kroz staklene Pasterove pipete, čime je homogenat disociran do nivoa ćelije. Ovako pripremljeni ćelijski homogenati prebačeni su u flaskove za kulturu i dodato je 10 ml kDMEM (37°C). Ćelije su gajene u inkubatoru, na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5 % sadržaja CO₂, a medijum je menjan svaka dva do tri dana. Ovako pripremljena kultura je mešovita kultura mikroglije i astrocita. Deset do četrnaest dana nakon izolovanja, mikroglijske ćelije odvajane su od astrocita trešenjem flaska, nakon čega mikroglija pluta u medijumu, dok astrociti ostaju zalepljeni za podlogu. Medijum sa mikroglijom se odliva iz flaska u 50 ml epruvete i centrifugira na 3000 rpm 5 min kako bi se ćelije staložile.

Supernatant je zatim odlivan i čuvan kao kondicionirani medijum (KM), a broj ćelija je određen bojenjem u 0,4 % rastvoru tripan-plavog u Neubauer komorici za brojanje na invertnom mikroskopu. Tripan-plavo je boja koja prodire kroz ćelije koje su izgubile membranski integritet tj. mrtve ćelije. Na taj način, se vijabilne ćelije razlikuju od mrtvih ćelija u toku brojanja. Mikroglijske ćelije resuspendovane u KM pomešane su sa 0,4 % rastvorom tripan plavog u odnosu 1:1 (faktor dilucije = 2, razblaženje ćelija u odnosu na boju). Po 10 µl obojene ćelijske suspenzije ubrizgano je u obe izbrazdane Neubauer komorice i ćelije su prebrojane tokom perioda od tri do pet minuta. Svaka komorica ima 9 kvadrata, a površina svakog kvadrata je 1 mm². Ćelije su izbrojane u po četiri kvadrata obe komorice, na osnovu čega je dobijen prosečan broj ćelija po mm². Zapremina koju ćelije zauzimaju preko jednog kvadrata je 1 µl. Broj vijabilnih ćelija/ml medijuma preračunat je prema sledećoj formuli:

$$\frac{\text{Broj ćelija po 1 kvadratu} \times 10^4 \times \text{faktor dilucije}}{1 \text{ ml}}$$

Za imunocitohemijske, imunofluorescentne i morfološke analize, ćelije su zasejane u gustini od 4 x 10⁴ na okruglim 14-mm stakalcima u 35-mm petri

posudama u 2 ml KM. Za test citotoksičnosti sulforodaminom B (SRB), test vijabilnosti kristal-ljubičastim, Griess test merenja produkcije nitrita i ELISA test, ćelije su zasejane u gustini od 8×10^4 po bunariću, u mikrotitar pločama sa 96-otvora, u 200 μ l KM. Za dobijanje RNK ekstrakata, 8×10^5 ćelija je zasejavano po otvoru u mikrotitar pločama sa 6-otvora u 2 ml KM.

3.2.2.2. Tretman mikroglijskih ćelijskih kultura

Mikroglijske ćelije su izolovane i zasađene u odgovarajućim posudama i odgovarajućem broju, kao što je navedeno u prethodnom odeljku, a potom su inkubirane u CO₂ inkubatoru na 37 °C, i tretirane na sledeći način:

- intaktne nestimulisane ćelije;
- mikroglijske ćelije stimulisane LPS-om u dozi od 25 ng/ml;
- nestimulisane ćelije tretirane RBV-om (u dozama od 1, 5, 10 i 20 μ M); TR-om (u dozama od 1, 5, 10 i 20 μ M) i kombinacijom RBV+TR (u dozama od: 10 + 5 μ M);
- LPS stimulisane ćelije, tretirane RBV-om (u dozama od 1, 5, 10 i 20 μ M); TR-om (u dozama od 1, 5, 10 i 20 μ M) i kombinacijom RBV+TR (u dozama od: 10 + 5 μ M) .

Stimulacija i tretmani bili su simultani i trajali su 48 h.

3.2.2.3. Imunocitohemija i morfometrijska analiza

Za morfometrijske analize, mikroglijske ćelije su nakon fiksacije 20 min u 4 % PFA na 4 °C, bojene nespecifično hematoksilin/eozinom (H/E), po standardnoj proceduri. Hematoksilin je bazna boja (katjonska), nosi pozitivno naelektrisanje i vezuje se za negativno naelektrisane elemente jedra, koja nakon bojenja dobijaju plavo-ljubičastu boju. Ćelije su inkubirane sa hematoksilinom 5 min, zatim su isprane u česmenjskoj vodi, pa dH₂O. Potom su 5 min bojene eozinom, kiselom bojom (anjonska) koja boji citoplazmu u svetlo-narandžasto. Pokrovna stakalca sa ćelijama su potom kratko isprana u dH₂O i montirana Kisser gelom. Površine ćelija kvantifikovane su u AxioVision Rel. 4.6 programskom paketu. Merene su ćelije u

pet kvadrata (500 x 500 μm^2) po pločici, na tri pločice po individualnoj mikroglijskoj kulturi u tri nezavisna eksperimenta (n=15 po jednom eksperimentu).

Rezultati dobijeni nespecifičnim bojenjem H/E provereni su imunocitohemijskim obeležavanjem mikroglijskih ćelija Iba1 markerom. Ćelije su prvo fiksirane 20 min u 4 % PFA na 4 °C, a potom je neutralisana endogena peroksidaza sa 0,3 % H_2O_2 u metanolu, 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS-u, blokirano je moguće nespecifično vezivanje primarnog antitela inkubacijom u 5 % BSA, 30 min. Ćelije su inkubirane preko noći na 4 °C sa kozjim anti-Iba1 antitelom, a potom su dobro isprane PBS-om i inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa anti-kozjim sekundarnim antitelom poreklom iz magarca, konjugovanim sa peroksidazom rena. Obeležavanje peroksidazom je vizualizovano inkubacijom sa 0,05 % DAB. Reakcija je prekinuta ispiranjem u česmenkoj vodi, nakon čega su ćelije pokrивene Kisser gelom.

Za dvojno obeležavanje mikroglijskih ćelija korišćena su sekundarna antitela obeležena fluorescentnim bojama, a protokol je bio sledeći:

- mikroglijske ćelije su prvo prošle proces fiksacije kao i za svetlosnu mikroskopiju, nakon čega su kratko isprane u PBS-u.
- Potom su ćelije permeabilisane u 0,25 % Triton X – 100, 10 min, pa isprane u PBS-u.
- Ćelije su nakon toga inkubirane 30 min u 5 % BSA, radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja.
- Mikroglijske ćelije su potom duplo obeležene sledećim kombinacijama primarnih antitela:

zečjim anti-GFAP/mišjim anti-ED1 – radi proveravanja čistoće mikroglijske kulture, tj. nivoa kontaminacije astrocitima. Ova primarna antitela konjugovana su sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim fluorescentnim bojama:

anti-zečje obeleženo sa Alexa-488 iz magarca (za GFAP)/anti-mišje obeleženo sa Alexa-555 iz magarca (za ED1);

- Mikroglijske ćelije su prvo inkubirane sa zečjim anti-GFAP preko noći na 4 °C.
- Sutradan po ispiranju u PBS-u, ćelije su inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti-zečje obeleženo sa Alexa-488 iz magarca).
- Nakon ispiranja u PBS-u, ćelije su ponovo inkubirane 30 min sa 5 % BSA.
- Zatim su ćelije obeležene drugim primarnim antitelom, mišjim anti-ED1 i to inkubacijom preko noći na 4 °C.
- Sutradan po ispiranju u PBS-u, ćelije su inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti-mišje obeleženo sa Alexa-555 iz magarca).
- Nakon dužeg ispiranja u PBS-u, jedra ćelija su obeležena fluorescentnom DAPI bojom koja boji nukleuse.
- Posle ispiranja u PBS-u, ćelije su pokrивene moviolom.

Takođe, radi provere ekspresije ENT1 i ENT2, mikroglijske ćelije su inkubirane sa primarnim antitelima na ove transportere, a imunoreakcija je vizualizovana pomoću TSA kompleta (po uputstvima proizvođača), koji se bazira na fluorescenciji. Ćelije su istovremeno obeležene i ED1 markerom za mikrogliju (vizualizovan sa anti-mišjim sekundarnim Alexa-555 iz magarca), kao i fluorescentnom bojom za jedra HOECHST.

Kontrole za imunocitohemiju i imunofluorescenciju su prošle kroz istu proceduru kao i sve ćelije osim što je izostavljen korak sa primarnim antitelom. Kod takvih kontrola nije bilo imunopozitivne reakcije. Ćelije su slikane Zeiss Axiovert mikroskopom. Ko-lokalizacija na fluorescentnim slikama određena je upotrebom AxioVision Rel. 4.6 programa, koji ide uz Zeiss Axiovert mikroskop.

3.2.2.4. Imunofluorescentni esej

Efekat RBV, TR i RBV+TR na nuklearnu translokaciju p65 subjedinice NF- κ B ispitan je imunofluorescentnim esejem kao što je opisano u Hwang i sar. (2008). Za detekciju intracelularne lokacije p65 subjedinice NF- κ B, mikroglijske

ćelije (4×10^4 ćelija/14 mm stakalcu) tretirane su 48 sati sa LPS, RBV, TR i njihovom kombinacijom. Nakon ovog vremenskog perioda ćelije su kratko isprane u PBS-u i fiksirane 20 min sa hladnim 4 % PFA na 4 °C. Nakon fiksiranja ćelije su isprane 3x3 min u PBS-u. Potom su ćelije permeabilizovane u 0,5 % triton X-100 u PBS-u, jedan sat na sobnoj temperaturi, a onda isprane sa 0,05 % Tween-20 u PBS-u, 10 min i 0.05 % Tween-20/1 % BSA u PBS-u, 5 min. Permeabilisane ćelije su potom jedan sat inkubirane sa zečjim anti-NF-kB p65 na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprane sa 0,05 % Tween-20/1 % BSA u PBS-u, 5 min. Ćelije su potom dva sata inkubirane sa sekundarnim antitelom (anti-zečje obeleženo sa Alexa-555 iz magarca), na sobnoj temperaturi. Nakon 5 min ispiranja sa 0,05 % Tween-20 u PBS-u, i potom 5 min samo u PBS-u, mikroglija je inkubirana 30 min u 5 % BSA. Nakon toga ćelije su inkubirane sa monoklonskim mišijim anti-ED1 preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, ćelije su isprane u PBS-u i inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti-mišje obeleženo sa Alexa-488 iz magarca). Nakon dužeg ispiranja u PBS-u, jedra ćelija obeležena su fluorescentnom DAPI bojom koja boji nukleuse. Posle ispiranja u PBS-u, ćelije su pokrivena moviolom. Broj ćelija sa NF-kB p65 translokacijom u jedro (ko-lokalizacija NF-kB p65 i DAPI) određivan je pomoću fluorescentnog mikroskopa. Ćelije su brojane na 3 pokrovna stakalca po grupi po individualnoj mikroglijskoj kulturi u 3 nezavisna eksperimenta.

3.2.2.5. Test citotoksičnosti

Pojedinačan uticaj ribavirina, tiazofurina kao i kombinacije ove dve supstance na vijabilnost mikroglijskih ćelija ispitan je primenom sulforodamin B (SRB) testa. SRB je negativno naelektrisana supstanca koja nosi dve sulfonske grupe kojima se elektrostatički vezuje za bazne ostatke aminokiselina, bojeći time proteine, prethodno fiksiranih ćelija, ružičastom bojom. Test je izveden prema proceduri opisanoj od strane Skehan i sar., (1990) i uključivao je sledeće korake:

1. Ćelije gajene u mikrotitar pločama sa 96 otvora su najpre fiksirane sa 50 % TCA (50 μ l/otvoru), jedan sat na 4°C.
2. Ploče su ispirane četiri do pet puta česmenkom vodom.

3. Čelije u mikrotitar pločama su inkubirane 30 min sa 100 μ l/otvoru 0,4 % SRB na sobnoj temperaturi. Rastvor SRB je napravljen u 1 % sirćetnoj kiselini.
4. Čelije su isprane nekoliko puta u 1 % sirćetnoj kiselini, kako bi se uklonio višak nevezanog SRB, nakon čega su ploče sušene sat i po na 45 °C.
5. SRB vezan za proteine je rastvoren u 10 mM Tris-u (200 μ l po bunariću).
6. Očitana je apsorbanca na ELISA čitaču, na talasnoj dužini od 540 nm, sa korekcijom na 670 nm.

Rezultati su predstavljeni relativno, kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu kod nestimulisane/netretirane mikroglije, koja je arbitrarno definisana kao 100%. Testovi citotoksičnosti izvedeni su u triplikatu i ponovljeni su najmanje dva puta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost proba \pm standardna greška.

Na osnovu procene citotoksičnog dejstva RBV i TR na nestimulisane ili LPS-stimulisane mikroglijske ćelije, konstruisana je dozno-zavisna kriva iz koje je određena vrednost EC₅₀. Parametar EC₅₀ predstavlja dozu pri kojoj se postiže polovina maksimalnog efekta. EC₅₀ vrednosti su izračunate pomoću programskog paketa Origin 7.0.

3.2.2.6. Određivanje koncentracije nitrita

Stvaranje azot-monoksida (NO) određeno je merenjem koncentracije nitrita, kao krajnjeg proizvoda oksidacije ovog gasa, u medijumu, primenom modifikovane Griess-ove metode:

1. 50 μ l supernatanta iz odgovarajućih mikroglijskih kultura je pomešano sa 50 μ l Griess-ovog reagensa i 10 min inkubirano u mraku na sobnoj temperaturi.
2. Potom je merena apsorbanca na 570 nm.

Za konstruisanje standardne krive korišćene su poznate koncentracije natrijum-nitrita (NaNO₂). Dobijene vrednosti su korigovane oduzimanjem vrednosti koja je dobijena za kondicionirani medijum. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška dobijene iz tri nezavisna eksperimenata urađena u triplikatu, a vrednosti produkcije nitrita izražene su u μ M.

3.2.2.6.1. Normalizacija produkcije nitrita na ćelijsku gustinu

Nakon uklanjanja medijuma u kojem je određena koncentracija nitrita, u svakom pojedinačnom bunariću određena je gustina ćelija kolorimetrijskim testom sa kristal-ljubičastim. Intenzitet boje kristal-ljubičasto direktno je proporcionalan broju adheriranih ćelija. Osim ukupne produkcije nitrita, podatak o gustini ćelija, omogućio je normalizaciju produkcije nitrita na broj ćelija (Barton i sar., 1995). Kolorimetrijski test sa kristal-ljubičastim sastoji se u sledećem:

1. Ispiranje ćelija u PBS-u.
2. Fiksiranje u hladnom 4 % PFA na 4 °C, 15 min.
3. Inkubacija sa 0,5 % rastvora kristal-ljubičastog (100 µl/bunariću) tokom 30 min na sobnoj temperaturi.
4. Ispiranje u česmenskoj vodi kako bi se otklonio višak boje i sušenje ploče preko noći.
5. Ekstrakcija kristal-ljubičastog primenom 50 µl 33 % sirćetne kiseline po bunariću.
6. Očitavanje apsorbance na 570 nm.

Produkcija nitrita po broju ćelija prikazana je kao odnos ukupne produkcije nitrita i inteziteta kristal ljubičastog. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardna greška, dobijene iz tri nezavisna eksperimenata urađena u triplikatu.

3.2.2.7. RT-PCR

PCR (eng. *polymerase chain reaction*) je postupak umnožavanja ciljne sekvence DNK ili RNK, koji se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze. Za ovu reakciju je potrebna DNK matrica ili iRNK (kada se uključuje korak reverzne transkripsije kako bi se dobila cDNK, a takav PCR se naziva RT-PCR), amplimeri, dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim DNK zavisna DNK polimeraza koji katalizuje ugradnju nukleotida u novi lanac DNK.

U ovom eksperimentu urađena je analiza promena na nivou iRNK metodom semikvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (eng. *quantitative real time*

polymerase chain reaction, Q-PCR/qRT-PCR). Metoda najpre obuhvata korak reverzne transkripcije u kome se ukupna iRNK prevodi u cDNK, i potom korak umnožavanja dela cDNK od interesa. Proces umnožavanja se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i njegova elongacija. Kod PCR-a u realnom vremenu u svakom ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta, što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

3.2.2.7.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK izolovana je iz 8×10^5 ćelija po eksperimentalnoj grupi, primenom peqGold reagensa i fenol/hloroform ekstrakcije. Specifikacija rastvora korišćenih za izolaciju RNK data je u tabeli 3. Postupak izolacije se sastojao iz nekoliko koraka:

- 1. Homogenizacija** - ćelije su lizirane dodavanjem 800 μ l peqGold-a i homogenizovane provlačenjem lizata kroz pipetu nekoliko puta. Ovako lizirani i homogenizovani uzorci se mogu čuvati do mesec dana na -70 °C.
- 2. Razdvajanje faza** - homogenizovani uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali, a potom je dodato 160 μ l hloroforma na 800 μ l peqGold-a. Tube su vorteksovane dok rastvor nije postao beo, a potom je usledila desetominutna inkubacija na ledu. Uzorci su potom centrifugirani 5 min na 12000 g, na 4 °C. Smeša se na taj način razdvaja na žutu fenol-hloroformsku fazu, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalaze RNK molekuli. Gornja faza iznosi oko 50% volumena peqGold-a korišćenog za homogenizaciju.
- 3. Precipitacija RNK** – gornja faza je prenetu u nove tubice u koje je dodato 400 μ l izopropanola, a potom su tubice snažno izvorteksovane. Uzorci su inkubirani 15 min na ledu, a onda centrifugirani 5 min na 12000 g, na 4 °C. RNK se na ovaj način staložila na dnu tubica u vidu beličastog taloga.
- 4. Ispiranje RNK** – iz tubica je uklonjen supernatant. Talog RNK je ispran sa 800 μ l hladnog 70 % etanola (napravljen u 0,1 % DEPC), nakon čega je

usledilo centrifugiranje 5 min na 12000 g, na 4 °C. Ispiranje u etanolu je ponovljeno još jedanput. Na ovom koraku procedura može da se prekine i RNK u 70 % etanolu može da se čuva na -20°C i do godinu dana.

5. Rastvaranje RNK – etanol je odliven, a tubice su ostavljene do 30 min, da se talog osuši. Talog ne sme da se presuši, jer se time smanjuje njegova rastvorljivost. Nakon sušenja, RNK je rastvorena u 12 µl upH₂O, provlačenjem kroz pipetu nekoliko puta. Tubice su potom držane 30 min na 55 °C u termomikseru na 1200 rpm, nakon čega je usledilo kratko centrifugiranje i na kraju skladištenje na -20°C.

Pre skladištenja koncentracija RNK u uzorcima određena je spektrofotometrijski.

3.2.2.7.2. DNazni tretman i reakcija reverzne transkripcije

Pre reakcije reverzne transkripcije (RT), izlovena ukupna RNK tretirana je DNazom I kako bi se uklonila sva eventualno zaostala DNK, koja pri PCR reakciji može da da lažan rezultat u pogledu genske ekspresije. Tretman DNazom I je izveden po protokolu proizvođača, tako što je 1 µg ukupne RNK inkubiran sa 1U DNaze I tokom 30 min na 37 °C. DNaza I je inaktivirana dodavanjem 25 mM EDTA i inkubacijom 10 min na 65 °C. Konačna zapremina po uzorku, posle DNaznog tretmana, je 10 µl u kojoj se nalazi 1 µg RNK (tj. 0,1 µg RNK/ µl uzorka). Nakon ove reakcije može se započeti RT reakcija, bez dodatnih prečišćavanja.

Reverzna transkripcija je reakcija u kojoj se na osnovu RNK molekula kao matrice, sintetiše komplementarni lanac molekula DNK (cDNK). Za reakciju sinteze cDNK neophodan je enzim reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza), dezoksiribonukleotidi, inhibitor enzima RNaze i prajmer za početak sinteze molekula cDNK. Kao prajmeri mogu poslužiti nasumični (eng. *random*) heksameri, 3' prajmeri i oligo-dT niz od 12 – 18 dTTP nukleotida. Za RT korišćen je komplet za sintezu cDNK sa nasumičnim heksamerima. Reakciona smeša u zapremini od 20 µl je sadržavala: 2 µl 10x RT pufera, 0,8 µl 25x dNTP Mix-a (100 mM), 2 µl 10x nasumičnih RT prajmera, 1 µl MultiScribe reverzne transkriptaze,

4,2 μ l DEPC-om tretirane vode i 10 μ l uzorka koji sadrži 1 μ g RNK. Potom je reakciona smeša prošla kroz 4 termalna ciklusa za sintezu cDNK:

1. 10 min/25 °C
2. 120 min/37 °C
3. 5 min/85 °C
4. Skladištenje na 4 °C, gde može da stoji neograničen vremenski period

3.2.2.7.3. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

qRT-PCR-om je određivan nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena koji se paralelno umnožava. Ovaj kontrolni gen se još naziva endogena ili interna kontrola i predstavlja gen koji ima konstitutivan nivo ekspresije u jednom tipu ćelija ili tkivu, nezavisno od sredinskih faktora, stanja u kome se ćelija nalazi ili eksperimentalne procedure kojoj je podvrgnuta. Primena endogene kontrole neutrališe tehničke greške u proceni ekspresije gena od interesa.

Za praćenje DNK sinteze koristili smo fluorescentnu boju SYBR green, koja se vezuje za dvolančanu, ali ne i jednolančanu DNK. Reakciona smeša za amplifikaciju ciljnih gena i endogene kontrole (β -aktin) je sadržala: SYBR Green, cDNK (tj 10 ng iRNK prevedene u cDNK), i prajmere za transkripte prikazane u tabeli 8. Za reakcije lančane polimerizacije je korišćen aparat ABI Prism 7000 i sledeći program amplifikacije:

- 2 min na 50 °C
- 10 min na 95 °C
- 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 °C
- 1 minut na 60 °C

Potom je određena vrednost eksperimentalnog praga reakcije (eng. *threshold*), a na osnovu nje Ct vrednost (eng. *cycle at threshold*). Rezultati su prikazani kao razlika u broju ciklusa kojim se dostiže vrednost eksperimentalnog praga reakcije za ispitivane gene u odnosu na nivo ekspresije β -aktina (endogeni referentni standard): ($\Delta Ct = Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$). Kvantifikacija je urađena $2^{-\Delta\Delta Ct}$

metodom (Livak i Schmittgen, 2001). Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu koju je predstavljala nestimulisana/netretirana mikroglia. Kontrolnoj grupi je dodeljena vrednost od 100 % (srednja vrednost \pm standardna greška).

Tabela 8. Prajmeri za transkripte

Geni	Sekvence prajmera
TNF- α	Forward - CTCCCAGAAAAGCAAGCAAC Reverse - CGAGCAGGAATGAGAAGAGG
IL-1 β	Forward - CACCTCTCAAGCAGAGCACAG Reverse - GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IL-6	Forward - ACAGTGCATCATCGCTGTTC Reverse - CCGGAGAGGAGACTTCACAG
IL-10	Forward - GCTCAGCACTGCTATGTTGC Reverse - GTCTGGCTGACTGGGAAGTG
ENT1	Forward - CACTTCCITCGCTGTTAGGG Reverse - TGTCCCCCTACCACTCTGAC
ENT2	Forward - CCCTCATGACCTTCTTCCTG Reverse - CCAAGAGACCCGGTATAGCA
β -actin	Forward - AGATTACTGCCCTGGCTCCT Reverse - ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

3.2.2.8. Enzimski imunotest - ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Koncentracija proinflamatornih citokina (TNF- α , IL1- β i IL-6) i antiinflamatorog citokina (IL-10) u supernatantima mikroglijskih kultura određena je ELISA testom primenom komercijalnog kompleta.

Prag osetljivosti primenjenog kompleta je 5 pg/ml (za TNF- α i IL-1 β), 21 pg/ml (za IL-6) i u koncentraciji od 10 pg/ml (za IL-10). 50 μ l supernatanta ćelijske kulture dodato je na mikrotitar ploče sa 96 bunarića, čije je dno obloženo primarnim antitelom (tab. 6). Citokini prisutni u supernatantu vezuju se za specifično antitelo. Posle ispiranja nevezanih antitela, dodaje se odgovarajuće sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena. Nakon ispiranja nevezanih antitela i enzimskog reagensa, dodat je rastvor supstrata za enzim.

Proizvod enzimske reakcije je plavo obojeni solubilni proizvod, čija je koncentracija i intenzitet plave boje, direktno proporcionalan koncentraciji vezanih citokina. Nakon prekidanja reakcije boja rastvora postaje žuta, a kvantifikacija rezultata obavljena je kolorimetrijski, očitavanjem apsorbance na 450 nm sa korekcijom na 540 nm na ELISA čitaču. Koncentracije citokina očitane su sa standardne krive dobijene primenom serije razblaženja poznate koncentracije ispitivanih citokina i izražene su u pg citokina/ml. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška dobijene iz tri nezavisna eksperimenata ponovljenih u triplikatu.

Test sulforodaminom B za određivanje ćelijske gustine (Skehan i sar., 1990) zasniva se na merenju količine ćelijskih proteina. Budući da su vrednosti dobijene SRB testom direktno proporcionalne broju ćelija, i količini ćelijskih proteina, ova metoda primenjena je za normalizaciju produkcije citokina prema količini proteina u odgovarajućim ćelijskim kulturama dobijenu SRB testom.

3.2.2.9. Statistička analiza podataka

Statistička značajnost u srednjoj dnevnoj vrednosti težine EAE i parametrima bolesti između kontrolne EAE-grupe i RBV+TR-tretirane grupe procenjavana je analizom varijansi (ANOVA). Za vrednosti $p < 0,05$, razlike su smatrane statistički značajnim, a za $p < 0,001$ visoko značajnim.

Rezultati za *in vitro* eksperimente su dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta, od kojih je svaki izveden u triplikatu i vrednosti su prikazane kao: srednja vrednost \pm standardna greška. Značajnosti u razlikama između testiranih i kontrolnih grupa procenjavane su testom ANOVA i korigovane Tukey metodom. Za vrednosti $p < 0,05$, razlike su smatrane statistički značajnim, a za $p < 0,001$ visoko značajnim.

4. REZULTATI

Dejstvo ribavirina i tiazofurina na procese inflamacije ispitivano je *in vivo* i *in vitro*.

4.1. IN VIVO

U eksperimentima *in vivo* ispitivan je efekat ova dva nukleozidna analoga na težinu bolesti, pojavu demijelinizacije, infiltraciju T-limfocita i makrofaga, kao i na morfologiju i brojnost mikrogljijskih ćelija u kičmenoj moždini EAE životinja.

4.1.1. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na težinu simptoma EAE

U cilju ispitivanja dejstva RBV i TR na EAE i njihovog efekta na mikrogljijske ćelije, eksperimentalne životinje su imunizovane kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode (odjeljak 3.2.1.1). Kod svih imunizovanih životinja se razvila bolest, a primena RBV+TR započinjala je sa pojavom prvog simptoma EAE (atonija repa) kod svake životinje individualno i trajala je narednih 15 dana. RBV je davan i.p. u dozi od 30 mg/kg telesne težine (t.t.) svakog dana, a TR u dozi od 10 mg/kg t.t. svakog drugog dana od pojave prvog simptoma bolesti. RBV+TR-tretirani pacovi su razvili značajno blažu formu bolesti (SL. 4A), što je potvrđeno i analizom parametara težine bolesti (tab. 9).

Tabela 9. Efekat RBV+TR treatma na parametre težine bolesti. Parametri težine bolesti su procenjeni kao što je opisano u odeljku 3.2.1.3. Materijala i metoda. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Zvezdice označavaju nivo značajnosti u razlikama između RBV+TR-tretirane grupe i EAE-grupe životinja (** $p < 0,001$ – statistički visoka značajnost; značajnost je analizirana ANOVA testom).

	EAE	RBV+TR
Broj životinja	16	16
Srednja vrednost težine bolesti	1,68 \pm 0,12	0,93 \pm 0,17**
Maksimalna težina bolesti	2,88 \pm 0,10	2,13 \pm 0,18**
Trajanje paralize	2,50 \pm 0,43	0,50 \pm 0,22**

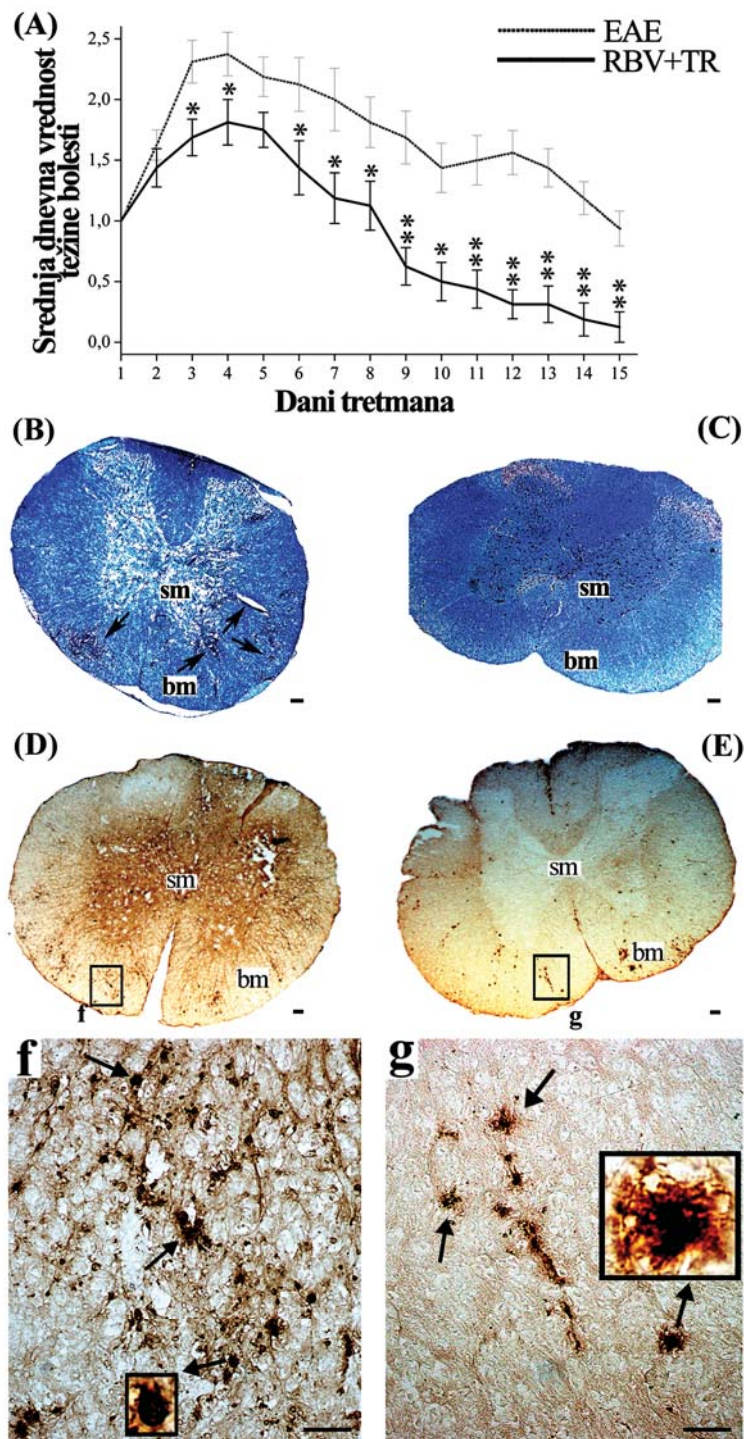
U RBV+TR-tretiranoj grupi samo 5 od 16 životinja je imalo paralizu, dok je u EAE-grupi ovaj težak simptom imalo 14 od 16 životinja. Na kraju tretmana 15 od 16 pacova iz RBV+TR-tretirane grupe se potpuno oporavilo, a jedna životinja je još uvek bila u parezi. U EAE-grupi, po završetku ispitivanog perioda (15 dana), samo su se 3 od 16 pacova potpuno oporavili, dok je njih 11 imalo atoniju repa, a 2 su bila u parezi. Smrtnost nije registrovana u bilo kojoj od ove dve ispitivane grupe.

4.1.2. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na histopatološku sliku EAE

Luxol Fast Blue/krezil ljubičasto bojenje preseka lumbalnog dela kičmene moždine EAE-grupe potvrdilo je rasprostranjenu demijelinizaciju u beloj masi i masivnu infiltraciju ćelija koja je zahvatala čak i sivu masu (SL. 4B, strelice). Kod RBV+TR-tretirane grupe, demijelinizacione plake nisu detektovane, a bela i siva masa ovih životinja je bila lišena ćelijskih infiltrata (SL. 4C).

4.1.3. Efekat kombinovanog tretmana ribavirinom i tiazofurinom na aktivaciju mikroglije u EAE

Reaktivnost mikroglije u EAE-grupi i RBV+TR-tretiranoj grupi životinja procenjena je na osnovu morfoloških kriterijuma, primenom ED1 markera. Kod EAE pacova ED1⁺ ćelije ispoljavale su ameboidni oblik koji morfološki nalikuje makrofagima i bile su široko rasprostranjene u beloj masi (SL. 4D i f). Kod RBV+TR-tretirane grupe životinja ED1⁺ ćelije imale su žbunast oblik sa kratkim i debelim nastavcima (SL. 4E i g), tipičan za mikrogliju nižeg aktivacionog statusa. Procena reaktivnosti mikroglijskih ćelija na osnovu morfoloških parametara prikazana je u tab. 10.



SLIKA 4. Težina simptoma i histopatološke karakteristike u EAE i RBV+TR-tretiranoj grupi životinja. (A) Srednja dnevna vrednost težine bolesti u EAE i RBV+TR-tretiranoj grupi. Rezultati su predstavljeni kao srednja dnevna vrednost grupe ± standardna greška. Zvezdice označavaju nivo značajnosti

razlika između RBV+TR-tretirane grupe i EAE grupe pacova (* $p < 0,05$ – statistički značajno; ** $p < 0,001$ – statistički visoko značajno). Preseci lumbalnog dela kičmene moždine EAE (**B**) i RBV+TR-tretirane grupe životinja (**C**), obojeni Luxol Fast Blue/krezil ljubišastim. Strelice označavaju mesta demijelinizacije i infiltracije. Preseci lumbalnog dela kičmene moždine EAE grupe (**D, f**) i RBV+TR-tretirane grupe (**E, g**) imunohistohemijski obeleženi antitelom na ED1. Siva masa (sm) i bela masa (bm). Skala: B - E: 400 μm ; f, g: 100 μm .

Tabela 10. Stepen imunoreaktivnosti mikroglijskih ćelija obeleženih ED1 markerom. (0 = nema imunoreaktivnosti, + minimalna, ++ umerena, i +++ jaka imunoreaktivnost). Rezultati su bazirani na subjektivnoj proceni evaluatora kao što je opisano u odeljku 3.2.1.5. Materijala i metoda.

Lumbalni region kičmene moždine	Grupe	ED1
bela masa	EAE	+++
	RBV+TR	+
siva masa	EAE	++
	RBV+TR	0

4.2. IN VITRO

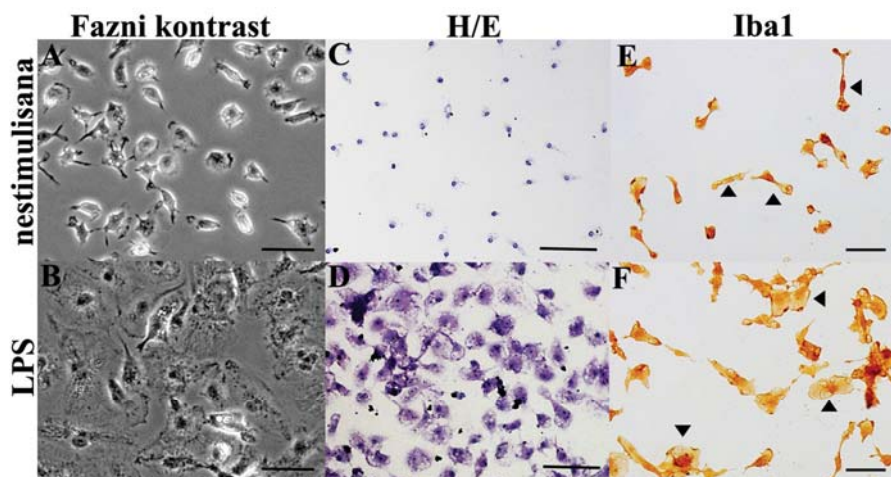
In vitro efekat ribavirina i tiazofurina na procese inflamacije ispitivan je u primarnoj kulturi nestimulisane i LPS stimulisane mikroglije izolovane iz kore prednjeg mozga neonatalnih pacova.

4.2.1. Karakterizacija nestimulisane i LPS stimulisane mikroglijske ćelijske kulture

U primarnoj ćelijskoj kulturi mikroglije ispitivana je sposobnost RBV i TR da umanje morfološke i funkcijske znake aktivacije mikroglije. Aktivacija mikroglije izazvana je LPS-om (25 ng/ml, 48 sati), što je široko prihvaćeni *in vitro* model neuroinflamacije. Kultura mikroglije pokazivala je 97 % homogenosti, što je potvrđeno dvojnim obeležavanjem Iba1 (marker za mikrogliju) i GFAP (marker za astrocite).

Morfologija ćelija procenjena je slikanjem na fazno-kontrastnom mikroskopu (SL. 5A, B), a potom i bojenjem hematoksilin/eozinom (H/E) (SL. 5C, D) i imuno-obeležavanjem na Iba1 (SL. 5E, F). Ćelije u nestimulisanoj kulturi

većinom su ispoljavale bipolaran ili cilindričan oblik ćelijskog tela, sa brojnim kratkim nastavcima koji se završavaju filopodijama (SL. 5E, vrh strelice). U kulturi stimulisanom LPS-om, ćelije su ispoljavale aktivirani fenotip, koji odlikuje krupno okruglo ćelijsko telo sa manje izraženim nastavcima (SL. 5F, vrh strelice).



SLIKA 5. Morfologija mikroglijskih ćelija u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanom LPS-om. Fazno-kontrastne mikrografije ćelija nestimulirane kulture (A) i kulture stimulirane LPS-om (B). Histoheмиjsko bojenje hematoksilin/eozin ćelija u nestimulisanoj kulturi (C) i kulturi stimulisanom LPS-om (D). Imunocytoheмиjsko obeležavanje na Iba1, ćelija u nestimulisanoj kulturi (E) i kulturi stimulisanom LPS-om (F). Skala na mikrografijama: 50 μ m.

4.2.2. Uticaj ribavirina i tiazofurina na vijabilnost mikroglijskih ćelija

Citotoksični potencijal RBV i TR ispitivan je primenom SRB testa u prisustvu RBV ili TR u koncentracijama od 1, 5, 10, 20 μ M ili u kombinovanom tretmanu, 10 μ M RBV + 5 μ M TR, u kulturi nestimuliranih ćelija i ćelija stimuliranih LPS-om.

U nestimulisanoj kulturi, RBV indukuje dvofazni efekat; pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 1 μ M, RBV povećava vijabilnost mikroglije, u dozi od 5 μ M ne utiče na vijabilnost ćelija, dok se umereni citotoksični efekat zapaža pri dozama od 10 μ M i 20 μ M (tab. 11; SL. 6A). U kulturi stimulisanom LPS-om, broj mikroglijskih ćelija je značajno veći u odnosu na broj ćelija u nestimulisanoj kulturi

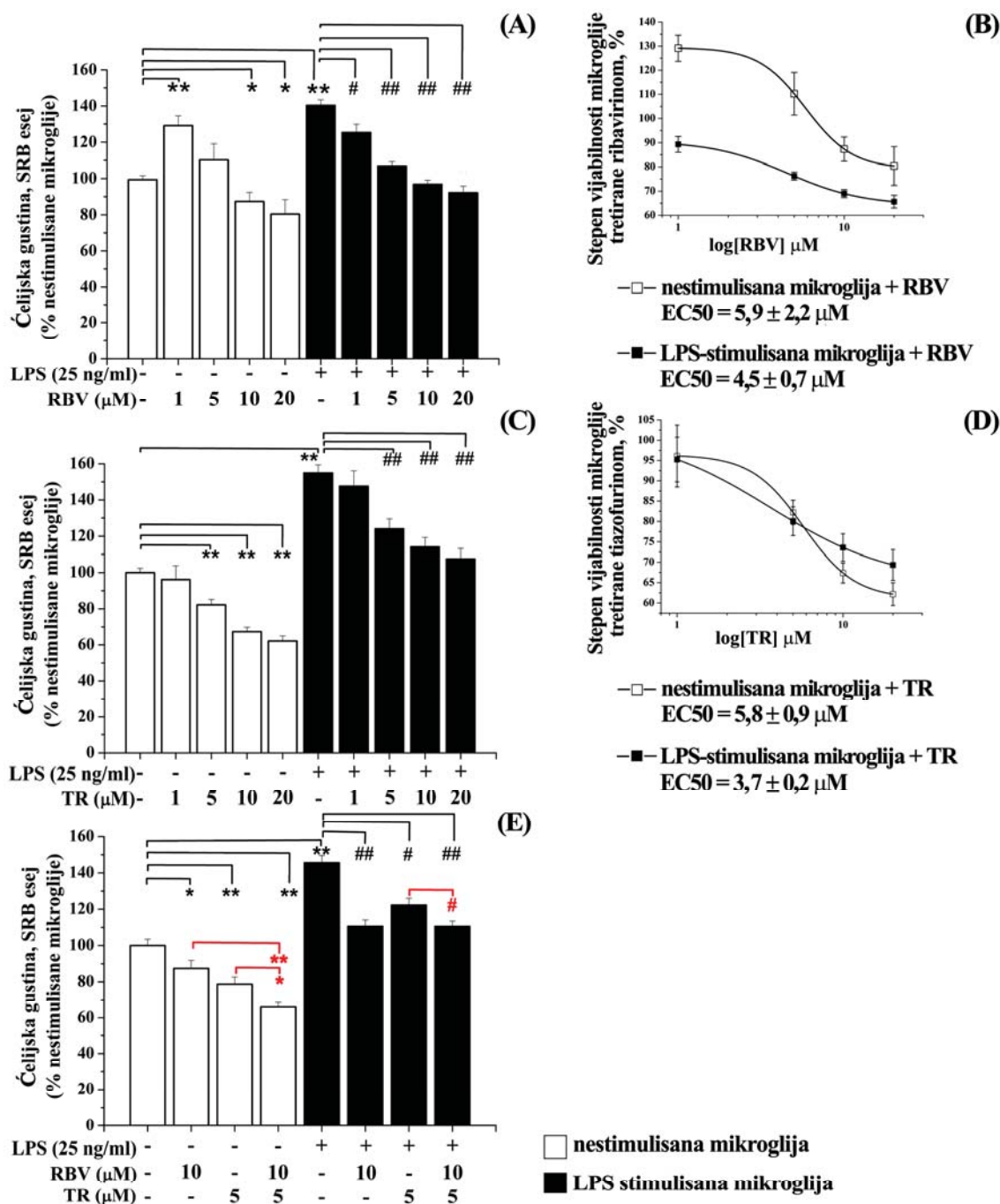
(tab. 11; SL. 6A). RBV ispoljava značajan citotoksični efekat na LPS stimulisanu mikrogliju u svim primenjenim dozama (tab. 11; SL. 6A).

Tabela 11. Efekat RBV i TR na vijabilnost mikroglijskih ćelija. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu je * ili # za $p < 0,05$, a ** ili ## su za $p < 0,001$. LPS stimulisana mikroglija je predstavljena i kao procenat nestimulisane mikroglije i arbitrarno na 100 % kako bi se procenili efekti tretmana stimulisane mikroglije nukleozidnim analogima.

		SRB test: vijabilnost ćelija (%)			
		tretman RBV (μM)			
		1	5	10	20
nestimulisana mikroglija	99,4 \pm 2,2	129,1 \pm 5,4**	110,2 \pm 8,8	87,3 \pm 5,0*	80,4 \pm 8,0*
LPS stimulisana mikroglija	140,3 \pm 3,2**	100,0 \pm 2,2	89,2 \pm 3,3#	76,2 \pm 1,6##	69,0 \pm 1,6##
					65,7 \pm 2,6##
		tretman TR (μM)			
		1	5	10	20
nestimulisana mikroglija	100,3 \pm 2,4	96,1 \pm 7,6	82,2 \pm 3,0**	67,4 \pm 2,5**	62,2 \pm 2,8**
LPS stimulisana mikroglija	155,0 \pm 4,4**	100 \pm 2,9	95,2 \pm 2,9	80,0 \pm 3,5##	73,6 \pm 3,4##
					69,3 \pm 3,8##
		tretman RBV (μM)	tretman TR (μM)	tretman RBV+TR (μM)	
		10	5	10 + 5	
nestimulisana mikroglija	100,0 \pm 3,5	87,4 \pm 4,4*	78,7 \pm 4,0**	65,8 \pm 2,8**	
LPS stimulisana mikroglija	145,6 \pm 4,0**	99,7 \pm 2,8	75,7 \pm 2,4##	83,8 \pm 2,5#	75,7 \pm 2,0##

Na osnovu podataka dobijenih SRB testom izračunati su kvantitativni parametri nivoa citotoksičnog delovanja RBV i EC₅₀ (SL. 6B). U nestimulisanoj kulturi, RBV izaziva maksimalno smanjenje vijabilnosti ćelija od 19,6 \pm 8,0 % pri dozi od 20 μM , sa EC₅₀ = 5,9 \pm 2,2 μM . U kulturi stimulisanoj LPS-om, RBV

izaziva maksimum citotoksičnosti od $34,3 \pm 2,6$ % pri dozi od $20 \mu\text{M}$, sa $\text{EC}_{50} = 4,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$.



SLIKA 6. Uticaj RBV, TR i RBV+TR na vijabilnost ćelija. Uticaj RBV (A), TR (C) i RBV+TR (E) na vijabilnost ćelija mikroglije u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanoj LPS-om, procenjen je sulforodamin B testom (SRB). Svi efekti predstavljeni su kao procenat kontrole (100%), koja je definisana kao

kolorimetrijsko očitavanje u kulturi nestimuliranih i netretiranih ćelija. Stubići predstavljaju srednje vrednosti iz $n = 3$ eksperimenta izvedena u triplikatu \pm standardna greška. **(B, D)** Krive dozne zavisnosti vijabilnosti ćelija od koncentracije RBV **(B)** i TR **(D)**. Uticaj pojedinačnih doza RBV i TR određen primenom SRB testa obrađen je softverskim paketom Origin 7.0 i određene su EC₅₀ vrednosti. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu je * ili # za $p < 0,05$, a ** ili ## su za $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavljaju nivo značajnosti u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimuliranoj i LPS stimuliranoj mikrogliji.

U nestimuliranoj kulturi, TR u dozi od 1 μM ne ispoljava efekat, dok u dozi od 5 μM pokazuje umerenu citotoksičnost (tab. 11; SL. 6C). Značajno veći citotoksični efekat izazivaju doze od 10 μM i 20 μM (tab. 11; SL. 6C). Stimulacija LPS-om izaziva značajno povećanje broja ćelija u odnosu na nestimulisanu kulturu (tab. 11; SL. 6C). Doza TR od 1 μM nema efekta, dok sve ostale testirane doze značajno smanjuju broj ćelija u LPS stimuliranim kulturama (tab. 11; SL. 6C).

U kulturi nestimuliranih ćelija, maksimalan efekat na vijabilnost ćelija od $37,8 \pm 2,8 \%$, TR ispoljava u dozi od 20 μM , sa $\text{EC}_{50} = 5,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (SL. 6D). U kulturi stimuliranoj LPS-om, maksimum smanjenja vijabilnosti ćelija, od $30,7 \pm 3,8 \%$, postignut je istom dozom TR, sa $\text{EC}_{50} = 3,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (SL. 6D).

Kombinovani tretman 10 μM RBV+ 5 μM TR ispoljava znatno snažniji citotoksični efekat na ćelije u nestimuliranoj kulturi od pojedinačnih tretmana (tab. 11; SL. 6E). U kulturi stimuliranoj LPS-om, kombinovani tretman izaziva efekat koji je isti kao i efekat koji izaziva sam RBV, a statistički je značajno jači od efekta samog TR (tab. 11; SL. 6E).

4.2.3. Uticaj ribavirina i tiazofurina na produkciju azot monoksida u kulturi mikroglijskih ćelija

Nivo azot monoksida (NO) procenjen je merenjem koncentracije nitrita u medijumu, primenom Griess-ove metode. Bazalni nivo oslobađanja nitrita u kulturi nestimuliranih ćelija bio je $3,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (tab. 12; SL. 7A, C, E), dok je u kulturi

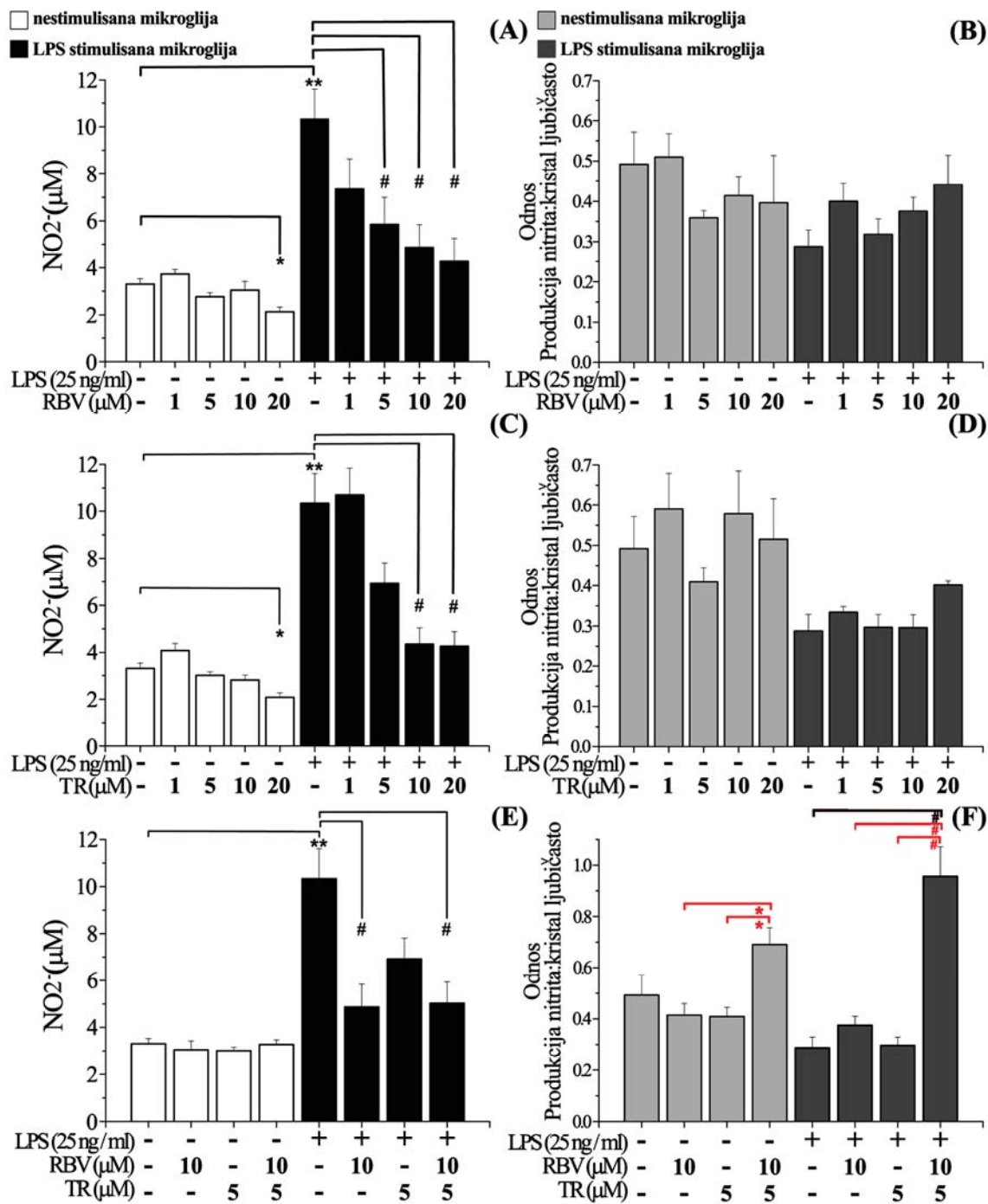
stimulisanoj LPS-om bazalna produkcija bila gotovo tri puta veća i iznosila je $10.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (tab. 12; SL. 7A, C, E).

U nestimulisanoj kulturi ćelija, RBV smanjuje produkciju nitrita samo pri koncentraciji od $20 \mu\text{M}$ (tab. 12; SL. 7A). U kulturi stimulisanoj LPS-om, RBV značajno smanjuje produkciju nitrita u odnosu na LPS stimulaciju na dozno-zavisan način (tab. 11; SL. 7A).

TR, slično RBV, u nestimulisanoj kulturi, smanjuje nivo nitrita samo pri najvišoj koncentraciji od $20 \mu\text{M}$ (tab. 12; SL. 7C). U kulturi stimulisanoj LPS-om, TR ostvaruje značajan efekat u smanjenju produkcije nitrita u odnosu na LPS stimulaciju pri koncentracijama od $10 \mu\text{M}$ i $20 \mu\text{M}$ (tab. 12; SL. 7C).

Tabela 12. Efekat RBV i TR na produkciju NO_2^- u kulturi mikrogljivskih ćelija. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogljiju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulanu mikrogljiju), pri čemu je * ili # za $p < 0,05$, a ** ili ## su za $p < 0,001$.

		produkcija NO_2^- (μM)			
		tretman RBV (μM)			
		1	5	10	20
nestimulisana mikrogljija	$3,3 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,2^*$
LPS stimulisana mikrogljija	$10,3 \pm 1,3^{**}$	$7,4 \pm 1,3$	$5,8 \pm 1,2^\#$	$4,9 \pm 1,0^\#$	$4,3 \pm 1,0^\#$
		tretman TR (μM)			
		1	5	10	20
nestimulisana mikrogljija	$3,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2^*$
LPS stimulisana mikrogljija	$10,3 \pm 1,3^{**}$	$10,7 \pm 1,2$	$6,91 \pm 0,9$	$4,4 \pm 0,7^\#$	$4,3 \pm 0,6^\#$
		tretman $10 \mu\text{M}$ RBV + $5 \mu\text{M}$ TR			
nestimulisana mikrogljija	$3,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$			
LPS stimulisana mikrogljija	$10,3 \pm 1,3^{**}$	$5,0 \pm 0,9^\#$			



SLIKA 7. Uticaj RBV, TR i RBV+TR na produkciju nitrita. Uticaj RBV(A), TR (C) i kombinovanog tretmana RBV+TR (E) u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanoj LPS-om na produkciju nitrita određenu metodom po Griess-u. Nivo nitrita normalizovan na broj ćelija u kulturi tretiranih RBV (B), TR (D) i RBV+TR (F). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška, iz n = 3 nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Nivo značajnosti u razlikama između

grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisano mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavljaju $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavljaju nivo značajnosti u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji.

Kombinovana terapija 10 μM RBV + 5 μM TR nije ostvarila uticaj na produkciju nitrita u nestimulisanoj kulturi, kao ni pojedinačne doze ove kombinacije (tab. 12; SL. 7E). U kulturi stimulisanoj LPS-om, kombinovani tretman smanjuje produkciju nitrita na gotovo upola manju vrednost u odnosu na LPS stimulaciju, ali ne ostvaruje bolji efekat u odnosu na pojedinačne doze (tab. 12; SL. 7E).

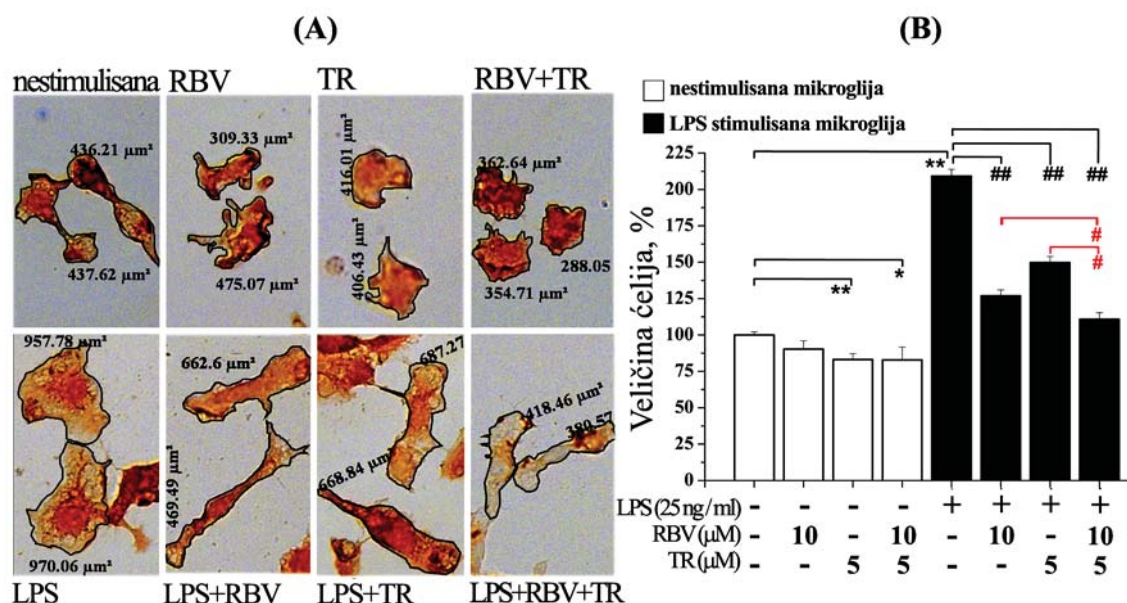
Produkcija nitrita izražena je i u odnosu na broj mikroglijskih ćelija, određen kristal ljubičastim bojenjem ćelija. Produkcija nitrita po ćeliji u odnosu na nestimulisane ćelije, ne menja se nakon stimulacije LPS-om (SL. 7B, D, F), tretmana RBV-om (SL. 7B) i tretmana TR-om (SL. 7D). Jedini efekat uočava se u kombinovanom tretmanu kako nestimulisane, tako i LPS-stimulisane kulture (SL. 7F), koji statistički značajno povećava produkciju nitrita.

Na osnovu prethodnih rezultata dobijenih merenjem citotoksičnosti SRB testom i izračunatih EC₅₀ vrednosti u daljim eksperimentima je odabrano da se radi sa 10 μM RBV, 5 μM TR kao i njihovom kombinacijom.

4.2.4. Uticaj ribavirina i tiazofurina na morfometrijske karakteristike mikroglijskih ćelija u kulturi

Budući da je morfologija mikroglije u direktnoj korelaciji sa njenim funkcionalnim statusom, ispitan je uticaj RBV, TR i RBV + TR na morfologiju ćelija u kulturi. Ćelije su vizualizovane bojenjem u hematoksilin/eozinu (H/E), a potom su morfometrijski analizirane, merenjem ukupne površine ćelijskog tela u programu AxioVision Rel. 4.6. Validnost H/E bojenja u obeležavanju ćelija potvrđena je imunocitohemijskim bojenjem mikroglije Iba1 markerom (SL. 8A). Budući da su oba obeležavanja dala uporedive rezultate, za potrebe morfometrijskih analiza ćelije su bojene znatno ekonomičnijim H/E postupkom.

U nestimulisanoj kulturi mikroglije, tretman RBV nije uticao na prosečnu površinu ćelija, dok se značajno smanjenje prosečne površine ćelija u nestimulisanoj kulturi zapaža nakon tretmana TR ($83,1 \pm 4,1 \%$, $p < 0,001$) i kombinacijom RBV + TR ($82,9 \pm 8,9 \%$, $p < 0,001$) (SL. 8B). U kulturi stimulisanoj LPS-om, prosečna površina ćelija očekivano se uvećala za dva puta ($209,2 \pm 4,7 \%$, $p < 0,001$; SL. 8B) u odnosu na ćelije u nestimulisanoj kulturi. U istoj kulturi, sva tri tretmana su statistički značajno smanjili prosečnu površinu ćelija u odnosu na LPS stimulaciju (RBV na: $60,6 \pm 2,0 \%$, $p < 0,001$; TR na: $71,6 \pm 2,0 \%$, $p < 0,001$; RBV + TR na: $53,0 \pm 2,1 \%$, $p < 0,001$; SL. 8B), pri čemu je efekat kombinovanog tretmana bio jači od pojedinačnih.



SLIKA 8. Uticaj RBV i TR na morfometrijske parametre mikroglijskih ćelija u kulturi. (A) Mikrografije ćelija mikroglije obeleženih imunocitohemijski sa Iba1 antitelom, korišćene za (B) izračunavanje površina ćelija u programskom paketu AxioVision Rel. 4.6. Merenja površine izvršena su kao što je opisano u odeljku 3.2.2.3. Materijala i metoda. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za nestimulisanu kulturu \pm standardna reška ($n = 15$). Oznake na slikama: nestimulisana - nestimulisana kultura; LPS – kultura stimulisana LPS-om; RBV – tretman sa $10 \mu\text{M}$ RBV; TR – tretman sa $5 \mu\text{M}$ TR; RBV+TR – kombinovani tretman sa $10 \mu\text{M}$ RBV+ $5 \mu\text{M}$ TR. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavljaju $p < 0,001$. Crvene tarabe predstavljaju nivo značajnosti u

razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u LPS stimulisanoj mikrogliji.

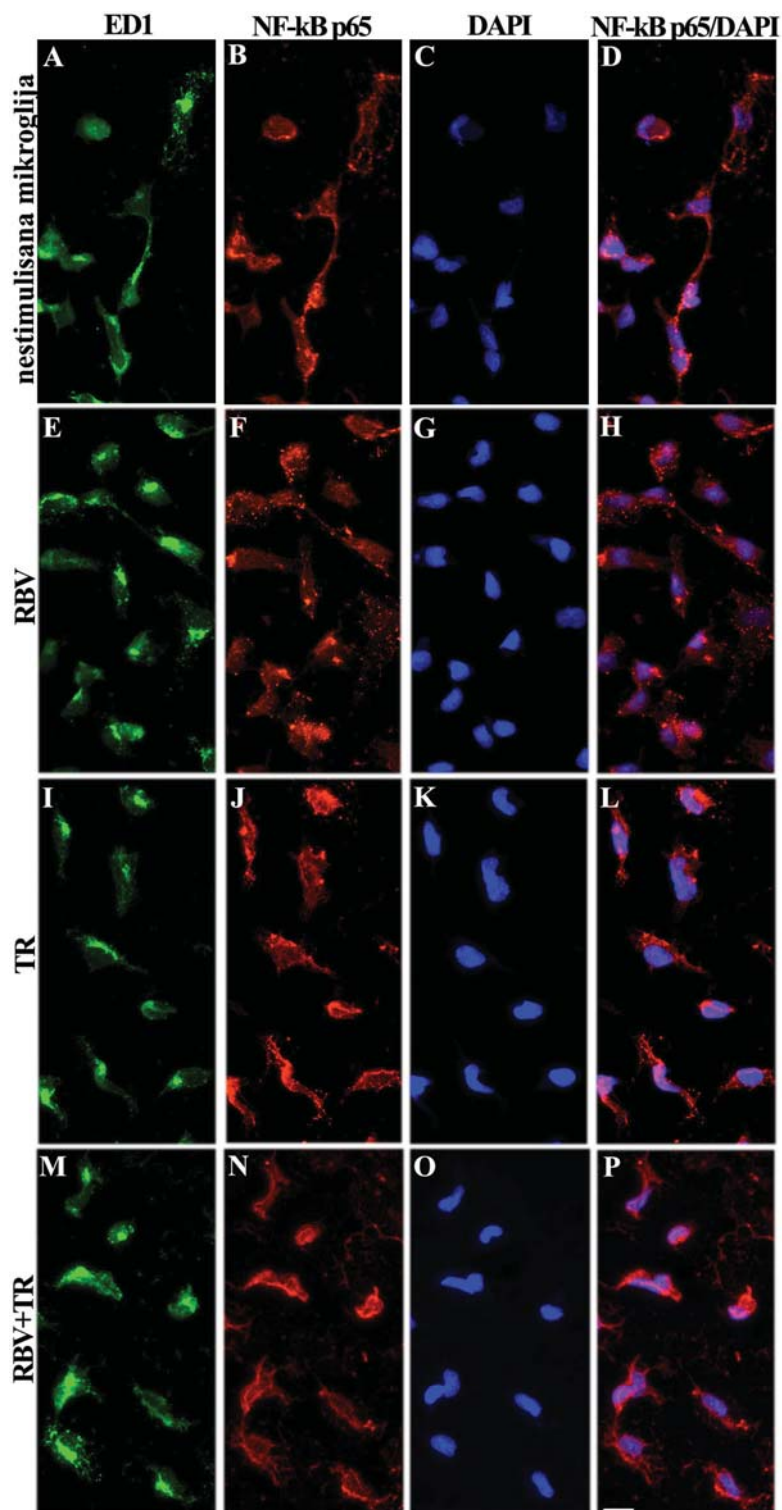
4.2.5. Uticaj ribavirina i tiazofurina na aktivaciju NF- κ B signalnog puta

Imajući u vidu da je signalni put NF- κ B ključan u indukciji inflamatornog odgovora mikroglije, u narednom setu eksperimenata praćena je aktivacija ovog puta praćenjem translokacije NF- κ B/p65 subjedinice u jedro. Translokacija NF- κ B/p65 praćena je u nestimulisanoj kulturi (SL. 9A-P) i kulturi stimulisanoj LPS-om (SL. 10A-P), imunofluorescentnim bojenjem p65 i fluorescentnim bojenjem markera jedara DAPI, a kvantitavna procena translokacije dobijena je brojanjem ćelija kod kojih je zabeležena ko-lokalizacija oba fluorescentna signala u odnosu na ukupan broj ćelija (SL. 11).

U nestimulisanoj kulturi mikroglije analiza lokalizacije NF- κ B/p65 u ćelijskim odeljcima (SL. 9A-D) pokazala je da tek petina ukupnog broja ćelija pokazuje jedarnu lokalizaciju ove subjedinice ($19,6 \pm 1,8$ %; SL.11). Svi tretmani izazivaju povećanje translokacije NF- κ B/p65 u jedro (SL. 11) od RBV (na $35,1 \pm 3,2$ %, $p < 0,001$), TR (na $31,9 \pm 4,9$ %, $p < 0,05$) i RBV + TR (na $29,0 \pm 2,1$ %, $p < 0,05$). U kulturi stimulisanoj LPS-om (SL. 10A-D) čak 93 ± 2 % ($p < 0,001$, SL. 11) pokazuje jedarnu lokalizaciju NF- κ B/p65, a svi tretmani smanjuju stepen jedarne lokalizacije p65 subjedinice i to RBV (na $40,7 \pm 5,9$ %, $p < 0,001$; SL. 11), TR (na $40,5 \pm 2,2$ %, $p < 0,001$; SL. 11) i RBV + TR (na $44,1 \pm 3,5$ %, $p < 0,001$; SL. 11).

4.2.6. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju citokinskih iRNK u kulturi mikroglijskih ćelija

Budući da je funkcionalni status mikroglije u direktnoj korelaciji sa setom citokina koje ćelija eksprimira, ispitan je uticaj RBV i TR na ekspresiju iRNK za izabrane proinflamatorne (TNF- α , IL-1 β , IL-6) i antiinflamatornog citokina (IL-10) u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanoj LPS-om (SL.12).

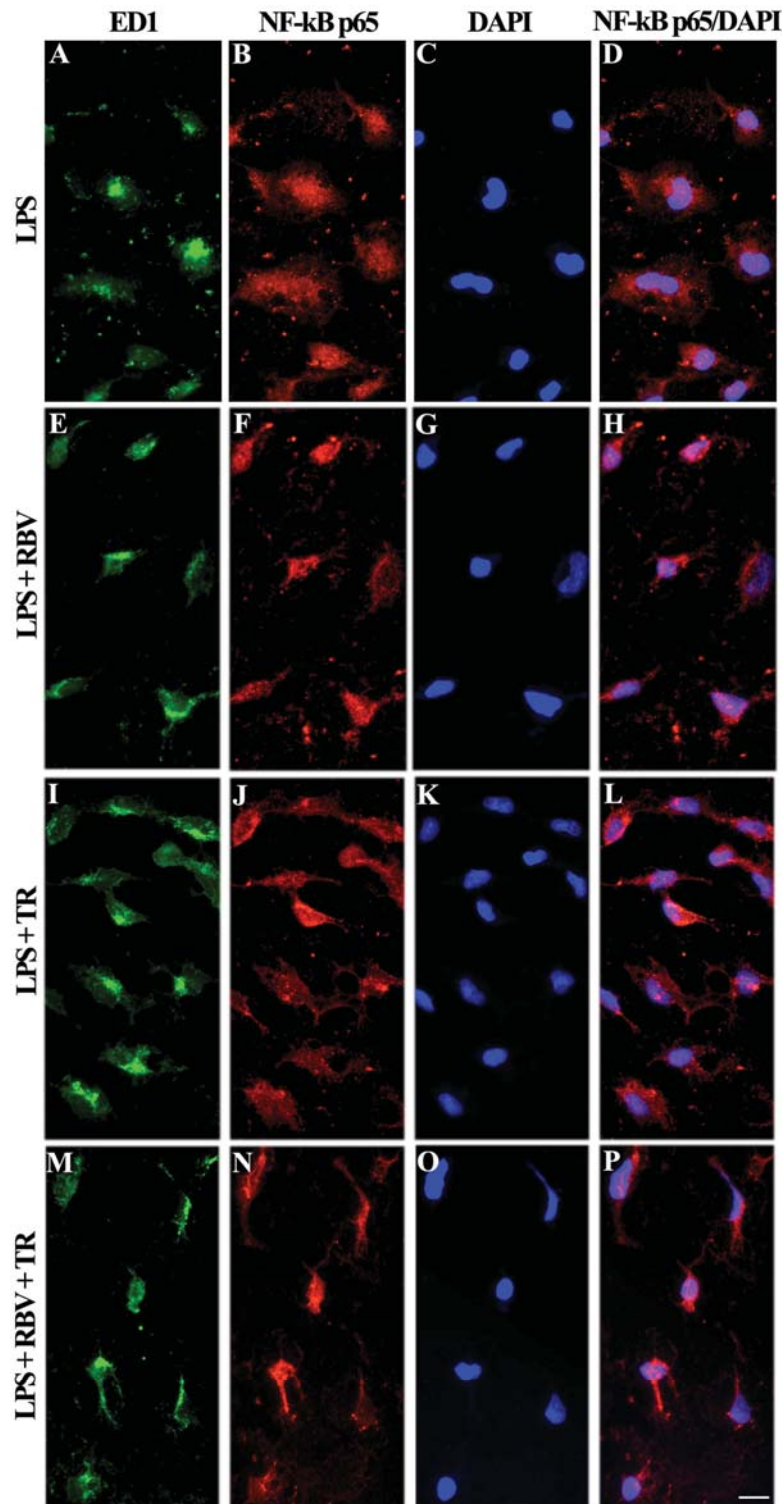


SLIKA 9. Lokalizacija p65 subjedinice NF- κ B kompleksa u nestimulisanoj kulturi mikroglije. Lokalizacija NF- κ B u ćelijskim odeljcima praćena je imunocitohemijskim fluorescentnim bojenjem na p65 (crvena

fluorescencija) i fluorescentnim markerom jedara, DAPI (plava fluorescencija). Čelije su takođe obeležene i fluorescencijom na mikroglijski marker ED1 (zelena fluorescencija). **(A-D)** Nestimulisana kultura mikroglije; **(E-H)** Tretman RBV; **(I-L)** Tretman TR; **(M-P)** Kombinovani tretman RBV + TR. Preklopljene slike **(D, H, L, P)** pokazuju kolokalizaciju NF- κ B/p65 subjedinice i jedara (DAPI). Oznake na slici: nestimulisana kultura mikroglije; RBV – tretman sa 10 μ M RBV; TR – tretman sa 5 μ M TR; RBV+TR – kombinovani tretman sa 10 μ M RBV+5 μ M TR. Skala na mikrografijama: 50 μ m.

U nestimulisanoj kulturi mikroglije detektovan je bazalni nivo ekspresije iRNK za TNF- α (SL. 12A), IL-1 β (SL. 12B) i IL-10 (SL. 12D), koji se nije značajno menjao pod uticajem primenjenih tretmana. Transkript za IL-6 nije detektovan u nestimulisanoj kulturi mikroglije, čak ni nakon tretmana sa RBV, TR i njihovom kombinacijom (SL. 12C).

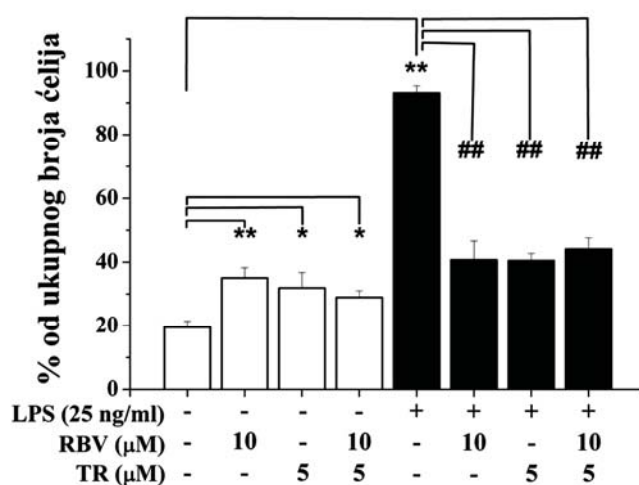
U odnosu na nestimulisanu kulturu, u kulturi stimulisanoj LPS-om, ekspresija sva četiri ispitana transkripta dramatično se povećava (TNF- α : $329,0 \pm 9,7$ %, $p < 0,001$; IL-1 β : $1680,2 \pm 129,4$ %, $p < 0,001$; IL-6: $100,0 \pm 6,8$ %; IL10: $3020,9 \pm 149,0$ %, $p < 0,001$; SL. 12). Tretman RBV-om ($61,0 \pm 0,9$ %), TR-om ($58,1 \pm 2,4$ %) i njihovom kombinacijom ($74,6 \pm 2,8$ %) značajno smanjuje ekspresiju iRNK za TNF- α uzrokovanu LPS-om (SL.12A). Ekspresije iRNK za IL-1 β (SL.12B) dodatno se povećava pod uticajem RBV ($245,8 \pm 42,5$ %, $p < 0,05$) i kombinovanog tretmana RBV + TR ($370,5 \pm 43,1$ %, $p < 0,001$) u odnosu na LPS stimulaciju, dok TR ne ostvaruje uticaj na ekspresiju ovog citokina. Ekspresija iRNK za IL-6 (SL. 12C), smanjuje se pod uticajem sva tri tretmana RBV ($63,5 \pm 5,0$ %, $p < 0,05$), TR ($74,7 \pm 7,2$ %, $p < 0,05$) i RBV + TR ($58,5 \pm 11,3$ %, $p < 0,05$). Ekspresije iRNK za IL-10 (SL. 12D) značajno se smanjuje nakon tretmana RBV ($81,5 \pm 3,5$ %, $p < 0,05$) i TR ($76,9 \pm 7,8$ %, $p < 0,05$), dok se nakon kombinovanog tretmana značajno povećava ($156,5 \pm 10,0$ %, $p < 0,001$).



SLIKA 10. Lokalizacija p65 subjedinice NF- κ B kompleksa u LPS stimulisanoj kulturi mikroglije. Lokalizacija NF- κ B u ćelijskim odeljcima praćena je imunocitohemijskim fluorescentnim bojenjem na p65 (crvena

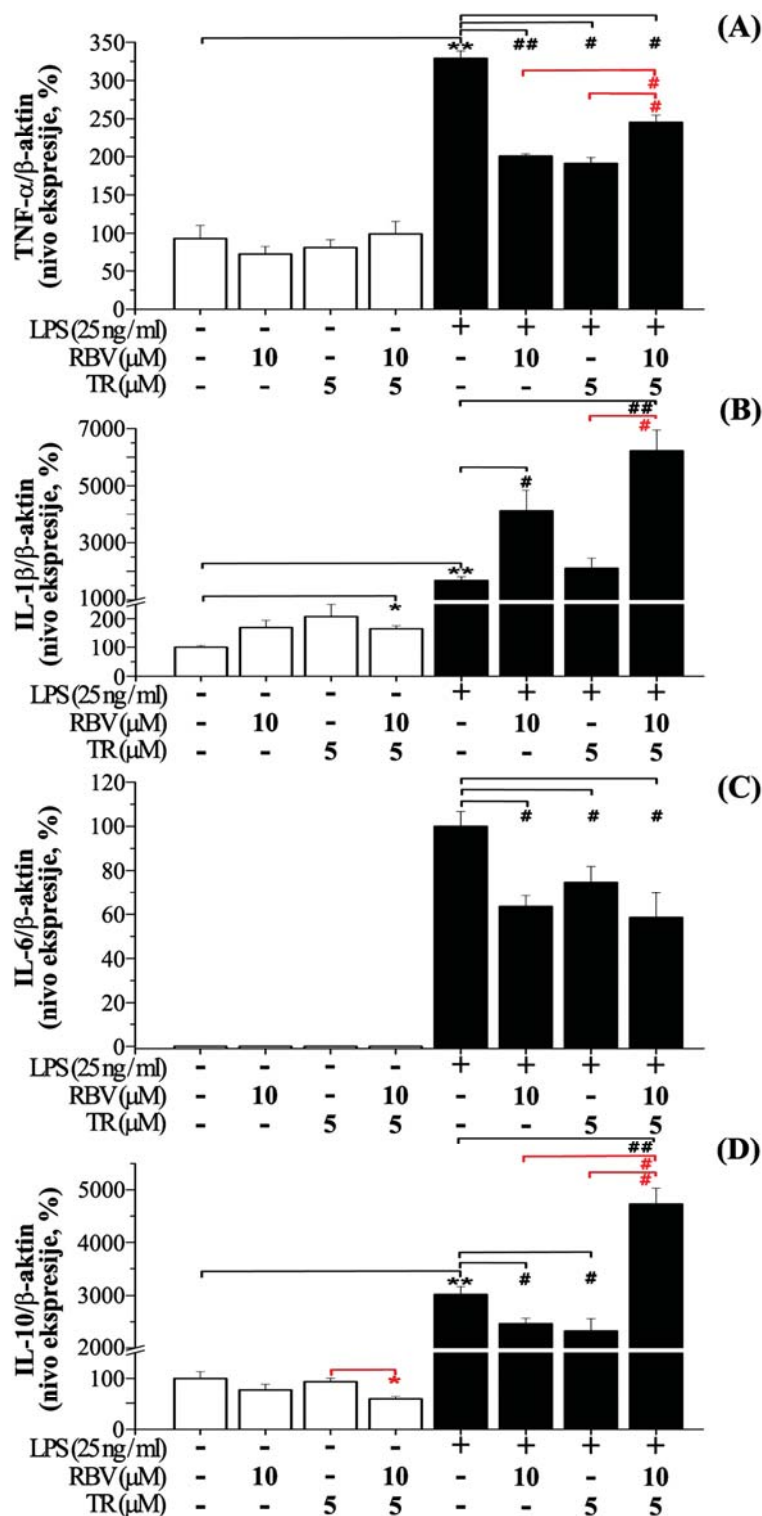
fluorescencija) i fluorescentnim markerom jedara, DAPI (plava fluorescencija). Čelije su obeležene fluorescencijom na mikroglijski marker ED1 (zelena fluorescencija). **(A-D)** Kultura stimulisana LPS-om; **(E-H)** Tretman RBV-om; **(I-L)** Tretman TR-om; **(M-P)** Kombinovani tretman RBV + TR. Preklopljene slike **(D, H, L, P)** pokazuju kolokalizaciju NF- κ B/p65 subjedinice i jedra (DAPI). Oznake na slici: LPS – kultura stimulisana LPS-om; RBV – tretman sa 10 μ M RBV; TR – tretman sa 5 μ M TR; RBV+TR – kombinovani tretman sa 10 μ M RBV+5 μ M TR. Skala na mikrografijama: 50 μ m.

□ nestimulisana mikroglija ■ LPS stimulisana mikroglija



SLIKA 11. Kvantitativan prikaz ko-lokalizacije p65/DAPI fluorescencije u kulturi mikroglije nakon tretmana RBV-om, TR-om i njihovom kombinacijom RBV+TR. Stepenn translokacije NF- κ B u jedru određen je fluorescentnom mikroskopijom, brojanjem ćelija sa ko-lokalizovanom p65/DAPI fluorescencijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost procenta ćelija koje pokazuju jedarnu ko-lokalizaciju fluorescencije od ukupnog broja ćelija, dobijeni brojanjem ćelija na 3 pokrovna stakalca (4×10^4 ćelija) u $n = 3$ nezavisna eksperimenta \pm standardna greška. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavlja $p < 0,001$.

□ nestimulisana mikroglia ■ LPS stimulisana mikroglia



SLIKA 12. Uticaj RBV i TR na ekspresiju iRNK za citokine. Ekspresija iRNK za (A) TNF- α , (B) IL-1 β (C) IL-6 i (D) IL-10 praćena je u nestimulisanoj

kulturi i u kulturi stimulisanom LPS-om, pomoću RT-PCR korišćenjem SYBR green. β -actin je korišćen kao interna kontrola. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti iz $n = 3$ nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu \pm standardna greška. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavlja $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavljaju nivo značajnosti u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimulisanom i LPS stimulisanom mikrogliji.

4.2.7. Uticaj ribavirina i tiazofurina na oslobađanje citokina u kulturi mikroglijskih ćelija

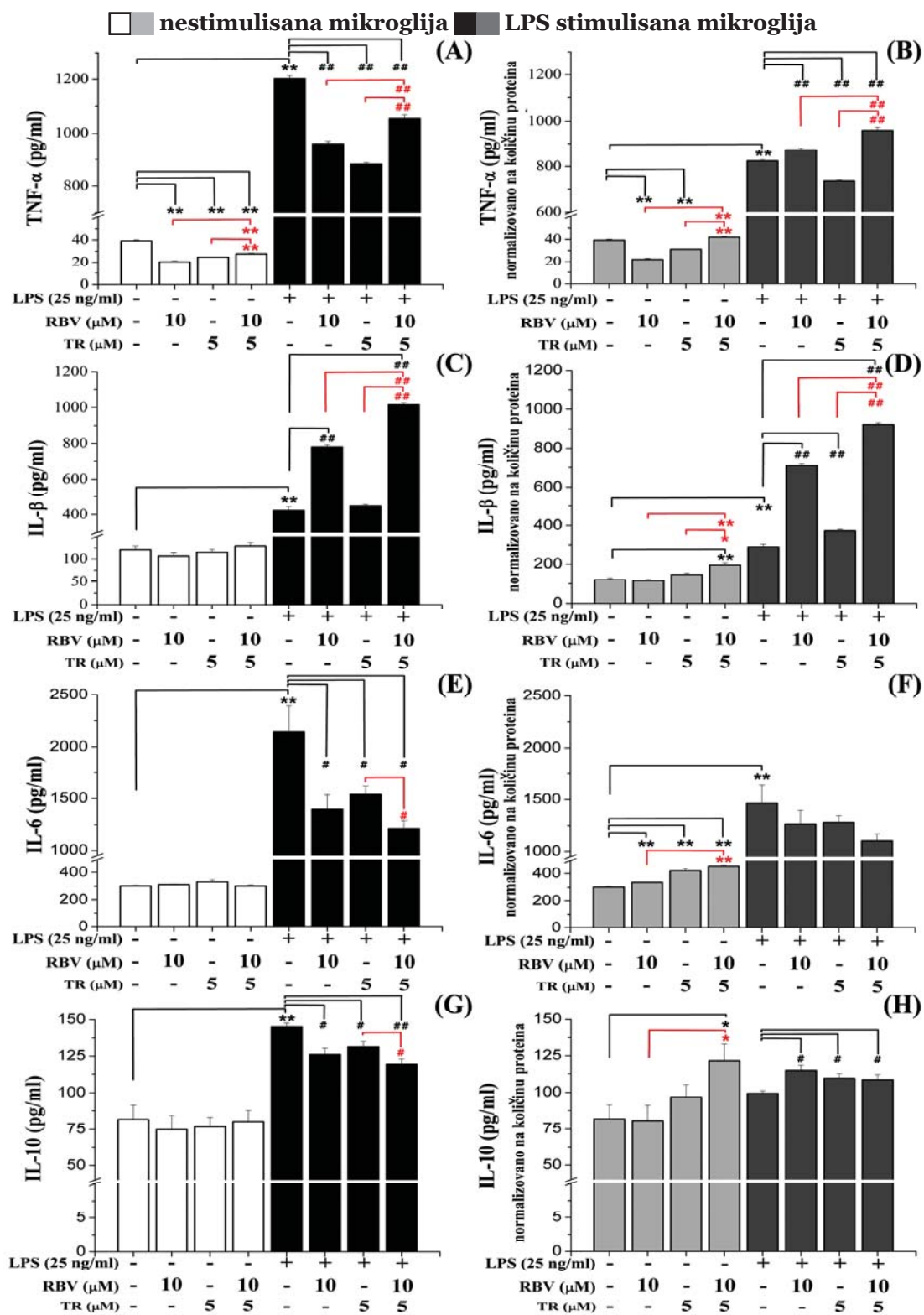
Oslobađanje izabrane grupe citokina praćeno je primenom ELISA testa u supernatantu ćelijskih kultura (SL. 13). Budući da je prethodnim eksperimentima utvrđeno da RBV i TR ispoljavaju umereno citotoksičan efekat na ćelije mikroglije u kulturi, koncentracija oslobođenih citokina u medijumu izražena je na dva načina; kao apsolutna vrednost koncentracije citokina (pg/ml medijuma) (SL. 13A, C, E i G), ili je preračunata po količini proteina koju sadrži adekvatna ćelijska kultura (SL. 13B, D, F i H).

U nestimulisanom kulturi bazalni nivo oslobađanja TNF- α iznosi $39,2 \pm 0,9$ pg/ml (SL. 13A). Oslobađanje ovog citokina značajno se smanjuje nakon tretmana RBV-om ($20,4 \pm 0,8$ pg/ml, $p < 0,001$), TR-om ($24,6 \pm 0,1$ pg/ml, $p < 0,001$) i njihovom kombinacijom ($27,6 \pm 0,6$ pg/ml, $p < 0,001$). Kada se nivo oslobađanja TNF- α predstavi u odnosu na količinu proteina u uzorku, dobijaju se isti odnosi i nakon tretmana sa RBV, TR i RBV+TR (SL. 13B). U kulturi stimulisanom LPS-om, koncentracija TNF- α je čak 30 puta veća nego u nestimulisanom kulturi ($1202,0 \pm 10,9$ pg/ml, $p < 0,001$; SL. 13A). Tretman RBV-om ($959,7 \pm 10,7$ pg/ml, $p < 0,001$), TR-om ($882,3 \pm 6,1$ pg/ml, $p < 0,001$) i RBV + TR ($1055,2 \pm 14,6$ pg/ml, $p < 0,001$) izaziva značajno smanjenje oslobađanja TNF- α u odnosu na netretirane LPS stimulisanu ćelije. Međutim, kada se nivo TNF- α predstavi u odnosu na količinu proteina u uzorku (SL. 13B), uočava se da se taj nivo, u stvari, povećava pod tretmanom RBV-om i RBV+TR, a da je značajno manji nakon tretmana TR-om. Ovakav prikaz rezultata ukazuje da je inhibitorni uticaj RBV i RBV + TR na

smanjenje ekspresije iRNK (SL. 12A) i oslobađanja TNF- α (Sl. 13A) verovatno uslovljen smanjenjem ukupnog broja ćelija u kulturi, dok je inhibitorni uticaj TR na smanjanje oslobađanja TNF- α verovatno uslovljen smanjenjem ekspresije gena za TNF- α (SL. 12A).

U nestimulisanoj kulturi mikroglije, bazalni nivo oslobađanja IL-1 β iznosi $120,9 \pm 8,3$ pg/ml, a tretman sa RBV, TR i RBV + TR ne utiče na nivo oslobađanja ovog citokina (SL. 13C). Kada se nivo IL-1 β predstavi u odnosu količinu proteina u uzorku, uočava se da se samo nakon tretmana kombinacijom RBV+TR povećava ekspresiju ovog citokina u odnosu na netretirane ćelije (SL. 13D). U kulturi stimulisanoj LPS (SL. 13C), nivo IL-1 β 3,5 puta je veći nego u nestimulisanoj kulturi ($423,5 \pm 20,2$ pg/ml, $p < 0,001$), a tretman RBV-om ($780,2 \pm 13,1$ pg/ml, $p < 0,001$) i RBV + TR ($1015,1 \pm 11,3$ pg/ml, $p < 0,001$) dodatno povećavaju oslobađanje ovog citokina u odnosu na LPS stimulaciju. TR ne ostvaruje bitan uticaj na oslobađanje IL-1 β ($447,9 \pm 8,8$ pg/ml) u odnosu na kulturu stimulanu LPS. S druge strane, kada se nivo IL-1 β predstavi u odnosu na količinu proteina u uzorku (SL. 13D), uočava se da sva tri tretmana ostvaruju imunomodulatorno dejstvo na ekspresiju ovog proinflamatorni citokina.

Iako je analiza ekspresije pokazala da nestimulisana mikroglija ne eksprimira transkript za IL-6 (SL. 12C), u nestimulisanoj kulturi mikroglije registrovan je bazalni nivo oslobađanja ovog citokina od $302,4 \pm 4,6$ pg/ml, koja se ne menja pod uticajem tretmana sa RBV, TR i RBV + TR. U kulturi stimulisanoj LPS-om, nivo oslobađanja IL-6 sedam puta je veći od onog u nestimulisanoj kulturi ($2139,2 \pm 252,3$ pg/ml, $p < 0,001$), a tretmani RBV-om ($1394,0 \pm 140,8$ pg/ml, $p < 0,05$), TR-om ($1538,9 \pm 78,3$ pg/ml, $p < 0,05$) i RBV + TR ($1213,8 \pm 74,4$ pg/ml, $p < 0,05$) značajno umanjuju nivo oslobađanja IL-6 (SL. 13E). Kada se nivo IL-6 predstavi po količini proteina u uzorku, (SL. 13F) uočava se da tretmani nemaju statistički značajan uticaj na nivo oslobađanje citokina po ćeliji, što ukazuje da je inhibitorni uticaj analoga na smanjenje ekspresije iRNK za IL-6 (SL. 12C) i oslobađanje IL-6 u kulturi stimulisanoj LPS-om (SL. 13E), refleksija njihovog uticaja na smanjenje ukupnog broja ćelija.



SLIKA 13. Uticaj RBV i TR na oslobađanje citokina. Nivo citokina određen je u medijumu ćelijskih kultura primenom ELISA testa. Vrednosti koncentracija

citokina predstavljene su pg/ml medijuma (**A, C, G, E**) ili po količini proteina u uzorku (**B, D, F, H**). (**A, B**) Nivo TNF- α , (**C, D**) IL-1 β , (**E, F**) IL-6 i (**G, H**) IL-10, u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanoj LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $n = 3$ tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu \pm standardna greška. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavljaju $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavljaju nivo značajnosti u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji.

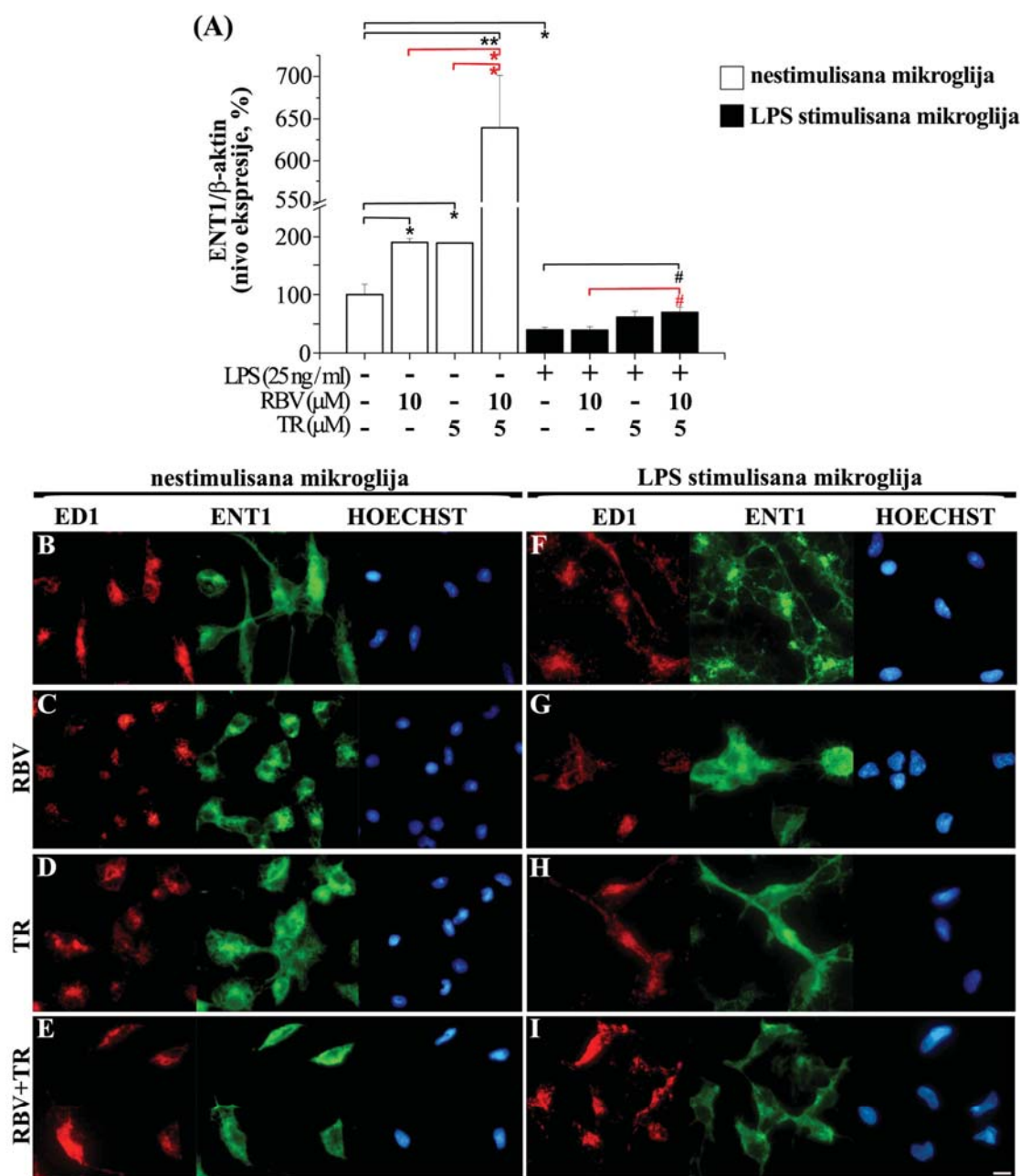
Bazalni nivo oslobađanja IL-10 u nestimulisanoj kulturi mikroglije iznosi $81,7 \pm 9,4$ pg/ml i ne menja se bitno pod tretmanima RBV, TR i RBV + TR (SL. 13G). U kulturi stimulisanoj LPS, ekspresija IL-10 uvećala se gotovo dva puta ($145,2 \pm 2,3$ pg/ml, $p < 0,001$) u odnosu na nestimulisanu mikrogliju, a tretmani RBV-om ($126,1 \pm 4,3$ pg/ml, $p < 0,05$), TR-om ($131,4 \pm 3,6$ pg/ml, $p < 0,05$) i RBV + TR ($119,3 \pm 3,6$ pg/ml, $p < 0,05$) značajno smanjuju oslobađanje IL-10 u odnosu na mikrogliju stimulisanu LPS-om (SL. 13G). Međutim, kada se nivo IL-10 predstavi u odnosu na količinu proteina u uzorku, uočava se da svi primenjeni tretmani čak i povećavaju oslobađanje IL-10 (SL. 13H), što ukazuje da je efekat smanjenja ukupnog IL-10 u kulturi posledica smanjenja broja ćelija.

4.2.8. Uticaj ribavirina i tiazofurina na gensku i proteinsku ekspresiju nukleozidnih transportera ENT1 i ENT2 u kulturi mikrogljijskih ćelija

Uticaj RBV i TR na ekspresiju ENT1 i ENT2 ispitan je na genskom i proteinskom nivou.

U nestimulisanoj kulturi mikroglije, oba primenjena analoga pojedinačno povećala su ekspresiju iRNK za ENT1 za oko 2 puta (RBV: $190,6 \pm 6,4$ %, $p < 0,05$; TR: $189,7 \pm 0,2$ %, $p < 0,05$ SL. 14A), dok njihova kombinacija izaziva povećanje od 6 puta ($639,4 \pm 61,9$ %, $p < 0,001$, SL. 14A). U kulturi stimulisanoj LPS-om ekspresija iRNK za ENT1 smanjila se na $40,1 \pm 4,5$ % u odnosu na nestimulisanu kulturu ($p < 0,05$, SL. 14A). U istoj kulturi, RBV i TR nisu ispoljili značajan uticaj na ekspresiju iRNK za ENT1, ali je kombinovani tretman RBV + TR izazvao

dvostruko veće povećanje ekspresije u odnosu na LPS stimulisane ćelije ($174,4 \pm 22,0 \% p < 0,05$, SL. 14A).

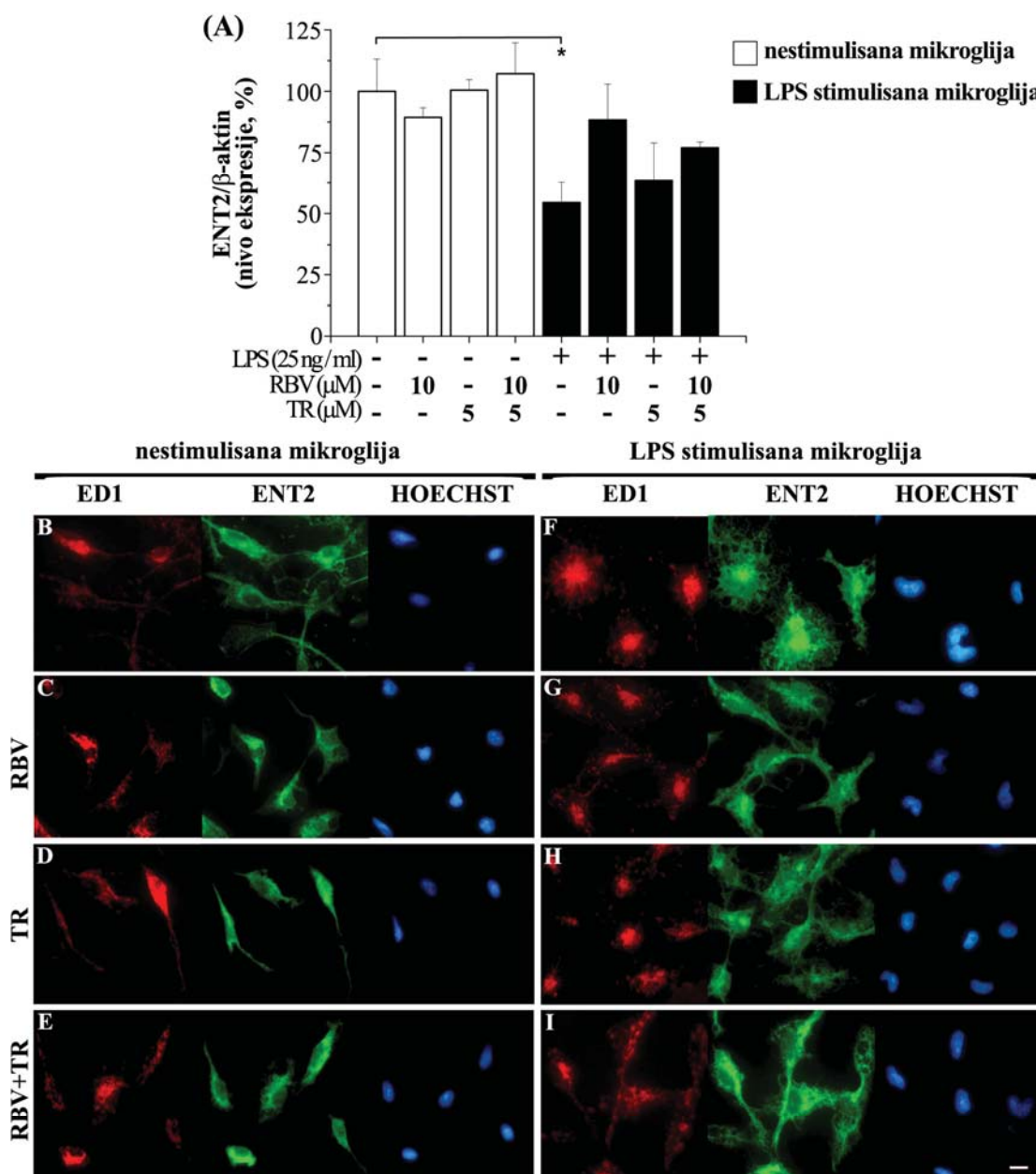


SLIKA 14. Uticaj RBV i TR na gensku i proteinsku ekspresiju ENT1 u mikrogljijskoj kulturi. (A) Ekspresija ENT1 iRNK praćena je u nestimulisanoj kulturi i u kulturi stimulisanoj LPS-om, pod uticajem RBV, TR ili njihove kombinacije. Ekspresija iRNK analizirana je RT-PCR metodom sa fluorescentnom bojom SYBR green, dok je β-aktin korišćen kao interna kontrola. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti iz $n = 3$ nezavisna eksperimenta izvedenih u

triplikatu \pm standardna greška. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisano mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisano mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavlja $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavljaju nivo značajnosti u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji. **(B – I) Imunofluorescentno obeležavanje ENT1 na ćelijama mikroglije u kulturi.** Ćelije su obeležene primenom fluorescentnog antitela na ENT1 (zelena fluorescencija), na ED1 (crvena fluorescencija) i HOECHST bojom koja markira jedra (plava fluorescencija). Sa strane mikrografije data je oznaka tretmana: RBV – tretman 10 μ M RBV; TR – tretman 5 μ M TR; RBV+TR – kombinovani tretman 10 μ M RBV + 5 μ M TR. Skala na mikrografijama: 50 μ m.

Primenjeni analozi, ni pojedinačno, ni u kombinaciji, nisu uticali na ekspresiju iRNK za ENT2 u nestimulisanoj kulturi mikroglije (SL 15A). Kao što je pokazano i za ENT1, stimulacija LPS-om smanjuje nivo ekspresije iRNK za ENT2 na polovinu ($54,4 \pm 8,3$ %) u odnosu na nestimulusanu kulturu ($p < 0,05$, SL. 15A), a primenjeni tretmani ne menjaju statistički značajno ekspresiju iRNK za ENT2 (SL. 15A).

Ekspresija ENT1 i ENT2 na ćelijama u kulturi praćena je dvojnim imunocitohemijskim obeležavanjem ćelija na ENT1 (SL. 14B-I, zelena fluorescencija), odnosno, ENT2 (SL. 15B-I, zelena fluorescencija) i na ED1, kao marker mikroglije (crvena fluorescencija), uz primenu Hoechst fluorescentne boje koja markira jedra ćelija (plava fluorescencija). Imunocitohemijska analiza pokazuje da se ENT1 i ENT2 u visokom stepenu eksprimiraju na ćelijama mikroglije, kako u nestimulisanim kulturama, tako i u kulturama stimulisanim LPS-om i tretiranim RBV-om, TR-om ili njihovom kombinacijom. Budući da nije urađena kvantifikacija imunofluorescentnih signala, ovaj eksperiment poslužio je samo kao potvrda da ENT1 i ENT2 mogu biti potencijalni transporteri RBV i TR u oba tipa mikroglije.



SLIKA 15. Efekat RBV i TR na gensku i proteinsku ekspresiju ENT2 u mikrogljijskoj kulturi. (A) Ekspresija iRNK ENT2 praćena je u nestimulisanoj kulturi i u kulturi stimulisanoj LPS-om, pod uticajem RBV, TR ili njihove kombinacije. Ekspresija iRNK analizirana je RT-PCR metodom sa fluorescentnom bojom SYBR green, dok je β-aktin je korišćen kao interna kontrola. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti iz $n = 3$ nezavisnih eksperimenata izvedenih u triplikatu \pm standardna greška. Nivo značajnosti u razlikama između grupa označen je zvezdicama (u odnosu na nestimulisanu mikrogliju) ili tarabama (u odnosu na LPS stimulisanu mikrogliju), pri čemu * ili # predstavlja $p < 0,05$, a ** ili ## predstavlja $p < 0,001$. Crvene zvezdice ili tarabe predstavlja nivo značajnosti

u razlikama između kombinovanog u odnosu na pojedinačne tretmane u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji. **(B – I) Imunofluorescentno obeležavanje ENT2 na ćelijama mikroglije u kulturi.** Ćelije su obeležene primenom fluorescentnog antitela na ENT2 (zelen fluorescencija), na ED1 (crvena fluorescencija) i HOECHST bojom koja markira jedra (plava fluorescencija). Sa strane mikrografije data je oznaka tretmana: RBV – tretman 10 μ M RBV; TR – tretman 5 μ M TR; RBV+TR – kombinovani tretman 10 μ M RBV + 5 μ M TR. Skala na mikrografijama: 50 μ m.

5. DISKUSIJA

Nukleozidni analozi ribavirin i tiazofurin ispoljavaju pozitivan terapijski efekat u animalnom modelu multiple skleroze (Lavrnja i sar, 2012, 2008, 2005; Milicevic i sar, 2003; Stosic-Grujicic i sar. 2002). Primenjeni pojedinačno ili u kombinaciji (Stojkov i sar., 2008, 2006), ovi analozi odlažu početak, smanjuju težinu simptoma i skraćuju trajanje efektorske faze bolesti. Do sada opisani povoljni efekti RBV i TR u EAE-u zasnivaju se na njihovom sistemskom, perifernom delovanju. Tako na primer, TR smanjuje adheziju imunskih ćelija za vaskularne endotelne ćelije, i na taj način ojačava neprohodnost krvno-moždane barijere (KMB) za ćelije imunskog sistema (Stosic-Grujicic i sar. 2002). Sa druge strane, RBV menja profil ekspresije proinflamatornih citokina u EAE-u (Lavrnja i sar. 2008), tako što sprečava prodor aktiviranih T-limfocita kroz KMB, a ispoljava i antiproliferativno dejstvo na ćelije drenirajućeg limfnog čvora. Međutim, sposobnost oba nukleozidna analoga da prođu kroz krvno-moždanu barijeru (Colombo i sar, 2011; Janac i sar., 2004; Gilbert i Wyde., 1988) otvorila je mogućnost da se deo njihovog dejstva u sprečavanju razvoja bolesti, kao i u ublažavanju ispoljavanja simptoma EAE zasniva na njihovom delovanju na ćelije CNS-a. Budući da mikroglia ima ključnu ulogu u svim neuropatološkim stanjima, a posebno u patološkim procesima vezanim za EAE i MS (Benveniste, 1997), u ovoj doktorskoj tezi ispitan je efekat RBV i TR na morfološke i funkcionalne karakteristike mikroglialskih ćelija *in vivo* i *in vitro*.

5.1. UTICAJ RIBAVIRINA I TIAZOFURINA NA ODGOVOR MIKROGLIJE U *IN VIVO* MODELU NEUROINFLAMACIJE

Prvi, *in vivo*, deo studije ispitivanja dejstva RBV i TR na odgovor mikroglije u uslovima neuroinflamacije urađen je u modelu EAE-a, koji se zasniva na indukciji neuroinflamatornog odgovora kod DA pacova, koji su potom individualno tretirani kombinacijom RBV+TR, 15 dana od pojave prvog simptoma. Funkcionalni status

mikroglije procenjivan je na osnovu njenih morfoloških karakteristika, koji su najčešće u međusobnoj korelaciji sa stepenom aktivacije (Kettenman i sar., 2011). U poređenju sa ameboidnim oblikom mikroglije kod EAE pacova, koja ukazuje na njenu intenzivnu makrofagnu funkciju, prisustvo razgranatih ćelija kod životinja tretiranih RBV+TR, ukazuje na mirujuće ili manje aktivirano stanje mikroglije. Osim mirujuće morfologije, kod tretiranih životinja zabeleženo je i smanjenje ukupnog broja mikroglijskih ćelija. Pretpostavili smo da su niži stepen aktivacije i manja gustina mikroglijskih ćelija u korelaciji sa smanjenom infiltracijom mononuklearnih ćelija, te da su oba odgovorna za već opisane pozitivne efekte kombinovanog tretmana RBV i TR (Savić i sar., 2012; Stojkov i sar., 2008, 2006; Lavrnja i sar., 2005), koji obuhvataju odsustvo demijelinizacije, brži oporavak i blažu kliničku sliku. Ovaj rezultat takođe je potvrdio nalaze drugih studija (Gijbels i sar., 1995; Selmaj i sar., 1991), da smanjenje stepena aktivacije mikroglije u efektorskoj fazi bolesti ima povoljno dejstvo u sprečavanju razvoja EAE. Međutim, za ukupnu procenu efekta ovog i drugih tretmana mora se imati u vidu „dvojna priroda“ mikroglije, koja u EAE i MS može imati presudno važnu protektivnu ulogu (Napoli i Neumann, 2010; Aravalli i sar., 2007).

5.2. UTICAJ RIBAVIRINA I TIAZOFURINA NA ODGOVOR MIKROGLIJE U *IN VITRO* MODELU NEUROINFLAMACIJE

Na osnovu rezultata *in vivo* studije, kojom je pokazano da RBV i TR menjaju morfološke karakteristike mikroglije, formulisana je hipoteza da ovi analozi utiču i na funkcionalni status mikroglije, odnosno na stepen njene aktivacije. Ovakva hipoteza mogla se pouzdano proveriti samo u izolovanom sistemu monokulture mikroglije. Zato je u drugom delu ove teze za testiranje dejstva ova dva purinska analoga korišćen *in vitro* model primarne kulture mikroglije i LPS-indukovani model neuroinflamacije. Ovaj *in vitro* model neuroinflamacije zasniva se na stimulaciji mikroglijskih ćelija lipopolisaharidom (LPS) koji je sastavna komponenta bakterijskog zida gram negativnih bakterija. Uticaj RBV i TR analiziran je u pogledu stepena njihove citotoksičnosti, kao i u pogledu uticaja na

morfološke i funkcionalne karakteristike mikroglije u kulturi. Citotoksični efekat primenjenih analoga praćen je klasičnim testovima vijabilnosti ćelija, dok je uticaj na morfološke karakteristike mikroglije analiziran primenom morfometrijske analize ćelija. Uticaj RBV i TR na funkcionalne karakteristike mikroglije analiziran je preko praćenja njihovog efekta na produkciju NO, aktivaciju NF- κ B signalnog puta i oslobađanje citokina. S obzirom na to da se RBV i TR transportuju u ćelije posredstvom uravnotežujućih nukleozidnih transportera, ENT1 i ENT2 (Fukuchi i sar., 2010; Endres i sar., 2009; Yamamoto i sar., 2007; Damaraju i sar. 2005), analizirana je ekspresija ovih transportera u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji, kao i u kulturama tretiranim RBV i TR.

5.2.1. Citotoksičnost ribavirina i tiazofurina

Analiza citotoksičnog efekta RBV i TR, ukazuje da efekat oba analoga zavisi od prethodnog stanja aktivacije mikroglije. Naime, u nestimulisanoj kulturi, RBV izaziva umereni citotoksični efekat tek u dozama većim 10 μ M. Mikroglijske ćelije stimulisane LPS-om, međutim, pokazuju veću osetljivost na RBV, jer sve primenjene doze izazivaju dozno-zavisno smanjenje vijabilnosti. Tiazofurin ispoljava ukupno jači citotoksični efekat od RBV, jer i u nestimulisanoj i u LPS-stimulisanoj kulturi izaziva uporedivo dozno-zavisno smanjenje vijabilnosti u dozama većim od 5 μ M. Na isti zaključak upućuje i poređenje kinetičkog parametra inhibicije EC₅₀. U slučaju oba analoga, vrednost EC₅₀ značajno je manja u stimulisanoj kulturi (4,5 μ M za RBV i 3,7 μ M za TR) nego u nestimulisanoj (5,9 μ M za RBV i 5,8 μ M za TR), što upućuje na zaključak da su stimulisane ćelije znatno osetljivije na citotoksično dejstvo ovih analoga od nestimuliranih ćelija.

Rezultati ispitivanja citotoksičnog potencijala RBV i TR nisu predstavljali iznenađenje. Poznato je, naime da RBV i TR zaustavljaju ćelijski ciklus (Vallée i sar., 2000; Jayaram i sar., 1982) i indukuju diferencijaciju i apoptozu ćelija. Oba analoga takođe, ispoljavaju onkolitičko delovanje u različitim mišjim i humanim sistemima (Weber, 2003; Olah i sar., 1990). Citotoksični potencijal ovih analoga, iskazan u vidu parametra inhibicije, IC₅₀, široko varira zavisno od tipa ćelije. Primera radi, vrednosti IC₅₀ za TR dobijene na različitim tumorskim ćelijama

čoveka variraju od vrednosti 50 - 150 μM na leukemičnim progenitorskim ćelijama koštane srži pacijenata sa hroničnom, odnosno, akutnom mijeloidnom leukemijom (Colovic i sar., 2003), do 4,2 μM na ćelijama neuroblastoma (Pillwein i sar, 1993). Slično tome, citotoksični potencijal RBV na NK ćelijama iznosi oko 160 μM (Ogbomo i sar., 2010), dok na ćelijskoj liniji karcinoma jajnika iznosi 23 μM (Weber, 2005). Poznato je da RBV i TR inhibiraju aktivnost IMPDH, ključnog enzima u *de novo* sintezi guanozinskih nukleotida, što dovodi do smanjenja koncentracije guanilata u ćeliji (Yamada i sar., 1988). Budući da je ovaj put sinteze bitan, kako u normalnim, tako i mitogenim funkcijama svih ćelija, može se pretpostaviti da je inhibicija IMPDH osnovni mehanizam citotoksičnog delovanja RBV i TR u aktiviranoj mikrogliji.

Kakav uticaj na razvoj i rezoluciju bolesti u EAE i MS, može imati uočeno citotoksično dejstvo ribavirina i tiazofurina na mikroglijske ćelije? Na ovo pitanje može se odgovoriti analizom efekta mitoksantrona, koji se primenjuje kod pacijenata sa relapsno-remitentnom formom MS, kao i kod pacijenata sa sekundarno progresivnom i progresivno-relapsnom formom bolesti (Neuhaus i sar., 2006; Jain, 2000). Dve nedavne studije pokazale su da je jedan od mehanizama terapijskog delovanja mitoksantrona, upravo citotoksični uticaj na aktivirane ćelije mikroglije (LI i sar., 2012; Piao i sar., 2007). U kontekstu ovih nalaza, naši rezultati o smanjuju stepena aktivacije i brojnosti mikroglije pod uticajem RBV i TR *in vivo* (Savic i sar., 2012), kao i citotoksični efekat ovih supstanci na aktiviranu mikrogliju *in vitro*, ukazuju na potencijalne terapijske učinke ovih analoga u EAE-u.

Već je pomenuto da i RBV i TR inhibiraju aktivnost istog enzima - IMPDH. Detaljne biohemijske studije ukazale su, međutim, da RBV i TR inhibiraju IMPDH vezujući se za dva različita mesta na molekulu enzima (Franchetti i sar., 1996). Imajući u vidu da RBV i TR ispoljavaju citotoksičan efekat, kako na aktivirane, tako i na normalne, neizmenjene ćelije organizma, ovi nalazi naveli su nas na ideju da bi istovremena primena RBV i TR, koji ispoljavaju potencijalno sinergističko ili aditivno dejstvo na IMPDH (Huggins i sar., 1984), mogla da izazove adekvatan

stepen inhibicije IMPDH, u prisustvu pojedinačno nižih i neškodljivih doza ovih analoga. U našem *in vitro* modelu, kombinovani tretman od 10 μ M RBV + 5 μ M TR ispoljio je citotoksičan efekat, kako za nestimulisanu kulturu, tako i na kulturu stimulisane LPS-om. Međutim, aditivni efekat kombinovane primene uočen je samo na nestimulisanoj kulturi, dok je u kulturi stimulisanoj LPS-om, kombinovana primena RBV i TR izazvala efekat koji se može porediti sa efektom pojedinačne doze RBV. Dobijeni rezultati ukazali su na to da je za postizanje sinergističkog ili aditivnog efekta kombinovane primene RBV i TR pri njihovim pojedinačno nižim koncentracijama, potrebno veoma pažljivo „titriranje“ doza i šema primene kojom bi se izbegla istovremena aplikacija (Jayaram i sar., 1992).

5.2.2. Uticaj ribavirina i tiazofurina na produkciju NO

Jedan od glavnih mehanizama citotoksičnog dejstva mikroglije na druge ćelije u okruženju je produkcija slobodnog radikala, azot monoksida (NO). Oslobođen iz mikroglije, NO izaziva oksidativna oštećenja neurona i oligodendrocita (Merrill i sar., 1993; Boje i Arora, 1992). Postoje podaci da je preterana produkcija NO jedan od uzročnika MS i EAE (Smith i sar., 1999; Parkinson i sar., 1997), a sa tim u skladu je i podatak da inhibicija iNOS, enzima koji sintetiše NO, ostvaruje pozitivan učinak u EAE-u (Ding i sar., 1998; Hooper i sar., 1997). Mora se, međutim, navesti da postoje nedoumice u vezi sa ulogom NO u MS. Naime, neke studije ističu njegovo protektivno dejstvo (Willenborg i sar., 1999).

Imajući u vidu da je produkcija NO jedno od glavnih obeležja aktivirane mikroglije, u ovoj studiji ispitan je uticaj RBV, TR i njihove kombinacije na produkciju NO u mikroglijskim ćelijama u kulturi. Iz literature je poznato da LPS snažno indukuje produkciju NO u mikrogliji (Lieb i sar., 2003). S druge strane, neki podaci ukazuju na to da RBV sprečava produkciju NO, tako što smanjuje dostupnost tetrahidrobiopterina koji deluje kao kofaktor iNOS (Michaelis i sar., 2007; Kast, 2003), dok TR, u nekim tipovima ćelija smanjuje produkciju NO, putem negativne regulacije ekspresije iRNK za iNOS (Samardzic i sar., 2001). U našem sistemu, stimulacija kulture mikroglije LPS (25 ng/ml, 48 h) izazvala je

očekivano povećanje, dok su tretmani RBV, TR i RBV+ TR izazvali dozno-zavisno smanjenje produkcije NO. Poznato je, međutim, da LPS produžava životni vek mikrogljijskih ćelija (ova studija; Kaneko i sar., 2009), kao i da RBV i TR deluju citotoksično (rezultati ove studije). Stoga je ukupan nivo NO normalizovan na broj ćelija u kulturi. Ovakav prikaz rezultata pokazao je da je povećanje koncentracije NO u kulturi mikroglije stimulisane LPS-om, kao i smanjenje produkcije NO nakon tretmana RBV, TR i RBV+TR, zapravo posledica promenjenog broja ćelija u kulturi, odnosno, da se efekat RBV i TR bazira na njihovoj citotoksičnosti. Treba napomenuti da RBV i TR ne utiču na bazalnu produkciju NO u nestimulisanoj mikrogliji, osim u koncentraciji od 20 μM , što je takođe rezultat njihove citotoksičnosti.

Na osnovu normalizovanih rezultata koji se odnose na produkcije NO uočava se da je produkcija NO povećana samo u kombinovanim tretmanima nestimulisane i LPS stimulisane mikroglije, pa smo mogli da zaključimo da je NO u ovim slučajevima mogao da učestvuje u izazvanom citotoksičnom efektu. U ostalim tretmanima ovaj slobodno-radikalni gas nije imao bilo kakvu ulogu u izazvanoj citotoksičnosti.

5.2.3. Uticaj ribavirina i tiazofurina na morfologiju aktivirane mikroglije

Jedna od važnih odrednica aktivacije mikroglije *in vivo* i *in vitro* jeste dramatična promena njihove morfologije, koja između ostalog podrazumeva hipertrofiju ćelije i povlačenje nastavaka. Suprotan proces, proces morfološke i funkcionalne deaktivacije mikroglije nakon rezolucije inflamacije, predstavlja jedan od još nerazjašnjenih fenomena u fiziologiji mikrogljijskih ćelija. Vrlo je verovatno da se deaktivacija mikroglije *in vivo* ne dešava na isti način kao deaktivacija mikroglije u *in vitro* uslovima, u kojima ćelije stiču odlike replikativne starosti i umiru procesom apoptoze. Stoga je u ovoj studiji ispitan uticaj ribavirina i tiazofurina na morfološke promene aktivirane mikroglije.

Poznato je da LPS, kao potentni inflamatorni agens, uzrokuje aktivaciju mikroglije i prateće povećanje ćelijskog tela, promenu oblika i reorganizaciju

citoskeleta (Abd-El-Basset i Fedoroff, 1995; Suzumura i sar., 1991). Gusta mreža mikrotubula nestimulisane mikroglije, nakon tretmana LPS-om postaje manje gusta i ima tendenciju da se širi po citoplazmi velike okrugle ćelije (Abd-El-Basset i sar., 2004). U ovoj studiji pokazano je da tretman RBV-om, TR-om i njihovom kombinacijom značajno smanjuje prosečnu površinu ćelijskog tela aktivirane mikroglije. Jedno od mogućih objašnjenja ovog efekta je da primenjeni tretmani, delujući na nivo guaninskih nukleotida u ćeliji, ostvaruju posredan uticaj na neki konvergirajući proces od kojeg zavisi morfologija i veličina ćelije. Naime, pokazano je da je za održavanje stabilnosti mikrotubularne mreže, kao i za transport posredovan ovim elementima citoskeleta, neophodan GTP (Drechsel i Kirschner, 1994). Budući da RBV i TR inhibiraju aktivnost IMPDH i posledično smanjuju nivo GTP-a u ćeliji, to je jedan od mogućih mehanizam delovanja RBV i TR na reorganizaciju citoskeleta i smanjenje ćelijskog tela. Potporu ovoj tvrdnji pruža i studija Vallée i sar. (2000) koja je pokazala da RBV izaziva depolimerizaciju mikrotubula i perinuklearnu kondenzaciju u humanim melanoma ćelijama. Takođe je moguće da je smanjenje površine ćelije i povlačenje nastavaka nakon tretmana analogima, posledica njihovog citotoksičnog delovanja i usmeravanja ćelije prema apoptotskom ishodu, čija je prva morfološka karakteristika upravo smanjenje ćelije. Bitno je napomenuti da TR i kombinovani tretman RBV-om i TR-om smanjuju površinu ćelijskog tela nestimulisane mikroglije, kao i da u kombinovanom tretmanu stimulisane mikroglije RBV i TR ispoljavaju aditivan efekat na smanjenje ćelija.

5.2.4. Uticaj ribavirina i tiazofurina na signalizaciju preko NF- κ B

Aktivacija mikroglije, između ostalog i LPS-om, vezana je za aktivaciju signalnog puta koji se odvija preko NF- κ B i dovodi do indukcije ekspresije nekoliko ranih gena (Baeuerle, 1991), kao i gena za citokine koji su uključeni u neuroinflamatorni odgovor (Wang i sar., 2011). NF- κ B je transkripcioni faktor, koji se u citoplazmi nalazi kao kompleks heterodimera p50/p65 i inhibitorne komponente I κ B. Nakon inflamatornog stimulusa, u mikrogliji se aktivira ovaj

signalni put (Lim i sar., 2010), što podrazumeva fosforilaciju i degradaciju I κ B, sa istovremenim oslobodanjem heterodimera p50/p65 i njegovom translokacijom u jedro (Moynagh, 2005). Pokazano je da se LPS-om indukovano povećanje ekspresije NO, TNF- α i IL-1 β u mikroglijskim ćelijama smanjuje nakon inhibicije NF- κ B i MAPK signalnih puteva (Wang i sar., 2011). Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da je LPS-om indukovana aktivacija NF- κ B puta snažno inhibirana RBV-om, TR-om i njihovom kombinacijom, tako što je sprečena translokacija p65 subjedinice u jedro. Upravo ovakva interferencija nukleozidnih analoga sa NF- κ B signalnim putem može biti odgovorna za nishodnu regulaciju ekspresije iRNK za TNF- α i IL-6. Sprečavanje translokacije p65 subjedinice NF- κ B u jedro od strane RBV i TR u aktiviranoj mikrogliji, može biti od kliničke važnosti, budući da je pokazano da blokada disocijacije I κ B od heterodimera p50/p65 ublažava težinu simptoma EAE (Hwang i sar., 2011). Postoji više načina da se inhibira NF- κ B, a kako to tačno rade RBV i TR ostaje da se utvrdi. Kako RBV i TR smanjuju pul GTP-a u ćeliji jedan od mogućih odgovora jeste inhibicija ushodnih medijatora, kao što su male Rho GTP-aze koje utiču na NF- κ B aktivaciju i produkciju citokina (Perona i sar., 1997). Interesantno je da su rezultati dobijeni na nestimulisanoj mikrogliji, a odnose se na signalizaciju preko NF- κ B puta potpuno suprotni onima u LPS stimulisanim kulturama. Naime, RBV i TR potenciraju translokaciju p65 subjedinice u nukleus i time podstiču aktivaciju NF- κ B signalnog puta. Istovremeno, kod nestimulisane mikroglije oni ne povećavaju ćelijsko telo mikroglije i ne povećavaju produkciju proinflamatornih citokina, tako da ostaje da se utvrdi značaj aktivacije NF- κ B signalnog puta RBV i TR u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji. Razlog za različite, pa čak i suprotne efekte RBV i TR u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji možda leži u sposobnosti ovih nukleozidnih analoga da ciljano deluju na IMPDH II izoformu enzima. Ova izoforma je predominantno eksprimirana u brzo proliferišućim i neoplastičnim ćelijama i važan je regulator ćelijske proliferacije (Zimmermann i sar., 1998; Jackson i sar., 1975).

Ako se u daljim istraživanjima potvrdi razlika u aktivnosti IMPDH enzima u nestimulisanoj i LPS stimulisanoj mikrogliji, to bi u budućnosti učinilo RBV i TR veoma atraktivnim agensima za moguću primenu u terapiji neuroloških poremećaja čija je patologija povezana sa preteranom i hroničnom mikroglijskom aktivacijom.

5.2.5. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju i oslobađanje citokina

Sve je više dokaza da je mikroglija glavni izvor prekomerene i hronične produkcije proinflammatoryh citokina koji doprinose razvoju hroničnih neuroloških poremećaja (Smith i sar., 2012; Block i sar., 2007). Kako su već pokazana imunosupresivna dejstva RBV (Lavrnja i sar., 2008) i TR (Stosic-Grujicic i sar., 2002), kao i da RBV može da utiče na promene u citokinskoj mreži (Tam i sar., 2001), postavili smo hipotezu da RBV i TR smanjuju štetna dejstva aktivirane mikroglije tako što suprimiraju produkciju proinflammatoryh citokina i na taj način usporavaju progresiju neuroinflammacije.

Prvo je praćen proinflammatory potencijal LPS-a u dozi od 25 ng/ml na genskom i proteinskom nivou. Ovaj endotoksin je indukovao značajno povećanje ekspresije iRNK i produkcije TNF- α , IL-1 β i IL-6 u poređenju sa nestimulisanom mikroglijom.

Kvantitativnim PCR-om potvrđeno je da se smanjenje ekspresije proinflammatoryh citokina TNF- α i IL-6 pod uticajem RBV i TR dešava na nivou iRNK, što je bilo praćeno adekvatnom promenom produkcije ovih citokina. Međutim, kako su primenjene doze RBV i TR pokazale citotoksičan efekat, izvršena je provera povezanosti genske supresije sa oslobađanjem ovih proinflammatoryh citokina normalizacijom na ukupnu količinu proteina koju je sadržavala testirana kultura. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da je smanjena produkcija TNF- α i IL-6 uglavnom posledica smanjenog broja ćelija, tj. citotoksičnog dejstva RBV i TR. Zaprvo, samo je TR pokazao da uz citotoksično ima i antiinflammatory dejstvo u kontekstu smanjenja produkcije TNF- α . Pokazano je da blokada oslobađanja TNF- α od strane mikroglije prigušuje inflamaciju i sprečava demijelinizaciju u EAE

(Klinkert i sar., 1997), pa postoji mogućnost da je redukcija TNF- α postignuta TR-om ili citotoksičnim dejstvom RBV u CNS-u, jedan od mehanizama kojim oni ispoljavaju svoje terapijsko dejstvo u EAE. Utvrđeno je da su visoke koncentracije IL-6 povezane sa različitim autimunskim oboljenjima (Ishihara i Hirano, 2002), kao i da u EAE-u ovaj citokin verovatno ima ključnu ulogu u induktivnoj fazi bolesti (Okuda i sar, 1999), stoga eliminacija aktivirane mikroglije koja preterano proizvodi ovaj citokin od strane RBV i TR možda ima ulogu u odlaganju početka EAE koji se postiže ovim supstancama (Stojkov i sar., 2006; Lavrnja i sar., 2005; Milicevic i sar., 2003; Stosic-Grujicic i sar., 2002). Kada se posmatra efekat kombinovanog tretmana u odnosu na pojedinačne, može se zaključiti da je u redukciji TNF- α i na genskom i na proteinskom nivou efekat kombinacije značajno slabiji nego individualni tretmani, što upućuje na antagonističko delovanje RBV i TR. Što se tiče efekta kombinovanog tretmana na supresiju IL-6, ona je bila u nivou pojedinačnih tretmana.

U ovoj studiji takođe je pokazano da RBV i kombinovani tretman RBV i TR značajno povećavaju gensku i proteinsku ekspresiju IL-1 β u LPS stimulisanoj mikrogliji, dok TR ne utiče na LPS-indukovanu produkciju IL-1 β . Efekat kombinovanog tretmana značajno prevazilazi efekte pojedinačnih aplikacija, ukazujući na komplementarno/aditivno delovanje RBV i TR na produkciju IL-1 β . Po nekim podacima iz literature RBV ne utiče na ekspresiju iRNK za IL-1 β u LPS stimulisanim makrofagima (Ning i sar., 1998). Međutim, rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na to da RBV istovremeno povećava oslobađanje IL-1 β iz mikroglije i redukuje broj ovih ćelija. Ovi rezultati su u korelaciji sa *in vivo* studijom Solbrig-a i sar. (2002), koji su u kori prednjeg mozga miševa sa encefalomijelitisom koji su bili tretirani RBV-om, zabeležili povećanje genske ekspresije za IL-1 β i smanjeni broj mikroglijskih ćelija u ovom regionu. Takođe, Lavrnja i sar. (2008) su zabeležili značajno veću produkciju IL-1 β u ćelijama iz drenirajućeg limfnog čvora EAE životinja tretiranih RBV u poređenju sa neteretiranim EAE životinjama. Postavlja se pitanje šta bi moglo da predstavlja ovo dodatno povećanje IL-1 β u LPS stimulisanoj mikrogliji pod uticajem RBV u *in vivo* sistemu? S obzirom da postoje

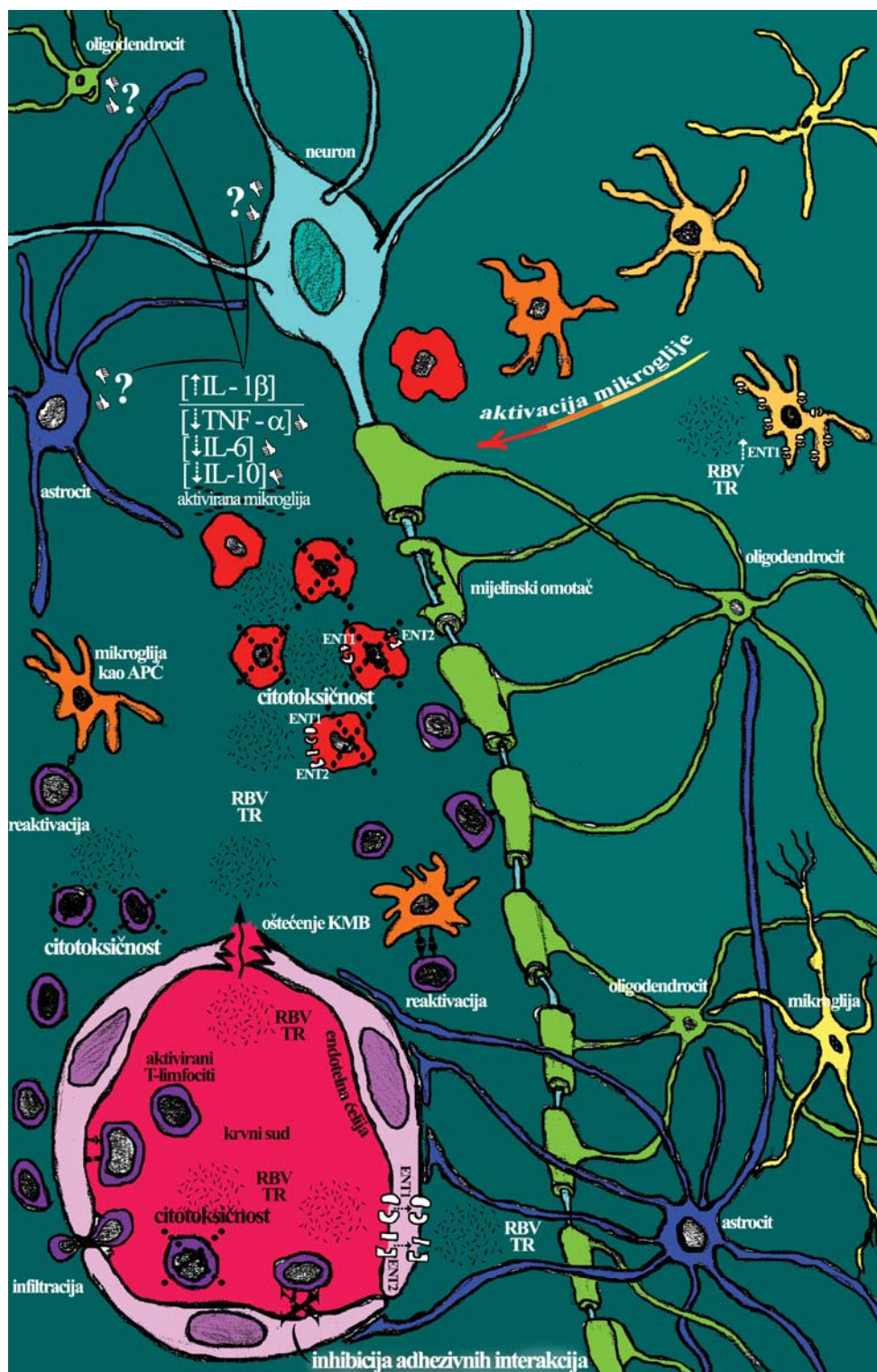
brojne studije koje ukazuju na štetnu ulogu ovog citokina kada se prekomerno luči u mnogim patološkim stanjima nervnog sistema (Swardfager i sar., 2010; Hensley i sar., 2002; Bauer i sar., 1993), prvi odgovor koji se nameće jeste da bi ovaj efekat RBV u MS-u ili EAE-u bio povezan sa nekim neželjenim dejstvima u CNS-u, kao što je oštećenje oligodendrocita, aksona i neurona, a samim tim i pogoršanjem bolesti. Pokazano je da IL-1 β stimuliše astrogliozu u EAE-u (Giulian i sar., 1988), kao i da u ko-kulturi mikroglije i astrocita stimulisanih LPS-om postoji pozitivna povratna sprega u produkciji proinflamatornih faktora (Saijo i Glass, 2011). U skladu sa ovim činjenicama očekivali smo pojačanu astrogliozu kod EAE životinja tretiranih RBV-om. Međutim, naše dve skorašnje studije pokazale su da se kod EAE životinja tretiranih RBV-om beleži supresija reaktivne astroglioze kako u sivoj tako i beloj masi kičmene mozđine (Lavrnaž i sar., 2012; Savic i sar., 2012), što ukazuje na kompleksnost odnosa između glijskih ćelija *in vivo*, kao i da postoji mogućnost da povećanje produkcije IL-1 β pod uticajem RBV od strane aktivirane mikroglije možda može da ima i pozitivni efekat. Isto tako je pokazano da IL-1 za indukciju apoptoze neurona zahteva prisustvo dodatnih citokina kao što su TNF- α ili IFN- γ (Hu i sar., 1997; Chao i sar., 1995), a RBV u našem *in vitro* modelu neuroinflamacije istovremeno smanjuje produkciju TNF- α , te je moguće da nema povoljne citokinske sredine da bi IL-1 β ostvario svoje štetno dejstvo. Takođe, kod EAE životinja tretiranih RBV-om zabeleženo je odsustvo demijelinizacije (Milicevic i sar., 2003) i zaštita aksona (Stojkov i sar., 2008), kao i poboljšanje kliničke slike bolesti (Stojkov i sar., 2008, 2006; Milicevic i sar., 2003). Treba napomenuti da iako se IL-1 β svrstava u grupu „klasičnih“ proinflamatornih citokina, priča o njegovim efektima nije crno-bela. Tako, IL-1 β -nokaut miševi nemaju kapacitet za pravilnu remijelinizaciju (Mason i sar., 2001), a pokazano je da IL-1 β može da deluje i neuroprotektivno (Carlson i sar., 1999). Da bi se stekao pravi utisak o značaju ovog RBV-om indukovano povećanog oslobađanja IL-1 β od strane mikroglije, potrebno je uraditi dodatna istraživanja, kako *in vitro* u ko-kulturi mikroglije sa drugim glijskim ćelijama, tako i na neuronima, a zatim odrediti nivo

ovog citokina u CNS-u EAE životinja tretiranih i netretiranih RBV-om u različitim vremenskim tačkama bolesti.

Pored ispitivanja dejstva RBV i TR na pro-inflamatorne citokine, analiziran je i efekat RBV i TR na gensku i proteinsku ekspresiju IL-10, koji je dobro poznati antiinflamatorni citokin, za koga se zna da značajno redukuje inflamatorni odgovor u LPS-stimulisanim mikroglijskim ćelijama (Kremlev i Palmer, 2005). Takođe, pokazano je da IL-10 inhibira aktivaciju mikroglije (Sawada i sar., 1999) i potencijalni je terapeutik za organ-specifične autoimunske bolesti (Cua i sar., 2001). Kombinovana terapija RBV-om i TR-om indukovala je značajno povećanje nivoa ekspresije iRNK za IL-10 u LPS stimulisanj kulturi, kako u odnosu na netretiranu, tako i u odnosu na pojedinačne tretmane. Uprkos tome, produkcija ovog citokina bila je niža u svim tretmanima LPS stimulisane mikroglije u odnosu na netretiranu aktiviranu mikrogliju. Ova niža produkcija IL-10 je posledica citotoksičnosti RBV i TR, kao i u slučaju TNF- α i IL-6.

5.2.6. Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju uravnotežujućih nukleozidnih transportera ENT1 i ENT2

Uticaj ribavirina i tiazofurina na ekspresiju uravnotežujućih nukleozidnih transportera, ENT1 i ENT2, ispitan je iz dva razloga. Prvo, s obzirom na to da su RBV i TR analozi nukleozida, oni se kao kompetitivni ligandi transportuju u ćelije posredstvom ENT1 i ENT2 (Fukuchi i sar., 2010; Endres i sar., 2009; Yamamoto i sar., 2007; Damaraju i sar. 2005). Stoga se može pretpostaviti da nivo ekspresije ENT1 i ENT2 presudno utiče na osetljivost ćelija na RBV i TR. S druge strane, imajući u vidu izuzetno snažne antiinflamatorne efekte adenzina, RBV i TR kao kompetitivni ligandi ENT1 i ENT2, mogu da smanje transport adenzina u ćeliju ili van nje i tako posredno ostvare imunomodulatorni efekat. Na ovome se bazira nedavno dokumentovano antiinflamatorno dejstvo kanabidola na mikroglijske ćelije mrežnjače stimulisane LPS-om (Liou i sar., 2008). S obzirom na to da utiču na ulazak RBV i TR u ćelije i da određuju nivo adenzina u vanćelijskoj sredini, podatak o ekspresiji ENT-ova mogao bi da bude značajan za procenu efekata i mehanizma delovanja RBV i TR.



SL. 16. Shema predstavlja hipotezu o dejstvima RBV i TR u EAE-u kako na periferiji tako i u CNS-u. Prethodne studije su potvrdile njihovo dejstvo na periferiji (na slici su ta dešavanja prikazana u krvnom sudu) gde spadaju inhibicija

adhezivnih reakcija između imunskih i endotelnih ćelija, kao i citotoksično dejstvo na aktivirane T-limfocite. U samom CNS-u, RBV i TR bi smanjivali inflamaciju citotoksičnim dejstvom na prodrle infiltrate i aktiviranu mikrogliju. Još uvek je nepoznanica kakav bi efekat imalo *in vivo* povećanje IL-1 β na okolne glijske ćelije kao i na neurone.

Iz literature je poznato da mikroglija ispoljava ENT1 (Liou i sar., 2008; Carrier i sar., 2006), a u ovoj studiji prvi put je pokazano da mikroglija u kulturi pored ENT1 eksprimira i transkript za ENT2. Potom je utvrđeno da uticaj RBV i TR zavisi od aktivacionog statusa ćelija. U nestimulisanoj kulturi svi tretmani povećavaju ekspresiju iRNK za ENT1, dok se ekspresija iRNK za ENT2 ne menja. Stimulacija mikroglije LPS-om, drastično smanjuje ekspresiju oba transkripta, a primenjeni tretmani ostaju bez efekta na ekspresiju ENT1 i ENT2, sa izuzetkom kombinovanog tretmana koji uvećava ekspresiju iRNK za ENT1. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da aktivacija mikroglije dovodi do smanjenja ekspresije oba transportera, što je u skladu sa rezultatima regulacije ENT1 u makrofagima koštane srži miša stimulisanih LPS-om (Soler i sar., 2001). Takođe se zaključuje da RBV i TR ostvaruju snažan uticaj na ekspresiju ENT1 u mirujućim ćelijama, a da ne utiču na ekspresiju ENT-ova u stimulisanim ćelijama. Ekspresija ENT1 i ENT2 potvrđena je imunocitohemijskim obeležavanjem ćelija u kulturi, no za potpuno razumevanje uloge ENT1 i ENT2 u aktivaciji mikroglije, kao i uticaja RBV i TR na njihovu ekspresiju, potrebno je sakupiti podatke o stepenu funkcionalne aktivnosti ovih transportera.

Sumirajući rezultate dobijene u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da oni u dobroj meri potkrepljuju polaznu hipotezu o efektima RBV i TR kao činioca morfološke i funkcionalne deaktivacije mikroglije *in vitro*. Na SL. 16 prikazana je uprošćena šema koja predstavlja hipotezu delovanja RBV i TR u CNS-u tokom EAE, na osnovu *in vivo* i *in vitro* rezultata prezentovanih u ovoj tezi. Citotoksični uticaj RBV i TR na aktiviranu mikrogliju *in vitro* i indukcija promene njenog fenotipa u smislu smanjenja ćelijskog tela, dodatno doprinose antiinflamatornim efektima RBV i TR, koji se ogledaju u smanjenju produkcije NO, kao i supresiji signalizacije posredovane NF- κ B, ključnim signalnim putem u

indukciji inflamatornog odgovora mikroglije. RBV i TR, takođe, smanjuju produkciju proinflamatornih citokina TNF- α i IL-6. S druge strane, rezultati ove studije ukazali su da testirani nukleozidni analozi mogu da indukuju i neke aspekte mikroglije koji se, u kontekstu današnjih znanja o funkciji mikroglije, smatraju proinflamatornim.

Rezultati prikazani u ovoj tezi doprinose da se dobije potpuniji uvid u efekte i mehanizme delovanja ribavirina i tiazofurina, sa posebnim osvrtom na njihovo dejstvo na morfo-funkcijske karakteristike mikroglije u uslovima inflamacije, čime se otvara mogućnost njihove potencijalne primene u kliničkoj praksi, u terapiji neuroloških poremećaja čija je patologija povezana sa prekomerenom i hroničnom mikroglijskom aktivacijom.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

Tretman purinskim nukleozidnim analogima, ribavirinom i tiazofurinom, u *in vivo* uslovima inflamacije dovodi do:

1. smanjenja broja mikroglijskih ćelija u lumbalnom regionu kičmene moždine i promene morfologije ovih ćelija iz ameboidne u žbunastu formu,
2. smanjenja težine bolesti, smanjena broja inflamatornih infiltrata i sprečavanja pojave demijelinizacije.

U *in vitro* uslovima inflamacije:

3. LPS, u odnosu na nestimulisanu mikrogliju, povećava vijabilnost mikroglijskih ćelija i indukuje povećanu produkciju NO, kao i značajnu proinflamatornu aktivaciju mikroglije, što se ogleda u promeni morfologije ovih ćelija, aktivaciji NF- κ B signalnog puta, kao i u promeni genske ekspresije i oslobađanja proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6).
4. Tretman RBV i TR u *in vitro* uslovima inflamacije deluje citotoksično i na nestimulisanu i na LPS stimulisano mikrogliju zavisno od doze. Određivanje kinetičkog parametra inhibicije EC₅₀ za oba analoga pokazalo je da je on značajno manji u stimulisanoj kulturi nego u nestimulisanoj, što ukazuje da su stimulisane ćelije znatno osetljivije na citotoksično dejstvo ovih analoga od nestimulisanih ćelija. Kombinovani tretman RBV+TR takođe ispoljava citotoksično dejstvo, pri čemu je u nestimulisanoj kulturi efekat kombinovanog tretmana jači od efekta pojedinačnih, dok je u LPS stimulisanoj kulturi bolji od efekta TR, a u nivou efekta RBV.
5. U nestimulisanoj kulturi ćelija, RBV i TR smanjuju bazalnu produkciju nitrita samo pri najvećoj apliciranoj koncentraciji, dok u kulturi stimulisanoj

LPS-om, RBV značajno smanjuje produkciju nitrita na dozno-zavisan način, a TR samo pri dve najviše aplicirane doze. Kombinacija RBV+TR izaziva snižavanje nivoa nitrata u LPS stimulisanoj mikrogliji, koje je istog inteziteta kao i kod pojedinačnih tretmana. Ovi efekti RBV i TR su rezultat njihovog citotoksičnog dejstva, tj. smanjenog broja ćelija.

6. Tretmani RBV, TR i RBV + TR utiču na morfologiju aktivirane mikroglije, tako što značajno smanjuju površinu ćelijskog tela, pri čemu kombinovani tretman ima jači efekat od pojedinačnih tretmana. Prema tome, RBV i TR utiču na tranziciju mikroglije iz aktiviranog u manje aktivirano stanje što je u korelaciji sa rezultatima *in vivo* studije. Tretmani TR i RBV + TR utiču i na morfologiju nestimulisane mikroglije, takođe značajno smanjujući površinu ćelijskog tela.
7. RBV, TR i RBV + TR snažno inhibiraju translokaciju aktivne p65 subjednice NF- κ B u jedro kod LPS aktivirane mikroglije, što je u pozitivnoj korelaciji sa smanjenom ekspresijom iRNK za TNF- α i IL-6. U nestimulisanoj mikrogliji nukleozidni analozi imaju suprotan efekat: potenciraju translokaciju p65 subjednice u jedro, koja, međutim, nije praćena porastom bilo kojeg merenog parametra aktivacije ovih ćelija. Efekat kombinovanog tretmana je u nivou pojedinačnih tretmana kako kod nestimulisane, tako i kod LPS stimulisane mikroglije.
8. Redukcija oslobađanja TNF- α u LPS stimulisanoj mikrogliji je posledica citotoksičnog dejstva RBV i RBV + TR, dok je delovanje TR na smanjenje oslobađanja ovog citokina verovatno posledica i genske supresije i citotoksičnosti. Redukcija oslobađanja IL-6 u svim tretmanima LPS stimulisane mikroglije, je posledica citotoksičnosti RBV, TR i njihove kombinacije, što je uzrok i smanjenja produkcije antiinflamatornog citokina, IL-10. U pogledu redukcije oslobađanja ova tri citokina kombinovani tretman RBV+TR nije postizao bolji efekat od pojedinačnih tretmana.

9. RBV i kombinovani tretman RBV + TR dodatno povećavaju kako gensku tako i proteinsku ekspresiju IL-1 β u LPS stimulisanom mikrogliji, dok TR nema bitan uticaj.
10. Aktivacija mikroglije LPS-om dovodi do značajnog smanjenja genske ekspresije ENT1 i ENT2. RBV i TR kao i njihova kombinacija značajno povećavaju gensku ekspresiju ENT1, ali ne utiču na nivoe iRNK za ENT2 u nestimulisanom mikrogliji. U LPS stimulisanom mikrogliji samo kombinovani tretman indukuje značajno povećanje ekspresije gena za ENT1, dok ostali tretmani nisu imali efekta, bilo da je u pitanju genska ekspresija ENT1 ili ENT2. Nestimulisana i LPS-stimulisana mikroglija takođe eksprimiraju ENT1 i ENT2 na proteinskom nivou.
11. U LPS aktiviranoj mikrogliji efekti pojedinačnih tretmana od 10 μ M RBV i 5 μ M TR, kao i efekat njihove kombinacije su slični, što govori da simultani kombinovani tretman u primenjenim dozama nema prednost u odnosu na pojedinačne tretmane.

Opšti zaključak ove disertacije je da RBV i TR smanjuju neuroinflamaciju uglavnom zahvaljujući svom citotoksičnom dejstvu na aktiviranu mikrogliju, ali takođe utiču i na promenu morfologije ovih ćelija u smislu vraćanja ka manje aktiviranom stanju i inhibiraju jedan od ključnih proinflamatornih puteva koji se odvija preko NF- κ B. Dobijeni rezultati doprinose sticanju potpunijeg uvida u efekte i mehanizme delovanja RBV i TR unutar CNS-a u uslovima inflamacije, čime se otvara mogućnost njihove primene kao potencijalnih terapeutika u tretmanu multiple skleroze i drugih neuroloških poremećaja čija je patologija povezana sa prekomerenom i hroničnom aktivacijom mikroglije.

7. LITERATURA

- ▶ Abd-el-Basset E, Fedoroff S. Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res.* 1995, 41(2):222-37.
- ▶ Abd-El-Basset EM, Prashanth J, Ananth Lakshmi KV. Up-regulation of cytoskeletal proteins in activated microglia. *Med Princ Pract.* 2004, 13(6):325-33.
- ▶ Abd-El-Basset, E. Bacterial Endotoxin Induces Changes in the Organization and Expression of Actin and Modulation of the Cell Membrane of Microglia. *Med Princ Prac* 2000, 9(2), 81-90.
- ▶ Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Ichikawa H. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1091:151-69.
- ▶ Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.* 2005, 1056:218-33.
- ▶ Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007, 10(12):1538-43.
- ▶ Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy. *Am J Pathol.* 1998, 153(3):801-13.
- ▶ Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK, Hafler DA. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science.* 2007, 318(5853):1141-3.
- ▶ Andersson A, Covacu R, Sunnemark D, Danilov AI, Dal Bianco A, Khademi M, Wallström E, Lobell A, Brundin L, Lassmann H, Harris RA. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. *J Leukoc Biol.* 2008, 84(5):1248-55.
- ▶ Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007, 2(4):297-312.
- ▶ 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(11):1116-22.

- ▶▶ Arulampalam V, Kolosenko I, Hjortsberg L, Björklund AC, Grandér D, Tamm KP. Activation of STAT1 is required for interferon-alpha-mediated cell death. *Exp Cell Res.* 2011, 317(1):9-19.
- ▶▶ Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, Doe PP, De Bernardi MA, Brooker G, Mocchetti I. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci.* 2001, 21(9):3104-12.
- ▶▶ Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1991, 1072(1):63-80.
- ▶▶ Barton CH, Whitehead SH, Blackwell JM. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol Med.* 1995, 1(3):267-79.
- ▶▶ Bauer J, Berkenbosch F, Van Dam AM, Dijkstra CD. Demonstration of interleukin-1 beta in Lewis rat brain during experimental allergic encephalomyelitis by immunocytochemistry at the light and ultrastructural level. *J Neuroimmunol.* 1993, 48(1):13-21.
- ▶▶ Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 1994, 38(4):365-75.
- ▶▶ Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 1997, 138(9):3666-76.
- ▶▶ Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ.* 2005, 12(5):473-81.
- ▶▶ Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.* 1997, 69:31-75.
- ▶▶ Bertolotto A, Agresti C, Castello A, Manzardo E, Riccio A. 5D4 keratan sulfate epitope identifies a subset of ramified microglia in normal central nervous system parenchyma. *J Neuroimmunol.* 1998, 85(1):69-77.
- ▶▶ Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968, 85(2):145-57.
- ▶▶ Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007, 8(1):57-69.
- ▶▶ Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992, 587(2):250-6.
- ▶▶ Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat.* 1991, 175:229-36.

- ▶▶ Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M, Saper CB. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91(24):11393-7.
- ▶▶ Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem*. 1996, 66(2):733-9.
- ▶▶ Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 2001, 11(3):297-305.
- ▶▶ Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002, 61(11):1013-21.
- ▶▶ Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol*. 1999, 163(7):3963-8.
- ▶▶ Carney DN, Ahluwalia GS, Jayaram HN, Cooney DA, Johns DG. Relationships between the cytotoxicity of tiazofurin and its metabolism by cultured human lung cancer cells. *J Clin Invest*. 1985, 75(1):175-82.
- ▶▶ Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103(20):7895-900.
- ▶▶ Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007, 53(2):344-54.
- ▶▶ Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun*. 1995, 9(4):355-65.
- ▶▶ Chen L, Pankiewicz KW. Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2007, 10(4):403-12.
- ▶▶ Chik CL, Li B, Negishi T, Karpinski E, Ho AK. Ceramide inhibits L-type calcium channel currents in rat pinealocytes. *Endocrinology*. 1999, 140(12):5682-90.
- ▶▶ Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995, 81(4):505-12.
- ▶▶ Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, Kim SS, Kim YS, Joh TH. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia*. 2006, 53(1):92-102.

- ▶▶ Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM. Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(7):3531-6.
- ▶▶ Colombo G, Lorenzini L, Zironi E, Galligioni V, Sonvico F, Balducci AG, Pagliuca G, Giuliani A, Calzà L, Scagliarini A. Brain distribution of ribavirin after intranasal administration. *Antiviral Res*. 2011, 92(3):408-14.
- ▶▶ Colovic M, Sefer D, Bogdanovic A, Suvajdzic N, Jankovic G, Atkinson HD, Milenkovic P. In vitro sensitivity of hematopoietic progenitors to tiazofurin in refractory acute myeloid leukemia and in the blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 2003, 195(2):153-9.
- ▶▶ Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009, 4(4):399-418.
- ▶▶ Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006, 65(3):199-203.
- ▶▶ Costero J. Estudio del comportamiento de la microglia cultivada *in vitro*. Datos concernientes a su histogenesis. *Mem R Soc Cien Hist Nat*. 1930, 14: 125-82.
- ▶▶ Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. 2000, 6(12):1375-9.
- ▶▶ Cua DJ, Hutchins B, LaFace DM, Stohlman SA, Coffman RL. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2001, 166(1):602-8.
- ▶▶ Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003, 421(6924):744-8.
- ▶▶ Cunnick JM, Meng S, Ren Y, Desponts C, Wang HG, Djeu JY, Wu J. Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *J Biol Chem*. 2002, 277(11):9498-504.
- ▶▶ Damaraju VL, Visser F, Zhang J, Mowles D, Ng AM, Young JD, Jayaram HN, Cass CE. Role of human nucleoside transporters in the cellular uptake of two inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and benzamide riboside. *Mol Pharmacol*. 2005, 67(1):273-9.
- ▶▶ Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci*. 2005, 8(6):752-8.

- ▶▶ Davis CN, Tabarean I, Gaidarova S, Behrens MM, Bartfai T. IL-1 β induces a MyD88-dependent and ceramide-mediated activation of Src in anterior hypothalamic neurons. *J Neurochem.* 2006, 98(5):1379-89.
- ▶▶ 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(5):1209-20.
- ▶▶ Del Rio-Hortega P. Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber. 1932, pp. 482-534.
- ▶▶ Dietrich WD, Busto R, Bethea JR. Postischemic hypothermia and IL-10 treatment provide long-lasting neuroprotection of CA1 hippocampus following transient global ischemia in rats. *Exp Neurol.* 1999, 158(2):444-50.
- ▶▶ Dimitrijević M, Marković BM, Laban O, Janković BD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in offspring of DA and Wistar rats following immunization of mother with encephalitogen. *J Neuroimmunol.* 1995, 58(1):43-50.
- ▶▶ Ding M, Zhang M, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Voskuhl RR. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol.* 1998, 160(6):2560-4.
- ▶▶ Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999, 19(6):563-73.
- ▶▶ Drechsel DN, Kirschner MW. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol.* 1994, 4(12):1053-61.
- ▶▶ Eder C, Klee R, Heinemann U. Involvement of stretch-activated Cl⁻ channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci.* 1998, 18(18):7127-37.
- ▶▶ Endres CJ, Moss AM, Govindarajan R, Choi DS, Unadkat JD. The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1^{-/-} mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, 331(1):287-96.
- ▶▶ Eskes C, Juillerat-Jeanneret L, Leuba G, Honegger P, Monnet-Tschudi F. Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. *J Neurosci Res.* 2003, 71(4):583-90.

- ▶▶ Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1998, 28(7):2178-87.
- ▶▶ Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005, 436(7053):967-72.
- ▶▶ Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991, 147(11):3815-22.
- ▶▶ Franchetti P, Cappellacci L, Grifantini M. IMP dehydrogenase as a target of antitumor and antiviral chemotherapy. *Farmacol.* 1996, 51(7):457-69.
- ▶▶ Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006, 354(9):942-55.
- ▶▶ Fukuchi Y, Furuhata T, Hashizume M, Iikura M, Chiba K. Characterization of ribavirin uptake systems in human hepatocytes. *J Hepatol.* 2010, 52(4):486-92.
- ▶▶ Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007, 28(1):12-8.
- ▶▶ Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010, 221(1-2):7-14.
- ▶▶ Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med.* 1995, 1(7):795-805.
- ▶▶ Gilbert BE, Wyde PR. Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988, 32(1):117-21.
- ▶▶ Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci.* 1986, 6(8):2163-78.
- ▶▶ Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci.* 1988, 8(7):2485-90.
- ▶▶ Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010, 140(6):918-34.
- ▶▶ Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009, 9(6):393-407.
- ▶▶ Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* 2011, 585(23):3798-805.

- ▶▶ Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2008, 18(1):86-95.
- ▶▶ Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995, 83(5):793-802.
- ▶▶ Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci.* 2000, 12(7):2265-72.
- ▶▶ Guicciardi ME, Gores GJ. AIP1: a new player in TNF signaling. *J Clin Invest.* 2003, 111(12):1813-5.
- ▶▶ Gustin JA, Ozes ON, Akca H, Pincheira R, Mayo LD, Li Q, Guzman JR, Korgaonkar CK, Donner DB. Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 2004, 279(3):1615-20.
- ▶▶ Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007, 10(11):1387-94.
- ▶▶ Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002, 40(2):140-55.
- ▶▶ Happ MP, Wettstein P, Dietzschold B, Heber-Katz E. Genetic control of the development of experimental allergic encephalomyelitis in rats. Separation of MHC and non-MHC gene effects. *J Immunol.* 1988, 141(5):1489-94.
- ▶▶ Hensley K, Floyd RA, Gordon B, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, Williamson K. Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2002, 82(2):365-74.
- ▶▶ Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000, 19(21):2548-56.
- ▶▶ Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, Bernardo K, Krönke M, Falk W. Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J Biol Chem.* 1997, 272(44):27730-6.
- ▶▶ Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, Champion JM, Sarker AB, Bobroski L, Farber JL, Akaike T, Maeda H, Koprowski H.

Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(6):2528-33.

▶ Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y, Kimura H, Shigeta S, Suzuki H. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48(12):4631-5.

▶ Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, Acosta-Saltos A, Wallace A, Blight K, Buckley SM, Peebles D, Heuer H, Waddington SN, Raivich G. Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia*. 2010, 58(1):11-28.

▶ Hu S, Peterson PK, Chao CC. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem Int*. 1997, 30(4-5):427-31.

▶ Huggins JW, Robins RK, Canonico PG. Synergistic antiviral effects of ribavirin and the C-nucleoside analogs tiazofurin and selenazofurin against togaviruses, bunyaviruses, and arenaviruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984, 26(4):476-80.

▶ Hwang I, Ha D, Ahn G, Park E, Joo H, Jee Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis: association with mutual regulation of RelA (p65)/NF- κ B and phospho-I κ B in the CNS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011, 411(2):464-70.

▶ Hwang J, Zheng LT, Ock J, Lee MG, Kim SH, Lee HW, Lee WH, Park HC, Suk K. Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. 2008, 55(5):826-34.

▶ Imai Y, Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*. 2002, 40(2):164-74.

▶ Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002, 13(4-5):357-68.

▶ Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI, 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(1-2):103-15.

▶ Issazadeh S, Ljungdahl A, Höjeberg B, Mustafa M, Olsson T. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10,

interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J Neuroimmunol.* 1995, 61(2):205-12.

▶▶ Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke.* 2001, 32(5):1208-15.

▶▶ Jack CS, Arbour N, Blain M, Meier UC, Prat A, Antel JP. Th1 polarization of CD4+ T cells by Toll-like receptor 3-activated human microglia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007, 66(9):848-59.

▶▶ Jackson RC, Weber G, Morris HP. IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature.* 1975, 256(5515):331-3.

▶▶ Jain KK. Evaluation of mitoxantrone for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000, 9(5):1139-49.

▶▶ Janać B, Pesić V, Veskov R, Ristić S, Tasić J, Piperski V, Ruzdijić S, Jokanović M, Stukalov P, Rakić L. The effects of tiazofurin on basal and amphetamine-induced motor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004, 77(3):575-82.

▶▶ Jayaram HN, Dion RL, Glazer RI, Johns DG, Robins RK, Srivastava PC, Cooney DA. Initial studies on the mechanism of action of a new oncolytic thiazole nucleoside, 2-beta-D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide (NSC 286193). *Biochem Pharmacol.* 1982, 31(14):2371-80.

▶▶ Jayaram HN, Murayama K, Pillwein K, Zhen W, Weber G. Schedule-dependent synergistic action of tiazofurin and dipyrindamole on hepatoma 3924A cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992, 31(2):93-6.

▶▶ Jenab S, Quinones-Jenab V. The effects of interleukin-6, leukemia inhibitory factor and interferon-gamma on STAT DNA binding and c-fos mRNA levels in cortical astrocytes and C6 glioma cells. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002, 23(4):325-8.

▶▶ Kalla R, Bohatschek M, Kloss CU, Krol J, Von Maltzan X, Raivich G. Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia.* 2003, 41(1):50-63.

▶▶ Kaneko YS, Nakashima A, Mori K, Nagatsu T, Nagatsu I, Ota A. Lipopolysaccharide extends the lifespan of mouse primary-cultured microglia. *Brain Res.* 2009, 1279:9-20.

▶▶ Kast RE. Ribavirin in cancer immunotherapies: controlling nitric oxide augments cytotoxic lymphocyte function. *Neoplasia.* 2003, 5(1):3-8.

- ▶▶ Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol.* 2008, 194(1-2):54-61.
- ▶▶ Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011, 91(2):461-553.
- ▶▶ Kitada M, Rowitch DH. Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord. *Glia.* 2006, 54(1):35-46.
- ▶▶ 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(2):163-8.
- ▶▶ Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab.* 2004, 5(1):63-84.
- ▶▶ Körner H, Riminton DS, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD. Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. *J Exp Med.* 1997, 186(9):1585-90.
- ▶▶ Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol.* 2005, 162(1-2):71-80.
- ▶▶ Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996, 19(8):312-8.
- ▶▶ Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005, 128(Pt 11):2705-12.
- ▶▶ Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005, 48(2):196-206.
- ▶▶ Laliberté J, Yee A, Xiong Y, Mitchell BS. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood.* 1998, 91(8):2896-904.
- ▶▶ Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001, 7(3):115-21.

- ▶▶ Lassmann H, Ransohoff RM. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol.* 2004, 25(3):132-7.
- ▶▶ Lavrnja I, Savic D, Bjelobaba I, Dacic S, Bozic I, Parabucki A, Nedeljkovic N, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M. The effect of ribavirin on reactive astrogliosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Sci.* 2012, 119(3):221-32.
- ▶▶ Lavrnja I, Stojkov D, Bjelobaba I, Pekovic S, Dacic S, Nedeljkovic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Rakic L, Stojiljkovic M. Ribavirin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats and modulates cytokine production. *Int Immunopharmacol.* 2008, 8(9):1282-90.
- ▶▶ Lavrnja I, Stojkov D, Peković S, Subasic S, Mostarica-Stojković M, Stosic-Grujčić S, Nedeljković N, Medic-Mijacević L, Rakić L, Stojiljkovi M. Combination of nucleoside analogues tiazofurin and ribavirin downregulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005, 1048:392-5.
- ▶▶ Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990, 39(1):151-70.
- ▶▶ Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol.* 1993, 150(7):2659-67.
- ▶▶ Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 2002, 8(3):240-6.
- ▶▶ Li JM, Yang Y, Zhu P, Zheng F, Gong FL, Mei YW. Mitoxantrone exerts both cytotoxic and immunoregulatory effects on activated microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012, 34(1):36-41.
- ▶▶ Lieb K, Engels S, Fiebich BL. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int.* 2003, 42(2):131-7.
- ▶▶ Lim JY, Won TJ, Hwang BY, Kim HR, Hwang KW, Sul D, Park SY. The new diterpene isodojaponin D inhibited LPS-induced microglial activation through NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2010, 642(1-3):10-8.
- ▶▶ Lin W, Lin Y. Interferon- γ inhibits central nervous system myelination through both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways. *J Neurosci Res.* 2010, 88(12):2569-77.
- ▶▶ Liou GI, Auchampach JA, Hillard CJ, Zhu G, Yousufzai B, Mian S, Khan S, Khalifa Y. Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative

nucleoside transporter and A_{2A} adenosine receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008, 49(12):5526-31.

▶ 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(1):78-83.

▶ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001, 25(4):402-8.

▶ LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 2008, 11(1-2):32-50.

▶ Lu Y, Zhu L, Gao YJ. Pain-related aversion induces astrocytic reaction and proinflammatory cytokine expression in the anterior cingulate cortex in rats. *Brain Res Bull.* 2011, 84(2):178-82.

▶ Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Kontinen YT. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2003, 60(11):2334-46.

▶ Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 1994, 8(13):1003-11.

▶ Maisch B, Herzum M, Hufnagel G, Bethge C, Schönian U. Immunosuppressive treatment for myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 1995, 16 Suppl O:153-61.

▶ Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007, 129(7):1261-74.

▶ Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Raguet H, Stock K, Sliwa M, Lehmann S, Kälin R, van Rooijen N, Holmbeck K, Heppner FL, Kiwit J, Matyash V, Lehnardt S, Kaminska B, Glass R, Kettenmann H. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106(30):12530-5.

▶ Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci.* 2001, 21(18):7046-52.

▶ Mendel I, Katz A, Kozak N, Ben-Nun A, Revel M. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur J Immunol.* 1998, 28(5):1727-37.

-
- ▶▶ Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 1996, 19(8):331-8.
- ▶▶ Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol.* 1993, 151(4):2132-41.
- ▶▶ Michaelis M, Michaelis R, Suhan T, Schmidt H, Mohamed A, Doerr HW, Cinatl J Jr. Ribavirin inhibits angiogenesis by tetrahydrobiopterin depletion. *FASEB J.* 2007, 21(1):81-7.
- ▶▶ Milicevic I, Pekovic S, Subasic S, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Medic-Mijacevic L, Pejanovic V, Rakic L, Stojiljkovic M. Ribavirin reduces clinical signs and pathological changes of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats. *J Neurosci Res.* 2003, 72(2):268-78.
- ▶▶ 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.* 2006, 84(2):379-88.
- ▶▶ Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Guaza C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci.* 2001, 13(3):493-502.
- ▶▶ Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005, 118(Pt 20):4589-92.
- ▶▶ Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.* 1992, 52(2):258-61.
- ▶▶ Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience.* 2009, 158(3):1030-8.
- ▶▶ Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol.* 2010, 225(1):24-8.
- ▶▶ Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* 2010, 6(2):e1000661.
- ▶▶ Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 2006, 109(1-2):198-209.

- ▶▶ Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005, 308(5726):1314-8.
- ▶▶ Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol*. 1998, 160(7):3487-93.
- ▶▶ Ogbomo H, Michaelis M, Altenbrandt B, Doerr HW, Cinatl J Jr. A novel immunomodulatory mechanism of ribavirin in suppressing natural killer cell function. *Biochem Pharmacol*. 2010, 79(2):188-97.
- ▶▶ Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glucoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1999, 101(2):188-96.
- ▶▶ Olah E, Kote Z, Natsumeda Y, Yamaji Y, Jarai G, Lapis E, Financsek I, Weber G. Down-regulation of c-myc and c-Ha-ras gene expression by tiazofurin in rat hepatoma cells. *Cancer Biochem Biophys*. 1990, 11(2):107-17.
- ▶▶ Pankiewicz KW. Inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase as potential chemo therapeutic agents. *Exp Opin Ther Patents* . 1999, 9:55-65.
- ▶▶ Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 1997, 75(3):174-86.
- ▶▶ Pender MP. Experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Autoimmune Neurological Disease*, edited by Pender MP, McCombe PA. Cambridge: Cambridge University Press. 1995, pp. 26-88.
- ▶▶ Perona R, Montaner S, Saniger L, Sánchez-Pérez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*. 1997, 11(4):463-75.
- ▶▶ Piao WH, Wong R, Bai XF, Huang J, Campagnolo DI, Dorr RT, Vollmer TL, Shi FD. Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007, 179(11):7415-23.
- ▶▶ Pillwein K, Schuchter K, Ressaín G, Gharehbaghi K, Knoflach A, Cermak B, Jayaram HN, Szalay SM, Szekeres T, Chiba P. Cytotoxicity, differentiating activity and metabolism of tiazofurin in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer*. 1993, 55(1):92-5.

- ▶▶ Polazzi E, Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol.* 2010, 92(3):293-315.
- ▶▶ Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol.* 2006, 176(3):1402-10.
- ▶▶ Qin H, Roberts KL, Niyongere SA, Cong Y, Elson CO, Benveniste EN. Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia. *J Immunol.* 2007, 179(9):5966-76.
- ▶▶ Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004, 46(3):261-81.
- ▶▶ Rasmussen S, Wang Y, Kivisäkk P, Bronson RT, Meyer M, Imitola J, Khoury SJ. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2007, 130(Pt 11):2816-29.
- ▶▶ Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science.* 1995, 269(5229):1424-7.
- ▶▶ Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain.* 1993, 116 (Pt 1):117-34.
- ▶▶ Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol.* 1998, 96(2):172-8.
- ▶▶ Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2011, 11(11):775-87.
- ▶▶ Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell.* 2009, 137(1):47-59.
- ▶▶ Samardzic T, Stosic-Grujicic S, Raicevic N, Trajkovic V. Tumor cell-specific inhibition of inducible nitric oxide synthase activation by tiazofurin. *Int Immunopharmacol.* 2001, 1(4):795-802.
- ▶▶ SamoiloVA EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 1998, 161(12):6480-6.

- ▶▶ Savić D, Lavrnja I, Dacić S, Bjelobaba I, Nedeljković N, Peković S, Stojiljković M. Combined treatment with ribavirin and tiazofurin attenuates response of glial cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Biol Sci.* 2012, 64: 843-850.
- ▶▶ Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem.* 1999, 72(4):1466-71.
- ▶▶ Schiemann WP, Bartoe JL, Nathanson NM. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J Biol Chem.* 1997, 272(26):16631-6.
- ▶▶ Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2001, 14(3):463-73.
- ▶▶ Selmaj K, Raine CS, Cross AH. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol.* 1991, 30(5):694-700.
- ▶▶ Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 1988, 23(4):339-46.
- ▶▶ Serafini B, Magliozzi R, Rosicarelli B, Reynolds R, Zheng TS, Aloisi F. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008, 67(12):1137-48.
- ▶▶ Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle.* 2003, 2(6):550-2.
- ▶▶ Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia.* 1994, 12(4):245-58.
- ▶▶ Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990, 82(13):1107-12.
- ▶▶ Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol.* 2005, 12(6):545-51.

- ▶▶ Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2012, 87(1):10-20.
- ▶▶ Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 1999, 9(1):69-92.
- ▶▶ Solbrig MV, Schlager R, Briese T, Horscroft N, Lipkin WI. Neuroprotection and reduced proliferation of microglia in ribavirin-treated bornavirus-infected rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002, 46(7):2287-91.
- ▶▶ Soler C, García-Manteiga J, Valdés R, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A, Felipe A. Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J.* 2001, 15(11):1979-88.
- ▶▶ Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, Cargnel A, Benhamou Y, Peters M, Mauss S, Bräu N, Hatzakis A, Pol S, Rockstroh J. Care of patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. *AIDS.* 2007, 21(9):1073-89.
- ▶▶ Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23:683-747.
- ▶▶ Sriram S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination. *J Neuroimmunol.* 2011, 239(1-2):13-20.
- ▶▶ Staykova MA, Paridaen JT, Cowden WB, Willenborg DO. Nitric oxide contributes to resistance of the Brown Norway rat to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2005, 166(1):147-57.
- ▶▶ Stojkov D, Lavrnja I, Pekovic S, Dacic S, Bjelobaba I, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Jovanovic S, Nedeljkovic N, Rakic L, Stojiljkovic M. Therapeutic effects of combined treatment with ribavirin and tiazofurin on experimental autoimmune encephalomyelitis development: clinical and histopathological evaluation. *J Neurol Sci.* 2008, 267(1-2):76-85.
- ▶▶ Stojkov D, Lavrnja I, Subasic S, Bjelobaba I, Pekovic S, Gadjanski I, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Rakic L, Stojiljkovic M. Therapeutic effects of nucleoside analogues on experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats. *Arch Biol Sci.* 2006, 58:13-20.
- ▶▶ 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(1):49-55.

- ▶▶ Stosic-Grujicic S, Savic-Radojevic A, Maksimovic-Ivanic D, Markovic M, Bumbasirevic V, Ramic Z, Mostarica-Stojkovic M. Down-regulation of experimental allergic encephalomyelitis in DA rats by tiazofurin. *J Neuroimmunol.* 2002, 130(1-2):66-77.
- ▶▶ Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol.* 1987, 16(2):249-60.
- ▶▶ Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 1999, 57(6):563-81.
- ▶▶ Strle K, Zhou JH, Broussard SR, Venters HD, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. IL-10 promotes survival of microglia without activating Akt. *J Neuroimmunol.* 2002, 122(1-2):9-19.
- ▶▶ Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.* 1991, 545(1-2):301-6.
- ▶▶ Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010, 68(10):930-41.
- ▶▶ Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol.* 2003, 53(5):588-95.
- ▶▶ Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1998, 18(7):4109-17.
- ▶▶ Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antivir Chem Chemother.* 2001, 12(5):261-72.
- ▶▶ Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res Sep.* 1999, 34(4):207-15.
- ▶▶ Tímár J, Tóvári J, Pogány G, Ladányi A, Paku S, Rsó E, Bocsi J, Jeney A, Lapis K. The antimetabolite Tiazofurin (TR) inhibits glycoconjugate biosynthesis and invasiveness of tumour cells. *Eur J Cancer.* 1996, 32A(1):152-9.
- ▶▶ Titelbaum DS, Degenhardt A, Kinkel RP. Anti-tumor necrosis factor alpha-associated multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005, 26(6):1548-50.

- ▶▶ Tóvári J, Bocsi J, Ladányi A, Lapis K, Timár J. The antitumor effect of Tiazofurin (TR) consists of anti-proliferative and anti-invasive elements. *Anticancer Res.* 1996, 16(6A):3307-12.
- ▶▶ Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008, 31:247-69.
- ▶▶ Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia.* 2007, 55(4):360-8.
- ▶▶ Vallée S, Fouchier F, Braguer D, Marvaldi J, Champion S. Ribavirin-induced resistance to heat shock, inhibition of the Ras-Raf-1 pathway and arrest in G(1). *Eur J Pharmacol.* 2000, 404(1-2):49-62.
- ▶▶ Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 1997, 21(1):2-21.
- ▶▶ Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001, 33(1):19-32.
- ▶▶ Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009, 29(13):3974-80.
- ▶▶ Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF- κ B and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation.* 2011, 8:95.
- ▶▶ Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010, 3(105):cm1.
- ▶▶ Weber G, Prajda N, Abonyi M, Look KY, Tricot G. Tiazofurin: molecular and clinical action. *Anticancer Res.* 1996a, 16(6A):3313-22.
- ▶▶ Weber G, Prajda N, Yang H, Yeh YA, Shen F, Singhal RL, Herenyiova M, Look KY. Current issues in the regulation of signal transduction. *Adv Enzyme Regul.* 1996, 36:33-55.
- ▶▶ Weber G, Shen F, Orbán TI, Kökeny S, Olah E. Targeting signal transduction. *Adv Enzyme Regul.* 2003, 43:47-56.
- ▶▶ Weber G. Down-regulation of increased signal transduction capacity in human cancer cells. *Adv Enzyme Regul.* 2005, 45:37-51.

-
- ▶▶ Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008, 255 Suppl 1:3-11.
 - ▶▶ Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol*. 2009, 65(3):239-48.
 - ▶▶ Willenborg DO, Staykova MA, Cowden WB. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. *J Neuroimmunol*. 1999, 100(1-2):21-35.
 - ▶▶ Wollmer MA, Lucius R, Wilms H, Held-Feindt J, Sievers J, Mentlein R. ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol*. 2001, 115(1-2):19-27.
 - ▶▶ Yamada Y, Natsumeda Y, Weber G. Action of the active metabolites of tiazofurin and ribavirin on purified IMP dehydrogenase. *Biochemistry*. 1988, 27(6):2193-6.
 - ▶▶ Yamamoto T, Kuniki K, Takekuma Y, Hirano T, Iseki K, Sugawara M. Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol*. 2007, 557(1):1-8.
 - ▶▶ Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. *J Biol Chem*. 2001, 276(29):27432-40.
 - ▶▶ Zimmermann AG, Gu JJ, Laliberté J, Mitchell BS. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998, 61:181-209.

BIOGRAFIJA AUTORA

Danijela Savić je rođena 11.07.1976. godine u Pančevu, a osnovnu i srednju školu je završila u Smederevu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1995. godine, a završila 2002. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa opštim uspehom 9,51 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistraske studije upisala je 2003. godine na smeru Neurofiziologija, a akademski naziv magistra bioloških nauka stekla je 2005. godine. Od 2003. godine je zaposlena na Odeljenju za Neurobiologiju, u Laboratoriji za neurohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, a 2006. započela je rad na doktorskoj disertaciji.

Naučno istraživački rad Danijele Savić realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2003 – 2005. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Neurohemijski i neurofiziološki mehanizmi oporavka nakon oštećenja centralnog nervnog sistema“ (projekat 1647, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). U periodu od 2006 – 2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Interakcija glijne i neurona u procesu oporavka nakon oštećenja centralnog nervnog sistema“ (projekat 143005, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). Od 2011. godine učesnik je projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). U okviru ovog projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske teze pod mentorstvom dr Sanje Peković i prof dr Nadežde Nedeljković. Dobila je istraživačku stipendiju od strane Evropskog udruženja za nauku i tehnologiju i na osnovu toga usavršavala se na Institutu za farmakologiju u laboratoriji prof Tomasa Herdegena u Kilu u Nemačkoj. Takođe, učestvuje u realizaciji bilateralnog DAAD projekta sa Nemačkom („Uloga ektonukleotidaza u rodnim razlikama i hormonima indukovanoj neuroprotekciji u eksperimentalnim modelima multiple skleroze“, 2010 – 2012).

Koautor je 14 radova u međunarodnim vodećim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih saopštenja.