

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Bojan Z. Jevtić

Uticaj različitih ekstrakata krastavca (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) na encefalitogeni potencijal T limfocita pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

-doktorska disertacija-

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Bojan Z. Jevtić

**Effects of different Cucumber extracts
(*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) on the
encephalitogenic potential of T lymphocytes
in experimental autoimmune
encephalomyelitis**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2018.

MENTORI

dr Gordana Timotijević, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Gordana Timotijević, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Radović, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Miljković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Ćelijski i molekularni mehanizmi oporavka pacova od eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa“ (Br. 173035, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije).

This doctoral dissertation was performed in the Laboratory for Plant Molecular Biology of the Institute for Molecular Genetics and Genetic Engineering and Department of Immunology of the Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, within the project entitled: “ Cellular and molecular mechanisms of recovery of rats from experimental autoimmune encephalomyelitis“; (No.173035, Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia).

Zahvaljujem se **dr Gordani Timotijević**, mom mentoru, na pomoći, zalaganju i savetima tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala na uloženom vremenu, trudu i uvek prijateljskoj atmosferi.

Posebnu zahvalnost dugujem **dr Đorđu Miljkoviću** na prilici da radim i da se usavršavam iz oblasti imunologije, počev od svog završnog rada, zatim master rada i sada do doktorske disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, prenetom znanju i iskustvu. Hvala na vođenju, strpljivosti, razumevanju i bezrezervnoj podršci tokom ovog vremena.

Hvala,

prof. dr Svetlani Radović, na ukazanom vremenu, ažurnosti i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

Suzani i Nedi, na ogromnoj pomoći u eksperimentalnom radu, podršci, savetima, a pre svega prijateljstvu.

dr Miljani Momčilović, na pomoći i savetima od samih početaka rada u laboratoriji.

dr Danijeli Mišić, **dr Urošu Gašiću** i **Jeleni Despotović** na aktivnom učešću u eksperimentima ove doktorske disertacije.

Mojim dragim kolegama **Ivani**, **Tamari**, **Milici**, **Miri**, **Ivanu**, **Milici L.**, **Dragici**, **dr Stanislavi Stošić-Grujičić** i **prof. dr Mariji Mostarici-Stojković** na pomoći, sugestijama i uvek dobroj, drugarskoj atmosferi u našem malom kutku.

Svim članovima laboratorije 66 na kolegijalnosti, super saradnji i druženju.

Članovima laboratorije za molekularnu biologiju biljaka na uvek prijatnoj atmosferi.

Mojim najdražim „GR“ članovima **Sofiji**, **Anji**, **Ljupki**, **Sanji**, **Marku** i **Sonji** na prijateljstvu, podršci, zajedničkim ručkovima i vremenu.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na ljubavi, razumevanju i podršci.

Uticaj različitih ekstrakata krastavca (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) na encefalitogeni potencijal T limfocita pacova u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

Sažetak

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je model multiple skleroze (MS), hronične inflamatorne bolesti centralnog nervnog sistema (CNS). Osnovne patogene populacije u EAE su efektorski T limfociti koji proizvode interferon- γ (Th1) ili interleukin-17 (Th17) i aktivirani makrofagi koji dovode do oštećenja CNS. Imajući u vidu da krastavac (*Cucumis sativus*) predstavlja bogat izvor sekundarnih metabolita kao što su polifenoli i kukurbitacini, u ovoj studiji je po prvi put ispitivano dejstvo različitih ekstrakata krastavca na encefalitogeni potencijal T limfocita, efektorske funkcije makrofaga i antigen-prezentujuću aktivnost dendritskih ćelija (DĆ). Rezultati su pokazali da ekstrakt lista krastavca (ELK) ostvaruje najpotentnije dejstvo, inhibirajući produkciju IFN- γ i IL-17 od strane encefalitogenih T limfocita, modulišući signalne puteve Nf- κ B i p38 (MAPK). Pored toga, ELK je ostvario inhibitorno dejstvo na efektorske funkcije makrofaga i antigen-prezentujuću aktivnost DĆ u koncentracijama koje nisu pokazale citotoksičnost na embrione zebrice (*Danio rerio*) *in vivo*. Dalje, ELK je uspešno inhibirao encefalitogene T limfocite nakon *in vivo* primene u EAE. Kvantitativna i kvalitativna analiza ELK metodom masene spektrometrije potvrdila je prisustvo 37 različitih jedinjenja od kojih su kukurbitacini bili najzastupljenija jedinjenja. Shodno tome, ispitana su i imunomodulacijska dejstva kukurbitacina B i kukurbitacina E na glavnim imunskim ćelijama uključenim u patogenezu EAE. Ova ispitivanja su potvrdila dejstva ELK, sugerišući da su kukurbitacini, kao glavni konstituenti ovog ekstrakta, barem delimično odgovorni za ostvarena dejstva ELK. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da ekstrakt lista krastavca i kukurbitacini ostvaruju snažne anti-encefalitogene efekte u modelu EAE i ukazuju na važnost dodatnih istraživanja u cilju pronalazjenja odgovarajućih tretmana autoimunosti CNS.

Ključne reči: eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, encefalitogene T ćelije, ekstrakt lista krastavca, kukurbitacini

Naučna oblast: Biologija, Imunologija

Effects of different Cucumber extracts (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) on the encephalitogenic potential of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of multiple sclerosis (MS), a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS). T lymphocytes, which produce interferon- γ (Th1) or interleukin-17 (Th17), and activated macrophages, that lead to CNS damage, are the major pathogenic cell populations in EAE. Having in mind that cucumber (*Cucumis sativus*) is a rich source of secondary metabolites such as polyphenols and cucurbitacins, in this study, for the first time, the effects of various cucumber extracts were investigated on encephalitogenic T lymphocytes, effector function of macrophages and antigen-presenting activities of dendritic cells (DC). The results show that cucumber leaf extract (CLE) expresses the most potent effect by inhibiting the production of IFN- γ and IL-17 in encephalitogenic T lymphocytes, through modulation of signaling pathways Nf- κ B and p38 (MAPK). Additionally, CLE imposes an inhibitory effect on the effector functions of macrophages and antigen-presenting activity of DC in concentrations that do not show cytotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) *in vivo*. Also, CLE inhibits generation of encephalitogenic cells *in vivo*. Phytochemical analysis of CLE, characterized by mass spectrometry, confirmed the presence of 37 different compounds, among which cucurbitacins were the most abundant compounds. Hence, the immunomodulatory effects of cucurbitacin B and cucurbitacin E were also examined on the major immune cells involved in EAE pathogenesis. The obtained results confirm the effects of CLE, suggesting that cucurbitacins are, at least partially, responsible for its effects. The results of this doctoral dissertation indicate that the cucumber leaf extract and its major constituents cucurbitacins have anti-encephalitogenic effects in the EAE model. Moreover, they suggest the importance of additional research towards novel highly efficient CNS autoimmunity treatments.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, encephalitogenic T cells, cucumber leaf extract, cucurbitacins

Research area: Biology, Immunology

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Multipla skleroza, etiologija i rizici.....	2
1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis	6
1.3. Imunopatogeneza multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	7
1.4. Terapijski pristupi u multiploj sklerozi	16
1.5. Jedinjenja biljaka kao modulatori imunskog odgovora.....	18
1.6. Biološki aktivna jedinjenja krastavca	19
1.7. Imunomodulacijske osobine kukurbitacina	20
2. Ciljevi	22
3. Materijal i metode	24
3.1. Reagensi i rastvori	25
3.2. Metode uzgajanja biljaka, pripreme i karakterizacije biljnih ekstrakata	27
3.2.1. Uzgajanje biljaka u hidroponici.....	28
3.2.2. Priprema različitih ekstrakata krastavca	28
3.2.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakta lista krastavca.....	31
3.3. Metode indukcije eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	32
3.3.1. Eksperimentalne životinje	33
3.3.2. Imunizacija životinja	33
3.3.3. Primena ekstrakta lista krastavca na pacovima <i>in vivo</i>	33
3.3.4. Evaluacija kliničke slike	33
3.4. Metode izolovanje ćelija i tkiva	34
3.4.1. Izolovanje ćelija drenirajućeg limfnog čvora.....	35
3.4.2. Prečišćavanje CD4 ⁺ T ćelija magnetnom separacijom	35
3.4.3. Izolovanje infiltrata kičmene moždine.....	36
3.4.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka	37
3.4.5. Dobijanje dendritskih ćelija iz matičnih ćelija kostne srži	37
3.4.6. Određivanje broja ćelija	38
3.4.7. Uspostavljanje kulture ćelija	38
3.4.8. Ko-kultivacija dendritskih ćelija sa CD4 ⁺ T limfocitima	39

3.5. Testovi za određivanje funkcija ćelija imunskog sistema	40
3.5.1. Merenje vijabilnosti ćelija testom MTT	41
3.5.2. Merenje vijabilnosti ćelija testom CV	41
3.5.3. Merenje produkcije citokina testom ELISA	42
3.5.4. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula i protočna citofluorimetrija.....	42
3.5.5. Merenje nivoa apoptoze	43
3.5.6. Merenje nivoa fagocitoze.....	43
3.5.7. Merenje produkcije reaktivih vrsta kiseonika	44
3.5.8. Merenje produkcije azot monoksida	44
3.5.9. Metoda reakcije lančanog umnožavanja (PCR).....	44
3.5.9.1. Izolovanje ukupne RNK.....	44
3.5.9.2. Reakcija reverzne transkripcije (RTs).....	45
3.5.9.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	46
3.5.9.4. Prajmeri	47
3.5.10. Metoda Western blot	48
3.5.10.1. Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju.....	48
3.5.10.2. Elektroforeza proteinskih uzoraka na SDS poliakrilamidnom gelu i transfer proteina na polivinildifluoridnu (PVDF) membranu	49
3.5.10.3. Vizuelizacija proteinskih traka i denzitometrijska analiza.....	49
3.6. Test za određivanje toksičnosti u <i>in vivo</i> modelu zebrice	50
3.7. Statistička obrada podataka	51
4. Rezultati	52
4.1. Uporedna analiza imunomodulacijskog efekta različitih ekstrakata lista krastavca na ćelije drenirajućih limfnih čvorova i prečišćene CD4 ⁺ T limfocite <i>in</i> <i>vitro</i>	53
4.2. Uporedna analiza imunomodulacijskog efekta ekstrakata korena, stabla i lista krastavca na ćelije drenirajućih limfnih čvorova <i>in vitro</i>	56

4.3. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na CD4 ⁺ T limfocite <i>in vitro</i>	59
4.4. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na imunske ćelije creva <i>in vitro</i>	62
4.5. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na infiltrate kičmene moždine <i>in vitro</i>	63
4.6. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na makrofage <i>in vitro</i>	64
4.7. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na dendritske ćelije <i>in vitro</i>	67
4.8. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na encefalitogene ćelije <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i>	70
4.9. Efekat ekstrakta lista krastavca na klinički tok eksperimentalnog autoimunuskog encefalomijelitisa	73
4.10. Efekat ekstrakta lista krastavca na razvoj embriona zebrice	74
4.11. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata lista krastavca	75
4.12. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na ćelije drenirajućih limfnih čvorova <i>in vitro</i>	82
4.13. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na prečišćene CD4 ⁺ T limfocite <i>in vitro</i>	84
4.14. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na makrofage <i>in vitro</i>	87
4.15. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na infiltrate kičmene moždine <i>in vitro</i>	91
4.16. Efekat odabranih jedinjenja Kukurbitacina B i Kukurbitacina E na razvoj embriona zebrice	92
5. Diskusija	94
6. Zaključci	107
7. Literatura	109

1. Uvod

1.2. Multipla skleroza, etiologija i rizici

Procenjuje se da oko 2.5 miliona ljudi širom sveta boluje od multiple skleroze (MS), hronične inflamacijske bolesti centralnog nervnog sistema (CNS), koja izaziva ozbiljne motorne i senzorne neurološke disfunkcije. Multipla skleroza je učestalija u ženskoj populaciji i pogađa najčešće mlade odrasle osobe (Compston i Coles, 2008). Bolest se manifestuje na različite načine koji uključuju senzorne, pre svega vizuelne smetnje, motorne disfunkcije, umor, bolove i kognitivne poremećaje (Compston i Coles, 2008). Kliničke manifestacije bolesti su posledica lezija unutar CNS (Kearney i sar., 2015). Ove lezije su glavna odlika MS i nastaju usled infiltracije imunskih ćelija u CNS koju predvode $CD4^+$ T limfociti reaktivni na antigene CNS. Kada dospeju unutar CNS, ove ćelije pokreću inflamaciju, demijelinizaciju, gliozu i degradaciju aksona što dovodi do prekida u prenosu nervnih signala i manifestacije bolesti (Frischer i sar., 2009). Zbog ovakve imunske reaktivnosti koja narušava strukturu i funkcije CNS, multipla skleroza se smatra autoimunskom bolešću, a autoreaktivni $CD4^+$ T limfociti koji reaguju na antigene CNS osnovnom encefalitogenom populacijom imunskih ćelija.

Najčešća forma MS koja se javlja kod više od 85% pacijenata je relapsno-remitentna MS (RRMS). Karakterišu je inicijalne epizode neuroloških disfunkcija koje su praćene periodom remisije i kliničkog oporavka da bi se ciklus relapsa i remisije stalno smenjivao tokom bolesti. Relapsi su povezani sa inflamacijom CNS i demijelinizacijom koje su prepoznatljive na magnetnoj rezonanci kao lezije u beloj masi CNS (Kutzelnigg i Lassmann, 2014). Međutim, poboljšanja tokom svake remisije se smanjuju kako se oštećenja CNS nagomilavaju pa približno 80% pacijenata razvije sekundarnu progresivnu MS nakon 10 – 20 godina od uspostavljene dijagnoze. U sekundarnoj progresivnoj MS inflamacijske lezije više nisu karakteristične, a progresivni tok bolesti je posledica atrofije CNS tj. smanjenja zapremine mozga i gubitka aksona. Svega 10% pacijenata razvije primarno-progresivnu bolest, kod koje se stanje pacijenata konstantno pogoršava bez prisutnih remisija. Pored pobrojanih formi MS, postoje i retke forme kao što je progresivno-relapsna i pedijatrijska bolest, kao i tumefaktivni oblik MS koji uključuje posebno agresivnu formu Marburg MS. Sa druge strane, postoje i benigne forme bolesti, gde tokom dugog niza godina ne dolazi do nastajanja trajnih neuroloških deficita (Dendrou i sar., 2015).

Kako se karakterizacija različitih formi MS vremenom unapređuje, glavni izazov je odrediti da li različite forme bolesti mogu biti klasifikovane kao jedinstvene bolesti i da li bi takav pristup imao uticaja na razumevanje patofizioloških mehanizama i terapijsku primenu (Dendrou i sar., 2015). Dobar primer neophodnosti pravilne klasifikacije bolesti je optički spinalni encefalitis (OSE) koji se smatrao formom multiple skleroze (Lennon i sar., 2004). Međutim, zahvaljujući detaljnom izučavanju patogeneze OSE, utvrđeno je da je ova bolest zapravo posledica imunske reaktivnosti na akvaporin 4 u astrocitima (Lennon i sar., 2005). Takođe, pokazano je da je klasična terapija MS kontraindikovana kod pacijenata obolelih od OSE (Miller i sar., 2008). Pretpostavlja se da će i druge forme MS biti definisane kao posebne bolesti na osnovu specifičnosti njihove etiopatogeneze i da će se zahvaljujući tome unaprediti i njihova terapija.

Tačan uzrok MS još uvek je nepoznat. Takođe, ne zna se da li on varira od pacijenta do pacijenta. Ali ono što se pretpostavlja je da se bolest razvija kod genetički podložnih osoba na slučajan način pod uticajem različitih faktora spoljašnje sredine. Genetičke varijante čine oko 30% rizika za nastanak bolesti, kolika je i verovatnoća da će monozigotni blizanac dobiti ovu bolest ukoliko je drugi već ima. Studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu (GWAS, od eng. Genome-Wide Association Studies) su pokazale da je više od 100 genskih regiona povezano sa MS (Miller i sar., 2008). Uprkos činjenici da faktori spoljašnje sredine većim udelom doprinose riziku nastanka bolesti, malo je urađeno na tom polju iz razloga što je interpretacija uzročnika faktora sredine veoma kompleksna, a ponekad i zbunjujuća kada su u pitanju npr. epidemiološki podaci (Brodin i sar., 2015) (Belbasis i sar., 2015). Bez jasnih faktora spoljašnje sredine koji bi uzrokovali MS i dalje ostaje pitanje da li je pokretač za nastanak bolesti na periferiji ili u samom CNS. U modelu koji podržava stanovište da je pokretač za nastanak MS na periferiji pretpostavka je da autoreaktivne T ćelije koje se aktiviraju na periferiji različitim mehanizmima (molekulska mimikrija (Harkioliaki i sar., 2009) (Münz i sar., 2009) (Olson i sar., 2005), bistandardna aktivacija ili ko-ekspresija T ćelijskog receptora (TCR, od eng. T Cell Receptor) različitih specifičnosti (Ji i sar., 2010)) dospevaju do CNS zajedno sa aktiviranim B ćelijama i monocitima.

Alternativno, događaji u samom CNS mogu da budu pokretač za razvoj bolesti, pri čemu se infiltracija autoreaktivnih limfocita dešava kao sekundarni fenomen. Ovi primarni događaji u CNS bi mogli biti virusna infekcija, neurodegeneracija ili oligodendropatija (Heneka i sar., 2014).

Kada se govori o genetičkim predispozicijama za MS, većina „rizičnih“ gena pripada genima imunskog sistema. Zbog toga, uočeno preklapanje u genskim regionima povezanim sa MS i drugim autoimunskim bolestima nije iznenađujuće (Beecham i sar., 2013), pa samim tim opravdano može da se posumnja da su predispozicije za MS u stvari u imunskom sistemu, što na kraju i podržava model koji objašnjava da inicijacija MS nastaje na periferiji, a ne u CNS. Analize bazirane na traganju za genima kandidatima, izdvojile su *interleukin(II)-2*, *interferone (Ifn)* i *Nf- κ b* bitnim za nastanak bolesti (Tašan i sar., 2015). Međutim, pronađene saglasnosti ne znače nužno i uzrok za nastanak bolesti. Do danas, nekoliko genskih alela je označeno genetičkim determinantama za nastanak bolesti. To su: *HLA-A*02:01* i *HLA-DRB1*15:01* (Frieese i sar., 2008) (Gregersen i sar., 2006) kao i aleli koji kodiraju α lance receptora citokina IL-2 i IL-7 (IL-2R α i IL-7R α) (Hartmann i sar., 2014) (Dendrou i sar., 2009) (Gregory i sar., 2007) (Lundström i sar., 2013). Ova otkrića govore o ulozi mehanizma centralne tolerancije kao i u razlikama u efektorskim funkcijama T ćelija na periferiji zbog izmenjene osetljivosti na citokine, produkciju citokina i homeostatsku proliferaciju, a sve u kontekstu predispozicija za nastanak MS. Iako je i dalje ograničen, sadašnji stav u vezi sa genskim polimorfizmima asociranim sa MS je da varijante gena *HLA* prvenstveno definišu antigensku specifičnost u CNS utičući na repertoar T ćelija, dok druge genske varijante utiču na prag aktivacije imunskih ćelija, pa samim tim i na verovatnoću nastanka autoimunosti CNS. Pored toga, ne treba zaboraviti ni epigenetičke faktore koji značajno doprinose regulaciji genske ekspresije i faktorima rizika za nastanak MS.

Ako se govori o faktorima sredine koji doprinose nastanku bolesti, oni se mogu svrstati u dve kategorije. Prvoj kategoriji pripadaju faktori koji su direktno uključeni u aktiviranje autoreaktivnih T ćelija i toj kategoriji pripadaju obrazci virusa i obrazci mikroorganizama koji mehanizmom molekulske mimikrije doprinose aktiviranju ovih ćelija (Harkiolaki i sar., 2009) (Münz i sar., 2009) (Olson i sar., 2005).

Dalje, faktori sredine mogu da dovedu do narušavanja centralne tolerancije i stvaranja novih autoantigena (Scally i sar., 2013) ili do modifikacije i oslobađanja postojećih kao što je to slučaj kod Tejlorovog mišijeg modela virusnog encefalomijelitisa (Münz i sar., 2009) (Miller i sar., 1997). Drugoj kategoriji pripadaju spoljašni faktori sa imunomodulacijskim aktivnostima, koji utiču na prag aktivacije autoreaktivnih T ćelija stvarajući proinflamacijski milje. Zanimljivo je da npr. periferna inflamacija izazvana nekom infekcijom može direktno da utiče na CNS tako što citokini sekretovani na periferiji aktiviraju aferentne nervne završetke, cirkumventrikularne organe i perivaskularne makrofage u CNS (Dantzer i sar., 2008), dok ćelije urođene imunosti u horoidnom pleksusu mogu da odgovore na molekulske obrasce asociirane sa patogenima (PAMP, od eng. Pathogen-Associated Molecular Pattern) (Quan i sar., 1998) (Vitkovic i sar., 2000). Pored toga, u ovakvom proinflamacijskom miljeu može doći i do aktivacije mikroglije u CNS. Ovaj fenomen postavlja pitanje da li, u nekim slučajevima, MS može biti rezultat periferne inflamacije koja pokreće mikroglijom indukovanu neurodegeneraciju, bez potrebe za prethodnim aktiviranjem autoreaktivnog odgovora.

Do danas, faktori sredine za koje postoje mnogi pokazatelji da su uključeni u razvoj MS spadaju nedostatak vitamina D, humani citomegalovirus (Belbasis i sar., 2015), poremećen cirkadijalni ritam (Hedström i sar., 2011). Pušenje i Epstein-Barr virus (EBV) i dalje ostaju kao najpotvrđeniji doprinosioci MS (Belbasis i sar., 2015) iako njihov doprinos ukupnom riziku nastanka MS nije ništa veći od bilo kog pojedinačnog genskog faktora (Belbasis i sar., 2015). Pored toga što se o ulozi humanih virusa u nastanku MS sve više pridaje važnosti, razumevanje njihovog uticaja je još uvek nedovoljno ispitano (Virgin, 2014). Isto je i sa mikrobiomom creva, čiji genom je oko 100 puta veći od humanog i čije promene sastava su i te kako pod uticajem faktora sredine (Yatsunenko i sar., 2012). Studije na životinjskim modelima MS su pokazale da promene u mikrobioti creva mogu da izmene incidencu i jačinu inflamacije CNS, kao i same posledice bolesti (Berer i sar., 2011). Međutim, direkta veza između mikrobiote i MS kod ljudi još uvek nije potvrđena.

1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najbolje okarakterisan i najčešće korišćen životinjski model MS. Prvi put je opisan pre više od 75 godina i može se indukovati aktivno ili pasivno u različitim osetljivim vrstama i sojevima glodara i primata (Rivers i Schwentker, 1935). Aktivna indukcija podrazumeva imunizaciju homogenatom tkiva CNS ili specifičnim antigenima CNS, kao što su bazni protein mijelina (MBP), mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG), proteolipidni protein (PLP), kao i peptidima ovih proteina koji su emulgovani u odgovarajućem adjuvansu (Gold i sar., 2006). Alternativno, bolest može biti izazvana transferom encefalitogenih CD4⁺ T ćelija dobijenih iz limfnih organa životinja kod kojih je prethodno uspostavljen aktivan EAE. Ovakav postupak se naziva pasivna indukcija EAE (Ben-Nun i sar., 1981).

Kliničke manifestacije EAE zavise od vrste i soja životinja, ali i od načina indukcije (Simmons i sar., 2013). Karakterišu ga pareza ili paraliza, koje se šire od repa, preko zadnjih i prednjih udova, dovodeći u teškim slučajevima, do smrti eksperimentalne životinje. U EAE se inflamacija predominantno dešava u kičmenoj moždini životinja što izaziva paralizu. Iako ovaj model obezbeđuje mnoge uvide u inflamaciju CNS, nedostatak inflamacije u mozgu je osnovna razlika u odnosu na pacijente obolelih od MS. Međutim razvijen je model EAE koji se odlikuje inflamacijom i u mozgu i u kičmenoj moždini. U pitanju je model EAE u C3HeB/FeJ miševima (Stromnes i sar., 2008). Pored klasičnog modela indukcije EAE imunizacijom, genetičkim inženjeringom su razvijeni životinjski modeli kod kojih se EAE može razviti spontano jer njihovi limfociti ekspimiraju T ćelijske receptore i/ili antitela specifična za antigene mijelina (Krishnamoorthy i sar., 2007). Postoje i životinjski modeli kod kojih je proces demijelinizacije u CNS izazvan hemijski (kuprizonom, etidijum bromidom, lizolecitinom) ili virusom (TMEV, od eng. Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus ili mišjim virusom hepatitisa) (Rodriguez, 2007).

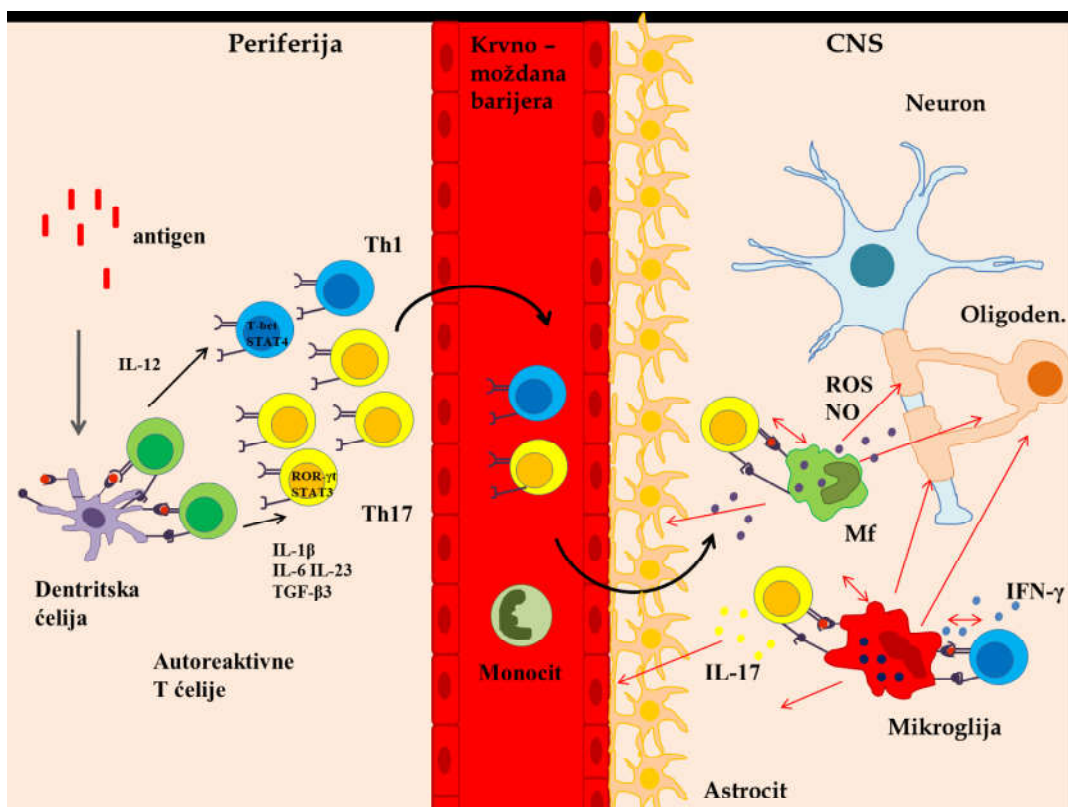
Osnovni nedostatak EAE, kao modela MS, je što ne prikazuje čitav spektar inflamacijskih mehanizama i neurodegeneracija koje se mogu uočiti kod MS. Dalje, većina sojeva, uključujući i najkorišćeniji soj C57BL/6 pokazuje monofazni tok bolesti.

Međutim, dostupni su sojevi koji ostvaruju relapsno-remitentni i progresivni model bolesti (Simmons i sar., 2013). Pored spomenute razlike u mestima inflamacije CNS kod pacijenata obolelih od MS i životinja kojima je indukovano EAE, infiltrati imunskih ćelija unutar CNS se bitno razlikuju u modelu EAE i MS. Tako je zbog imunizacijskog režima CD4⁺ T ćelijski odgovor dominantan u EAE, dok su u MS najviše zastupljene CD8⁺ T ćelije (Babbe i sar., 2000). Isto tako, kao problem se javlja i genetička heterogenost koja postoji kod obolelih od MS, ali ne i kod EAE modela gde se koriste inbredni sojevi životinja (Mix i sar., 2010). Iako ovi i drugi problemi ograničavaju interpretaciju rezultata, EAE doprinosi rasvetljavanju složenosti i heterogenosti same MS, pogotovo ako se različiti modeli EAE proučavaju paralelno.

1.3. Imunopatogeneza multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Objašnjenje patogeneze MS koje podržava stanovište da bolest nastaje na periferiji u saglasnosti je sa metodom indukcije EAE u kome antigeni CNS, emulgovani u smešu za imunizaciju, kada se ubrizgaju životinji dovode do nastanka bolesti. Primena antigena dovodi do lokalnog aktiviranja antigen-prezentujućih ćelija (dendritskih ćelija (DC), makrofaga), preuzimanja antigena od strane ovih ćelija i prezentaciju naivnim T limfocitima u drenirajućim limfnim čvorovima (DLČ). Naivne CD4⁺ T ćelije pomoću svog TCR prepoznaju antigen koji je prikazan u sklopu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti II (MHC II, od eng. Major Histocompatibility Complex II) od strane antigen prezentujućih ćelija (APC). Nakon toga, vođenje specifičnim ko-stimulatornim signalima i citokinskim miljeom okolne sredine, ove ćelije se aktiviraju i diferenciraju u encefalitogene pomoćničke subpopulacije Th1 i Th17 (Th od engl. T helper) (Hafler i sar., 2005) (Kapadia i Sakic, 2011). Th1 i Th17 ćelije napuštaju DLČ, ulaze u cirkulaciju i dospevaju do CNS gde se reaktiviraju dejstvom lokalnih antigen-prezentujućih ćelija, što dalje dovodi do regrutovanja imunskih ćelija na mesto inicijalne infiltracije i širenja inflamacije u CNS (McMahon i sar., 2005) (Ransohoff i sar., 2003) (Slika 1). Pokazano je da različiti citokini indukuju diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija sa različitim fenotipom i funkcijama (Sonar i Lal, 2017).

Tokom aktiviranja TCR, u prisustvu citokina IL-12 i IFN- γ dolazi do aktiviranja signalnih puteva IL-12/STAT4 i IFN- γ /STAT1 unutar T ćelija, čija posledica je produkcija proteina regulatora ekspresije gena T-bet, koji je odgovoran za diferencijaciju T ćelija u Th1 subpopulaciju (Szabo i sar., 2000) (Thieu i sar., 2008). Th1 ćelije proizvode citokine IFN- γ i faktor nekroze tumora (TNF, od eng. Tumor Necrosis Factor) koji u uslovima inflamacije aktiviraju makrofage i pomažu eliminaciju unutarćelijskih bakterija i virusa (Knochelmann i sar., 2018). Međutim, prekomerna aktivacija i funkcionisanje ovih ćelija povezana je sa patogeneзом EAE, MS i drugim autoimunskim bolestima (Yang i sar., 2009).



Slika 1. Shematski prikaz imunopatogeneze EAE. Objašnjenje u tekstu.

Th1 ćelije su dugo vremena smatrane efektorskim ćelijama u indukciji EAE (Sospedra i sar., 2005). Adoptivni transfer Th1 ćelija može da indukuje EAE, a miševi deficiјentni u regulatornom proteinu T-bet su rezistentni na indukciju EAE (Bettelli i sar., 2004).

Međutim, otkrićem da je citokin IL-23 neohodan za razvoj EAE (Becher i sar., 2002), došlo se do otkrića Th17 ćelija koje su zavisne od prisustva IL-23 i koje mogu da indukuju EAE (Cua i sar., 2003). U mnogim EAE modelima, bolest indukovana Th17 ćelijama ispoljava mnogo jaču kliničku sliku nego ona indukovana Th1 ćelijama (Langrish i sar., 2005a) (Jäger i sar., 2009). Th17 ćelije se uglavnom nalaze u mukoznim mestima kao što su gastrointestinalni trakt i pluća. Ove ćelije sekretuju različite citokine, kao što su IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 i faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (GM-CSF, od eng. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Stadhouders i sar., 2018).

ROR- γ t je glavni regulatorni protein koji učestvuje u diferencijaciji Th17 ćelija i direktno indukuje ekspresiju citokina IL-17A/F (Ivanov i sar., 2006). Konvencionalne Th17 ćelije nastale u prisustvu TGF- β 1 i IL-6 su nepatogene u EAE i imaju ulogu u održanju homeostaze mukoze i antibakterijsku funkciju (McGeachy i sar., 2007). Međutim, nekoliko drugih faktora kao što su IL-1 β , IL-23 i TGF- β 3 se definišu kao faktori koji favorizuju jako patogene Th17 ćelije u EAE (Langrish i sar., 2005b) (Ghoreschi i sar., 2010) (Stockinger i Omenetti, 2017). Regulatorni protein STAT3 je posebno neophodan za odgovor ćelije na IL-6 i IL-21. Na molekulskom nivou, STAT3 stimuliše ekspresiju ROR- γ t koji je potreban za diferencijaciju Th17 ćelija. STAT3 takođe podiže ekspresiju receptora IL-23 (IL-23R), nepohodnog za razvoj Th17 i citokina IL-17 potrebnog za efektorske funkcije ove ćelijske populacije (Nurieva i sar., 2007) (Ivanov i sar., 2006). Diferencijacija naivnih T ćelija u različite subpopulacije takođe je regulisana molekulima mikroRNK (miRNK) (Teteloshvili i sar., 2015). miRNK predstavljaju veliku familiju RNK molekula dužine oko 22 nukleotida čija se uloga ogleda u post-transkripcionoj regulaciji genske ekspresije kod životinja i biljaka (Krol i sar., 2010) (Eulalio i sar., 2008). Tako je pokazano da miR-146a kontroliše Th1 diferencijaciju dok miR-155 i miR-326 učestvuju u diferencijaciji Th17 ćelija (Hu i sar., 2013).

Mnoga istraživanja rađena su na ispitivanju uloge Th1 i Th17 ćelija u EAE i MS. Obe ćelijske populacije, i Th1 i Th17 su identifikovane i u CNS i cerebrospinalnoj tečnosti (CSF, od eng. Cerebrospinal Fluid) pacijenata sa MS (Link i sar., 1992) (Kebir i sar., 2007a).

Međutim, nije najjasnije da li i kako ove ćelijske subpopulacije korelišu sa različitim tipovima patologije i obrascima inflamacije. Različite studije su pokazale različitu predominantnost jedne ili druge ćelijske populacije u ranoj fazi bolesti kao i tokom relapsa i progresije (Frisullo i sar., 2008) (Tzartos i sar., 2008). Studija koja je ispitivala udeo Th1 i Th17 ćelija tokom remisije i relapsa, pokazala je da najveći deo T ćelija u CSF proizvodi IFN- γ , a da se broj Th17 ali ne i Th1 značajno povećava tokom perioda relapsa u odnosu na remisiju (Brucklacher-Waldert i sar., 2009). Isto tako, pokazano je da pacijenti oboleli od RRMS koji imaju lezije predominantno u kičmenoj moždini poseduju značajno viši odnos Th17:Th1 ćelija u odnosu na pacijente sa lezijama predominantnim u mozgu (Johnson i sar., 2016). Adoptivni transfer Th1 vs Th17 ćelija u EAE pokazao je da T ćelije utiču i na sastav i na lokalizaciju infiltrata u CNS. Th1 ćelije indukuju produkciju hemokinskih liganda CXCL9 i CXCL10 u CNS, koji privlače monocite u CNS. Sa druge strane, Th17 ćelije indukuju CXCL1 i CXCL2 ekspresiju i na taj način više privlače neutrofile u infiltrate CNS (Kroenke i sar., 2008). Pored toga, klinički simptomi Th1 i Th17 posredovanog EAE su različiti. Tako Th1 ćelije indukuju klasični EAE dok Th17 indukuju raznovrsne atipične simptome povezane sa paralizom repa i zadnjih ekstremiteta kao što su ataksija, defekti u proprioceptiji i kotrljanje (Stromnes i sar., 2008) (Domingues i sar., 2010). Zbog toga, Th1 i Th17 ćelije deluju kao ključne odrednice sastava infiltrata i obrazca inflamacije u CNS. Međutim, zbunjujući faktor u istraživanjima Th1 i Th17 ćelija u EAE bio je uočena plastičnost u produkciji citokina od strane ovih ćelija. Naime, Th17 ćelije mogu istovremeno da ekspimiraju regulatorne proteine ROR- γ t i T-bet i da proizvode oba citokina IL-17 i IFN- γ (Abromson-Leeman i sar., 2009). Ovakva plastičnost se pokazala kao jako patogena u modelu EAE (Peters i sar., 2011). Takođe, postoje i dokazi da i Th1 ćelije mogu da ekspimiraju IL-17 (Kurschus i sar., 2010) i da su IL-17⁺IFN- γ ⁺ T ćelije detektovane i u mozgu pacijenata obolelih od MS (Kebir i sar., 2009). “Fate-mapping” studije u EAE korišćenjem “reporter” miša kod kojeg je moguće pratiti produkciju IL-17 u vremenu, pokazale su da do dve trećine ćelija infiltrisanih u CNS u nekom trenutku proizvode IL-17, da bi u sledećem produkciju IL-17 zamenila produkcija IFN- γ (Hirota i sar., 2011). Ove “ex-Th17” ćelije smanjile su produkciju IL-17 i ROR- γ t i povećale produkciju receptora IL-12 na način zavisano od IL-23.

Da bi se detaljnije ispitaio uticaj citokina IFN- γ i IL-17 u patogenezi EAE, napravljeni su EAE modeli koji su deficitarni u ovim citokinima. Bez obzira na činjenicu da Th1 ćelije mogu da indukuju EAE, studije su pokazale da IFN- γ nije neophodan za nastanak EAE i da čak može imati supresivnu aktivnost (Ferber i sar., 1996a) (Wensky i sar., 2005). Na primer, primena IFN- γ direktno u CNS promoviše inflamaciju (Simmons i Willenborg, 1990) (Sethna i Lampson, 1991) dok administracija antitela koja blokiraju IFN- γ pojačava EAE (Billiau i sar., 1988). EAE je takođe pogoršan kod miševa kojima nedostaju geni koji kodiraju za citokin IFN- γ , njegov receptor (IFN- γ R) i p35 subjedinicu IL-12, što sugeriše na protektivnu ulogu ovog citokina u neuroinflamaciji (Steinman, 2007). Međutim, pilot studija gde je IFN- γ davan MS pacijentima obustavljena je iz razloga što su se simptomi bolesti pogoršali, ukazujući na to da ovaj citokin ipak deluje proaktivno na samu bolest (Panitch i sar., 1987).

Iako je pokazano da IL-17 nije obavezan za indukciju EAE (Haak i sar., 2008), takođe je pokazano da Th17 ćelije izazivaju jače manifestacije bolesti EAE, i modeli koji su deficitarni u citokinu IL-17 i njegovom receptoru (IL-17R) odlikovali su se smanjenom incidencijom i jačinom bolesti, kao i odloženim početkom bolesti (Hofstetter i sar., 2005) (Hu i sar., 2010). S obzirom na rezultate ovih istraživanja, urađene su kliničke studije sa ciljem neutralisanja IL-17 kod pacijenata. Rezultati su pokazali da je primena anti-IL-17 antitela kod pacijenata obolelih od RRMS dovela do redukcije aktivnih lezija i trenda smanjenja perioda relapsa (Havrdová i sar., 2016). Iako različiti citokini doprinose patogenezi inflamacije CNS, verovatno je balans IL-17, IFN- γ i drugih citokina taj koji određuje indukciju i manifestaciju bolesti (Simmons i sar., 2013). U svakom slučaju, jasno je da i Th1 i Th17 ćelije imaju značajnog udela u patogenezi MS i EAE, te je proučavanje njihove modulacije kako u *in vitro* sistemu tako i u EAE od izuzetnog značaja za identifikaciju potencijalnih terapeutika za MS.

Rane studije na spontanom transgenom modelu EAE koji poseduje TCR specifičan za MBP pokazale su da bolest može biti sprečena adoptivnim transferom netransgenih CD4⁺ T limfocita (Lafaille i sar., 1994) (Olivares-Villagómez i sar., 1998). Tek kasnije su identifikovane regulatorne CD4⁺CD25^{high} T ćelije (Treg) koje imaju supresivni karakter jer adoptivni transfer ovih ćelija smanjuje jačinu bolesti (Kohm i sar., 2002).

Uloga ovih ćelija je u ograničavanju imunskog odgovora i održavanju imunske homeostaze (Lee i Lee, 2018). Nepravilna diferencijacija i funkcionisanje Treg dovodi do razvoja autoimunskih bolesti (Li i Zheng, 2015). Foxp3 je ključni regulatorni protein neohodan za nastanak timusnih (t)Treg ćelija i njihovu supresivnu aktivnost (Fontenot i sar., 2003). Pored (t)Treg, aktivacijom naivnih CD4⁺ T limfocita u prisustvu antigena i adekvatne kombinacije citokina, pre svega IL-2 i TGF-β, na periferiji nastaju periferne (p)Treg (Kanamori i sar., 2016) (Josefowicz i sar., 2012) (Hadis i sar., 2011). Perifernim Treg pripada i poseban tip regulatornih ćelija tzv. Tr1 ćelije koje ne ekspimiraju regulatorni protein Foxp3 kao klasične Treg ali su jako bitne u supresiji imunskog odgovora jer proizvode velike količine antiinflamacijskog citokina IL-10 (Groux i sar., 1997). Njihova diferencijacija zavisi od prisustva IL-10 i ekspresije receptora aril ugljovodonika AhR (od eng. Aryl Hydrocarbon Receptor) (Zeng i sar., 2015). U EAE populacija Treg u CNS je jako niska u početnim fazama bolesti ali se povećava tokom toka bolesti i većina ovih ćelija je specifična za antigene CNS. Takođe, primećeno je da Treg ćelije dostižu pik tokom faze oporavka od EAE (Liu i sar., 2006) (Korn i sar., 2007) što navodi na zaključak da su one jako bitne u ovoj fazi bolesti i da njihova primena kod MS pacijenata može imati efekta. Zaista, kod obolelih je pokazana smanjena funkcija Treg izolovanih iz periferne krvi i CSF u poređenju sa zdravim osobama (Frisullo i sar., 2009) (Viglietta i sar., 2004) (Haas i sar., 2005). Takođe, ove ćelije su pokazale veću podložnost ka ekspresiji IFN-γ u poređenju sa zdravim osobama (Dominguez-Villar i sar., 2011). Otkriće da menjanje funkcije Treg može da ublaži EAE, obezbedile su nove strategijske pristupe u tretmanu MS. Dakle, jasno je da je sposobnost farmakoloških agenasa da stimulišu Treg poželjna terapijska osobina u tretmanu MS.

Iako su u MS predominantno prisutne autoreaktivne T ćelije, antigen-prezentujuće ćelije imaju izuzetno značajnu ulogu, prevashodno zato što aktiviraju T ćelije i proizvode citokine potrebne za njihovu dalju diferencijaciju. Tokom aktivne indukcije EAE, antigeni CNS se preuzimaju od strane dermalnih DC i prezentuju T ćelijama u drenirajućim limfnim čvorovima. Dalje, da bi autoreaktivne T ćelije dospale u CNS one moraju biti licencirane za ulazak u CNS, odnosno moraju biti reaktivirane u okviru krvno-moždane barijere ili CSF-moždane barijere (Sie i Korn, 2017).

Identifikacija APC koje su odgovorne za ovaj proces i dalje je nepotpuna. Nekoliko studija je potvrdilo prisustvo DC u meningama i horoidnom pleksusu u stanju homeostaze (Prodinge i sar., 2011) (Bulloch i sar., 2008). Međutim, još nije jasno da li se DC nalaze i u perivaskularnom prostoru post-kapilarnih venula, mestu gde se dešava reaktivacija i prolazak encefalitogenih T limfocita u parenhim CNS (Engelhardt i sar., 2016). Mišljenje je da taj prostor naseljavaju DC koje potiču od monocita krvi (moDC). Pored toga, moDC bi mogle učestvovati i u unakrsnoj prezentaciji antigena CD8⁺ T limfocitima na MHC I zavisanim načinom. Pokazano je da moDC proizvode azot monoksid (NO) i TNF koji su sami po sebi značajni efektorski molekuli u patogenezi autoimunosti u CNS, a koji i podstiču aktivaciju T limfocita (Ji i sar., 2013). Koristeći esej transmigracije humanih monocita u *in vitro* sistemu, pokazano je da monociti stiču fenotip DC tokom transmigracije kroz krvno-moždanu barijeru, a da su endotelske ćelije krvnih sudova izvor GM-CSF, neophodnog za ovu tranziciju (Ifergan i sar., 2008). Iz prethodno navedenog je jasno da je ispitivanje uticaja na sposobnost DC da vrše efikasnu prezentaciju antigena izuzetno značajno za razumevanje terapijskog potencijala farmakoloških agenasa u tretmanu MS.

Jako bitne ćelije u efektorskoj fazi EAE i MS predstavljaju mikroglia i makrofagi. Ove ćelije su uključene u destrukciju tkiva i smanjenje funkcionalnosti CNS u EAE i MS (Bogie i sar., 2014). Takođe, smatra se da i one mogu obaviti reaktivaciju T limfocita u CNS i tako doprineti inicijalnim fazama autoimunosti usmerenim protiv CNS (Bartholomäus i sar., 2009) (Brown i Sawchenko, 2007) (Kivisäkk i sar., 2009). U fiziološkim uslovima mikroglia interaguje sa neuronima i podržava razviće i utiče na održanje homeostaze mozga (Michell-Robinson i sar., 2015). Mikroglia takođe proizvode različite neurotrofijske faktore koji promovišu diferencijaciju i preživljavanje neurona (Ueno i sar., 2013). Plastičnost i heterogenost su glavne odlike makrofaga i mikroglie. U odgovor na različite stimulse, makrofagi i mikroglia podležu klasičnoj M1 aktivaciji ili alternativnoj M2 aktivaciji (Martinez i Gordon, 2014). Tip polarizacije je kontrolisan unutarćelijskim faktorima npr. epigenetičkim faktorima ili spoljašnjim kao što su citokini (Murray, 2017). M1 aktivacija je proinflamacijska i neurotoksična i indukovana je stimulatorima TLR (od eng. Toll like Receptor) i IFN- γ što je tipično za bakterijske infekcije.

M1 makrofagi proizvode velike količine TNF, IL-12, IL-1 β , IL-6 i IL-23 koji utiču na T ćelije da diferenciraju u Th1 i Th17 subpopulacije (Krausgruber i sar., 2011). Zatim, Th1 ćelije obezbeđuju pozitivnu povratnu spregu koja dalje podstiče funkciju M1 makrofaga (Mosser i Edwards, 2008). M1 makrofagi takođe eksprimiraju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidazu (NADPH) (Xu i sar., 2016) koja stvara reaktivne vrste kiseonika (ROS, od eng. Reactive Oxygen Species) kao i inducibilnu azot monoksid sintazu (iNOS, od engl. Inducible Nitric Oxide Synthase) koja konvertuje L-arginin u NO (Panaro i sar., 2003). U reakciji ROS i NO nastaju peroksinitriti, molekuli koji poseduju snažnu antimikrobnu aktivnost (Gookin i sar., 2005). Pored toga, M1 makrofagi eksprimiraju visok nivo molekula MHC I i II, kostimulatorne molekule (CD40, CD80, CD86), Fc receptore i integrine koji svi zajedno olakšavaju indukciju inflamacije i neurotoksičnost (Yin i sar., 2017). Za razliku od M1 aktivacije, M2 aktivacija je antiinflamacijskog karaktera i podrazumeva aktivnosti uključene u oporavak tkiva nakon inflamacije. Ovi makrofagi su obično indukovani od strane citokina IL-4, IL-10, IL-13 i prisustvom apoptotičnih ćelija u okolini. M2 makrofagi proizvode antinflamacijske citokine IL-10, TGF- β i enzim arginazu 1 koja prevodi L-arginin u poliamine (Martins i sar., 2011) (Italiani i Boraschi, 2014). Sa druge strane M2 makrofagi proizvode velike količine IL-10 i imaju ulogu u supresiji adaptivnog imunskog odgovora (Boven i sar., 2006). Pored toga, M2 makrofagi sekretuju različite faktore rasta koji potpomažu oporavak tkiva (Stadelmann i sar., 2002).

Kod miševa kojima je mikroglia inaktivirana odložen je početak bolesti i smanjeni klinički simptomi zbog smanjene inflamacije u CNS, što potvrđuje njenu bitnu ulogu u patogenezi EAE i MS (Mishra i Yong, 2016). Pored toga, kod miševa je pokazano da M1 mikroglia prelazi u M2 fenotip tokom procesa remijelinizacije (Miron i sar., 2013). Iako su podele na M1 i M2 makrofage od pomoći da konceptualno objasne njihove aktivnosti *in vitro*, to nije slučaj *in vivo*. Naime, u *in vivo* uslovima teško je odrediti da li ćelije poseduju M1 ili M2 fenotip. U svakom slučaju, makrofagi i mikroglia doprinose patogenezi EAE i MS, te je ispitivanje farmakološkog uticaja na njihove efektorske funkcije od velikog značaja za ispitivanje terapijskog potencijala za tretman MS.

Pored navedenih populacija imunskih ćelija, značajnu ulogu u patogenezi MS imaju i $CD8^+$ T limfociti i B limfociti. Istraživanja na pacijentima obolelim od MS pokazala su da $CD8^+$ T limfociti imaju značajnu ulogu u patogenezi bolesti (Huseby i sar., 2012) (Mars i sar., 2011). Takođe, $CD8^+$ T ćelije su zastupljene u većem broju u lezijama CNS u odnosu na $CD4^+$ T ćelije (Woodrooffe i sar., 1986) (Hauser i sar., 1986). Mijelin-specifični $CD8^+$ T limfociti se mogu uočiti i kod EAE modela, a njihova aktivacija je posledica ukrštene prezentacije od strane moDC u CNS (Ji i sar., 2013). Nemijelinski antigeni astrocita mogu da pokrenu spontani relapsno-remitentni model bolesti kod miša aktiviranjem autoreaktivnih $CD8^+$ T ćelija u CNS (Sasaki i sar., 2014). Pored toga, patologija ovog modela je kontrolisana B ćelijama i virusima, sugerišući da kompleksna multicelularna interakcija i faktori sredine mogu da doprinesu heterogenosti bolesti. Kod čoveka, do četvrtine $CD8^+$ T ćelija u aktivnim lezijama CNS je u stanju da produkuje IL-17, pa se ove ćelije smatraju invarijantnim T ćelijama asociranim sa mukozom (MAIT, od eng. Mucosa-Associated Invariant T Cells) (Sasaki i sar., 2014). Efikasna autologa transplatacija ćelija kostne srži kod pacijenata sa jakom kliničkom manifestacijom bolesti rezultuje u dugotrajnom smanjenju broja ovih ćelija, ukazujući na njihovu jako bitnu ulogu u patogenezi bolesti (Abrahamsson i sar., 2013). S obzirom da su ćelijske populacije autoreaktivnih $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita pronađene kod obolelih od MS, navodi se na zaključak da obe populacije doprinose patogenezi MS.

Iako je prisutnost T ćelija detektovana u plakama karakterističnim za MS, B ćelije takođe doprinose patogenezi MS kao APC koje aktiviraju autoreaktivne T ćelije i produkuju autoantitela i proinflamacijske citokine. Prisustvo oligoklonalnih grupacija B ćelija u CSF i parenhimu CNS detektovano je kod više od 95% pacijenata. U ovim grupacijama dolazi do klonalne ekspanzije B ćelija i siteze IgG autoantitela. U plakama gde se aktivno dešava obrada i prezentacija antigena, kao i siteza autoreaktivnih antitela detektovano je prisustvo plazma ćelija (Dargahi i sar., 2017). Interesantno je da preko 50 antitela izolovanih iz CSF pacijenata nije pokazalo reaktivnost na glavne proteine mijelina (MBP, PLP ili MOG) (Disanto i sar., 2012) ali je primećeno da se oni vezuju za različite unutarćelijske proteine ili za unutarćelijske lipidne komponente (Wekerle, 2017).

Miševi deficijenti u B ćelijama ($\mu\text{MT}^{-/-}$), kao i miševi kod kojih su B ćelije uklonjene upotrebom anti-CD20 antitela su korišćeni u eksperimentima u modelu EAE (Simmons i sar., 2013). Rezultati ovih eksperimenata dali su različite zaključke o ulozi B ćelija u EAE. U jednim eksperimentima, B ćelije su bile nosioci patogeneze EAE, dok su u drugim imale protektivnu ulogu (Weber i sar., 2010) (Fillatreau i sar., 2002). Ipak, smatra se da su ćelije koje pokreću autoimunski odgovor usmeren protiv CNS, CD4^+ T limfociti, dok je efektorska i regulatorna uloga CD8^+ T limfocita i B limfocita bitna u kasnijim fazama bolesti.

1.4. Terapijski pristupi u multiploj sklerozi

Terapijski pristupi u MS su uglavnom bazirani na supresiji imunskog odgovora. Lekovi koji se trenutno koriste u terapiji MS su nespecifično imunosupresivni, što povećava rizik za infekcije i kancer (Inglese i Petracca, 2015). Pacijenti oboleli od RRMS su u prošlosti najčešće tretirani intravenski kortikosteroidima, izmenom plazme ili injekcijama adrenokortikotropnog hormona (Citterio i sar., 2000). Iako su efikasni u redukciji trajanja relapsa i ubravanju oporavka pacijenata, ovi terapijski pristupi ne poseduju nikakvu neuroprotektivnu vrednost niti modifikuju tok bolesti (Inglese i Petracca, 2015) (Morrow i sar., 2009) (Havrdova i sar., 2009). Tek sredinom 90 godina prošlog veka napravljen je prvi veliki pomak ka poboljšanju terapije MS. Prvi lek za lečenje RRMS u ovoj generaciji lekova je bio IFN β -1, Rebif® (IFN- β 1a), Betaseron® (IFN- β 1b), Extavia® (IFN- β 1b), Avonex® (IFN- β 1a, smanjenje Th17 ćelija) (Kappos i sar., 2007) (Koch i sar., 2007). Sledeći je bio kopakson Copaxone® (glatiramer acetat) (Ziemssen i Schrempf, 2007). Oba ova leka se smatraju modifikatorima toka bolesti. Oni se primenjuju intramuskularno ili subkutano i to na nedeljnoj bazi, što samo po sebi izaziva niz neželjenih reakcija kod pacijenata. Sledeći veliki korak u terapiji desio se uvođenjem lekova koji se primenjuju oralno (Ampyra® (dalfampridin, inhibicija kalijumovih kanala) (Pikoulas i Fuller, 2012), Aubagio® (terifunomid, inhibicija aktivacije T i B ćelija) (Palmer, 2010), Gilenya® (fingolimod, modulacija preko receptora sfingozina) (Choi i sar., 2011), Plegridy® (pegIFN- β 1a) (Hoy, 2015), Tecfidera® (dimetilfumarat, kombinacija imunomodulatorne i imunosupresivne aktivnosti) (Albrecht i sar., 2012)) ili subkutano (Lemtrada® (alemtuzumab, deplecija

limfocita) (Cohen i sar., 2012), Tysabri® (natalizumab, inhibicija migracije limfocita) (Rice i sar., 2005) i Zinbryta® (daklizumab, blokada receptora za IL-2) (Bielekova, 2018)), ali u dugim vremenskim razmacima koji se mere mesecima (Huang, 2015). Do danas, odobreno je 14 FDA lekova nove generacije za RRMS, a nekoliko njih je u različitim fazama razvoja. Za ove lekove je pokazano da redukuju pojavu relapsa, redukuju lezije u CNS, stabilizuju ili odlažu kliničke manifestacije MS (Dargahi i sar., 2017). Generalno, ove terapije dramatično samanjuju broj napada i progresiju bolesti inhibirajući ili modulišući imunski odgovor kod pacijenata. Trenutno je fokus istraživanja na pronalaženju lekova za progresivne forme bolesti jer prethodno navedeni lekovi nisu efikasni za te forme MS. Jedini terapeutik koji je donekle efikasan u njihovom tretmanu je Novantrone® (mitoksantron, inhibicija aktivacije limfocita i makrofaga) (Hartung i sar., 2002), koji je međutim izuzetno imunosupresivan i ima izražene neželjene efekte.

Pored dostupnih konvencionalnih terapija, indukcija tolerancije na sopstvene antigene i ponovni povratak imunske homeostaze su pristupi koji su u fokusu trenutnih istraživanja. U tom smislu terapije zasnovane na ćelijama predstavljaju potencijalni pristup u lečenju MS gde bi se prevazišli neki od najvećih nedostataka konvencionalne terapije kao što su generalna imunosupresivnost i nedostatak efikasnosti u prevenciji oštećenja tkiva CNS tokom inflamacije i stimulaciji oporavka oštećenog tkiva. Ovi terapijski pristupi se baziraju na različitim mehanizmima kao što je: modulacija imunskog odgovora upotrebom tolerogenih DC i Treg (Nathalie i sar., 2016) (Stojanovic i sar., 2017); oporavak defektnog imunskog sistema autologom transplatacijom hematopoetskih matičnih ćelija; modifikacija imunskog odgovora i mehanizama oporavka korišćenjem menzehimskih matičnih ćelija i drugih matičnih ćelija krvne loze, adipoznog tkiva, placente i dr. tkiva; farmakološka manipulacija endogenih matičnih ćelija kako bi se povećale njihove sposobnosti u obnavljanju oštećenog tkiva; zamena oštećenih ili izgubljenih oligodendrocita transplatacijom ili progenitorskim ćelijama oligodendrocita ili indukovanim progenitorskim ćelijama oligodendrocita (Scolding i sar., 2017).

Pored svih pobrojanih terapijskih pristupa potraga za novim, efikasnijim, bezbednijim i jeftinijim terapijama autoimunosti CNS i dalje traje. Potencijalni kandidati za tretman autoimunosti CNS su i biljni ekstrakti i njihove aktivne komponente koji pokazuju antiincefalitogeno dejstvo *in vitro* i *ex vivo*, kao i u modelima MS.

1.5. Jedinjenja biljaka kao modulatori imunskog odgovora

Tokom godina sve više raste broj istraživanja o jedinjenjima biljaka kao imunomodulacijskim agensima, kao i potraga za novim jedinjenjima koja će imati primenu u lečenju različitih bolesti posredovanih imunskim mehanizmima.

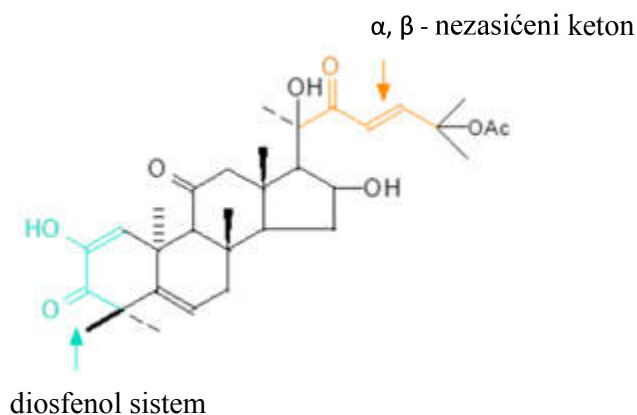
Biljke su bogat izvor imunomodulacijskih jedinjenja, u prvom redu polifenola. Polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka, prisutni su u ishrani i široko se koriste u medicinske i kozmetičke svrhe. Oni ostvaruju antioksidacijska, imunomodulacijska, antikancerska i antimikrobna dejstva (Paszkiwicz i sar., 2012). Iako su polifenoli hemijski okarakterisani kao jedinjenja sa fenolnom strukturom, njihove strukture jako variraju i sadrže različite funkcionalne grupe. U polifenole spadaju fenolne kiseline, stilbeni, lignani i flavonoidi koji se dalje mogu svrstati u 6 podklasa: flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijanidine i flavanole (katehine i proantocijanidine). Ova raznovrsnost se dalje povećava jer polifenoli mogu biti asociрани i sa različitim ugljenim hidratima, organskim kiselinama, ali i međusobno (Manach, 2004).

Istraživanja su pokazala da polifenoli kao što je epigalokatehin-3-galat (EGCG) iz zelenog čaja ili procijanidin iz jatobe ublažavaju EAE kod miševa, smanjujući autoreaktivni Th1 i Th17 odgovor, a povećavajući protektivni uticaj Treg (Wang i sar., 2012b) (Miyake i sar., 2006). *In vitro* i *in vivo* eksperimenti su pokazali da naringenin i izokviritigenin iz sladića indukuju Treg populaciju u crevima i da ublažavaju eksperimentalni kolitis kod miševa (Guo i sar., 2015). Pretpostavlja se da naringenin deluje kao agonista receptora AhR koji se potom vezuje u promotorskom regionu *Foxp3* gena i indukuje njegovu ekspresiju (Wang i sar., 2012a).

1.6. Biološki aktivna jedinjenja krastavca

Krastavac (*C. sativus*) je biljka koja je široko korišćena u ljudskoj ishrani. Pored uloge u ishrani krastavac se odavnina koristio i u narodnoj medicini. Različiti delovi biljke (koren, list, plod) su ispitivani u terapeutske svrhe (Mukherjee i sar., 2013). List, stablo i koren krastavca se koriste u kineskoj narodnoj medicini kao antidiuretik, detoksikant i antigonoretik (Mukherjee i sar., 2013). Takođe, detektovana su i antikosidacijska, antimikrobna (Sotiroudis i sar., 2010), andidijabetogena (Dixit i Kar, 2010) i hipolipidemijska (Sudheesh i Vijayalakshmi, 1999) svojstva ove biljke. Antihijaluronidazna i antielastazna aktivnost krastavca je iskorišćena u kozmetičkoj industriji (Nema i sar., 2011).

Pored velikog broja polifenolnih jedinjenja krastavac sadrži i triterpenoidna jedinjenja kukurbitacine (Rice i sar., 1981). Kukurbitacini se mogu pronaći u različitim vrstama biljkama familije *Cucurbitaceae* kao što su *Bryonia*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Echinocystis*, *Lagenaria* i *Citrullus* (Aeri i sar., 2015). Nivo kukurbitacina varira između biljnih tkiva. Najviše se nalaze u plodu, ali ih ima i u drugim delovima biljke, s tim što se za seme smatra da sadrži najmanje ovih jedinjenja (Gry i Andersson, 2006). Svi kukurbitacini sadrže 19(10→9β)-abeo-5α-lanostan prsten kao osnovu (Slika 2) i ukoliko u svom molekulu poseduju diosfenol strukturu uglavnom se nalaze u obliku glikozida, najčešće asosovani sa glukozom (Attard i Martinoli, 2015). Pored toga, kukurbitacini se razlikuju od većine ostalih tetracikličnih triterpena po tome što su jako nezasićeni i sadrže veliki broj keto, hidroksil i acetoksi grupa. Strukture različitih kukurbitacina su određene, a imena su dobili po slovima abecede: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, O, P, Q, R i S (Gry i Andersson, 2006).



Slika 2. Shematski prikaz osnovne strukture kukurbitacina.

Detektovane su različite biološke aktivnosti ovih jedinjenja. Zabeležena je njihova antitumorska (Dong i sar., 2010), antiinflamacijska (Jayaprakasam i sar., 2003), antiaterosklerotična (Bernard i Olayinka, 2010) i antidijabetogena svojstva (Tan i sar., 2008) (Harinantenaina i sar., 2006). Pored ispoljenih poželjnih dejstava ova jedinjenja pokazuju i visoku toksičnost. Opseg toksičnosti kukurbitacina na osnovu *in vivo* studija se kreće od 2 do 12.5 mg/kg (Gry i Andersson, 2006). Smatra se da prisustvo dvostruke veze na poziciji atoma C23 i acetil grupe na poziciji C25 značajno povećava toksičnost jedinjenja. Pojava simptoma toksičnosti varira od načina primene jedinjenja (peroralno, intraperitonealno itd.), životinja koje se koriste u studijama i primenjene doze (Aeri i sar., 2015).

1.7. Imunomodulacijske osobine kukurbitacina

Među najistraživanijim kukurbitacinima je kukurbitacin E (Kuke). Ispitivana su njegova antioksidacijska, antitumorska i imunomodulacijska svojstva. Istraživanja su pokazala da kukurbitacin E smanjuje produkciju NO, TNF, enzima ciklooksigenaze (COX) i IL-1 β kod RAW264.7 makrofaga (Abdelwahab i sar., 2011a) (Qiao i sar., 2013). Takođe, pokazano je da kukurbitacin E inhibira produkciju IL-2, TNF i IFN- γ kod Jurkat T ćelija (Wang i sar., 2015a).

Kukurbitacin B (KukB), još jedno jedinjenje iz grupe kukurbitacina, inhibira antigen-prezentujuću aktivnost makrofaga i smanjuje produkciju NO, TNF, IL-6, IL-12 i IL-1 β kod ovih ćelija (Kim i sar., 2015a).

23,24-dihidrokokurbitacin D inhibira produkciju NO od strane peritonelanih makrofaga miša inhibirajući signalni put NF- κ B i ekspresiju iNOS (Park i sar., 2004). Kukurbitacin I je jedan od najjačih inhibitora aktivacije STAT3 regulatornog proteina. Pokazano je da ovaj kukurbitacin inhibira fosforilaciju tirozina u molekulu STAT3 i njegovo vezivanje za regulatorne sekvence na DNK molekulu (Blaskovich i sar., 2003).

Imunomodulacijska dejstva kukurbitacina u kontekstu autoimunosti CNS nisu sprovedena do studije opisane u ovoj doktorskoj disertaciji. Pored ispitivanja antiencefalitogenog dejstva samih kukurbitacina, ova studija je uključila i ispitivanje dejstva ekstrakata različitih organa krastavca na encefalitogene ćelije. Predmet istraživanja bio je uticaj ekstrakata i njihovih aktivnih supstanci na T limfocite, makrofage i dendritske ćelije u in vitro i ex vivo sistemima, kao i na EAE.

2. Ciljevi

Biljke predstavljaju bogat izvor najrazličitijih jedinjenja koja mogu poslužiti za razvoj novih lekova i tretman raznih bolesti. Na osnovu dosadašnjih podataka o antinflammacijskom, antioksidacijskom i antidijabetogenom dejstvu krastavca, biljke široko rasprostranjene u ishrani ljudi, postavljen je osnovni cilj ovog istraživanja a to je da se **ispitaju imunomodulacijska dejstva različitih ekstrakata krastavca na osnovne encefalitogene ćelije (T limfocite i makrofage) uključene u patogenezu EAE.**

Imajući u vidu osnovni cilj, uspostavljeni su sledeći specifični ciljevi:

- 1. Pripremanje ekstrakata različitih organa krastavca (koren, list, stablo) različitim metodama ekstrakcije.**
- 2. Ispitivanje imunomodulacijskog efekta pripremljenih ekstrakata na ćelije drenirajućih limfnih čvorova i CD4⁺ T limfocite u modelu EAE *in vitro*.**
- 3. Odabir ekstrakta sa najpotentnijim antiencefalitogenim efektom i fitohemijska analiza ekstrakta metodom masene spektrometrije.**
- 4. Ispitivanje imunomodulacijskog efekta odabranog ekstrakta na CD4⁺ T limfocite, makrofage i dendritske ćelije u modelu EAE *in vitro*.**
- 5. Utvrđivanje ćelijskih i molekulskih mehanizama delovanja ekstrakta *ex vivo* u modelu EAE.**
- 6. Tretman EAE sa odabranim ekstraktom *in vivo* i praćenje kliničkog toka bolesti.**
- 7. Ispitivanje imunomodulacijskog efekta jedinjenja KukB i KueE na CD4⁺ T limfocite i makrofage u modelu EAE *in vitro*.**
- 8. Ispitivanje toksičnosti odabranog ekstrakta i jedinjenja KukB i KueE u modelu zebrice *in vivo*.**

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi i rastvori

U izvođenju eksperimenata korišćeni su sledeći reagensi i rastvori: bakar-sulfat (CuSO_4), kalijum-sulfat (K_2SO_4), kalijum-hlorid (KCl), kalcijum-nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), magnezijum-sulfat (MgSO_4), kalijum-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), mangan-sulfat (MnSO_4), cink-sulfat (ZnSO_4), amonijum-heptamolibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), borna kiselina (H_3BO_3), gvožđe(III)-etilendiamintetrasirćetna kiselina (Fe(III)-EDTA), metanol (MeOH), etanol (EtOH), *n*-heksan, hloroform (CHCl_3), etil-acetat (EtOAc), metilen-hlorid (CH_2Cl_2), natrijum-sulfat (Na_2SO_4), kalcijum-hlorid (CaCl_2), natrijum-hidrogenkarbonat (NaHCO_3), natrijum-karbonat (Na_2CO_3), natrijum-hidroksid (NaOH), kalijum-natrijum-tartarat, acetonitril (LC–MS čistoća, Fisher Scientific, Lafboro, Velika Britanija), mravlja kiselina (LC–MS čistoća, Merck, Darmštadt, Nemačka) standardi fenola (kofeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, protokatehuinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, gentinzinska, siringinska i sinapinska kiselina, vanilinska i cinaminska kiselina, aeskuletin, apigenin, apigetrin, viteksin i naringenin), kukurbitacin B (KukB) i kukurbitacin E (KukE) (svi nabavljeni od Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka), medijum RPMI (od eng. Roswell Park Memorial Institute) - 1640 sa 25 mM HEPES i 2 mM L-Glu (PAA Laboratories, Pašing, Austrija), natrijum-piruvat (Na-piruvat, Sigma-Aldrich), L-glutamin (L-Glu, Sigma-Aldrich), antibiotici penicilin, streptomycin, nistatin i gentamicin (svi nabavljeni od Galenike, Beograd, Srbija), fetalni teleći serum (FCS, od eng. Fetal Calf Serum, PAA Laboratories), bazni protein mijelina (MBP, od eng. Myelin Basic Protein, dobijen ljubaznošću prof. Aleksandra Flugela, Univerzitet u Getingenu, Nemačka), peptid mijelin oligodendrocitnog proteina (MOG₃₅₋₅₅, Tocris, Bristol, Velika Britanija), lipopolisaharid (LPS, Sigma Aldrich) faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF, od eng. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Peprotech, Rocky Hill, SAD), puferisani rastvor fosfatnih soli (PBS, od eng. Phosphate Buffered Saline), Perkol (Sigma-Aldrich), pufer za eritrolizu (eBioscience, San Diego, SAD), pufer za vezivanje aneksinaV ($5 \times \text{ABB}$, $5 \times \text{Annexin V Binding Buffer}$, Biotium, Hayward, SAD), rastvor tripan plavog (TB, od eng. Trypan Blue, BDSL, Velika Britanija), rastvor kristal violeta (CV, od eng. Crystal Violet, xxxxx), sirćetna kiselina (CH_3COOH), (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT, Sigma

Aldrich), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB, eBioscience), hlorovodonična kiselina (HCl), dimetil-sulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich), nejonski detergent Tween 20 (Sigma Aldrich), goveđi serum albumin (BSA, od eng. Bovine Serum Albumin, frakcija V, Sigma Aldrich), kompetni Frojndov adjuvans (CFA, od eng. Complete Freund's Adjuvant, Difco, Detroit, SAD), soj *Mycobacterium tuberculosis H37 RA*, reagensa za izolovanje RNK (TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, SAD), izopropil-alkohol, dezoksiribonukleotid-trifosfati (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija), nasumični heksamerni prajmeri (Fermentas), komercijalni pufer za reverznu transkripciju (Fermentas), enzim reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (Fermentas), inhibitor RNaze (Fermentas), prajmeri za gene od interesa koji su navedeni u tabeli x (Metabion), komercijalna smeša za Real Time PCR- SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas), glicerol, ditiotreitrol (DTT), Folin-Ciocalteu reagens (xxx), β -merkaptotanol (β -ME, Fluka, Nemačka), Tris-HCl (Serva), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA, Sigma Aldrich), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF, Serva), aprotinin (xxx), bromfenol plavo (USB Corporation), amonijum-persulfat (APS, Amersham Biosciences), natrijum-dodecilsulfat (SDS) (Applichem, Darmstadt, Nemačka), glicin (Serva), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), akrilamid/bisakrilamid Rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka), ECL rastvor za detekciju (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija), N-(1-naftil)etilendiamin-dihidrohlorid, sulfanilamid, fosforna kiselina (H_3PO_4), natrijum-nitrit ($NaNO_2$), dihidrorodamin (DHR, Sigma Aldrich), rastvor fluorescentno obeleženih kuglica za fagocitozu (Sigma Aldrich), rastvor magnetnih kuglica obeleženih streptavidinom (ImagSAv kuglice, BD Biosciences, San Diego, SAD), rastvor avidina konjugovanog sa peroksidazom iz rena (avidin-HRP, od engl. Horse Radish Peroxidase), anti-CD4 antitelo obeleženo biotinom (eBioscience), komercijalni parovi antitela za merenje produkcije odgovarajućih citokina (pacovski IFN- γ , IL-6, IL-1 β , IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, SAD), pacovski TNF (BD Biosciences) i mišiji/pacovski IL-17 (eBioscience)), antitela za imunofluorescentno bojenje (anti- CD4-PE, - CD11b-FITC (BD Biosciences); anti-MHC II-PE (eBioscience), anti- CD80-FITC i anti-CD86-FITC (AbDSerotec, Oxford, Velika Britanija), anti- CD11c, anti- CD134-FITC i anti – F(ab') $_2$ (eBioscience)), aneksinV-FITC (Biotium, Fremont, SAD), antitela za detekciju proteina (anti-STAT3, anti- pSTAT3 (Cell Signaling Technology, Boston, SAD), anti-p38, anti-p-p38 (Santa

Cruz Biotechnology, Dalas, SAD) anti- I κ B, - pI κ B (Cell Signaling Technology)), sekundarno antitelo konjugovano sa HRP (ECL majmunsko antizečije, GE Healthcare, Bakingemšir, Velika Britanija), konkanavalin A (ConA, Pharmacia, Upsala, Švedska).

Za gajenje biljaka korišćen je rastvor koji je u 5 L sadržavao u mM: 0.7 K₂SO₄, 0.1 KCl, 2 Ca(NO₃)₂, 0.5 MgSO₄ 0.1 KH₂PO₄ i u μ M: 0.5 MnSO₄, 0.5 ZnSO₄, 0.2 CuSO₄ 0.01 (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10 H₃BO₃.

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kulture ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 u koji je dodavan miks antibiotika penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 IU/mL), nistatina (10 U/ml), gentamicina (100 μ g/ml) i 5% FCS koji je prethodno inkubiran 30 minuta na 56 °C, u cilju inaktivisanja komponenti komplemeta. U slučaju stimulacije ćelija proteinom MBP ili peptidom MOG₃₅₋₅₅ korišćen je medijum sa 2% pacovskog seruma (RS, od eng. Rat Serum). Za gajenje DĆ korišćen je medijum za DĆ koji je sadržavao: 20% FCS, 2% L-Glu (200 mM), 2% Na-piruvat (100 mM) u RPMI-1640.

Za gajenje embriona zebrica korišćen je rastvor koji je u 1L sadržavao: 5.5 mg KCl, 294 mg CaCl₂ \times 2H₂O, 123 mg MgSO₄ \times 7H₂O i 63 mg NaHCO₃.

3.2. Metode uzgajanja biljaka, pripreme i karakterizacije biljnih ekstrakata

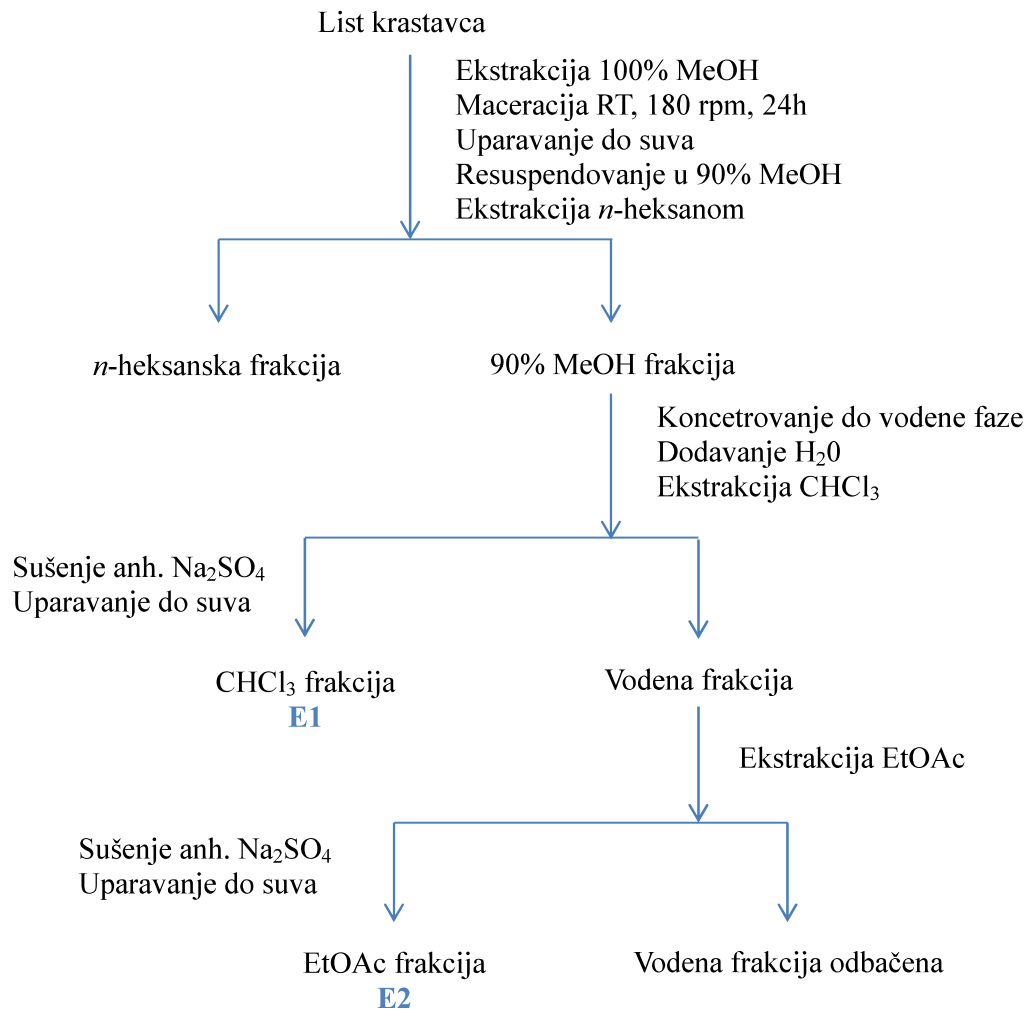
3.2.1. Uzgajanje biljaka u hidroponici

Semena krastavca (*Cucumis sativus L. cv. Chinese long*, dobijeno ljubaznošću dr Miroslava Nikolića, IMSI, Univerzitet u Beogradu) su potopljena u zasićen rastvor CuSO_4 preko noći, nakon čega su postavljena između dva vlažna filter papira i ostavljena u mraku da proključaju. Nakon 6 dana, proključala semena su prenesena u plastične posude (5 biljaka po posudi) u kojim je bilo 3 L kompletnog rastvora za uzgajanje biljaka. Gvožđe je naknadno dodato u obliku Fe(III)-EDTA u 50 mM koncentraciji. Rastvor je menjan na svakih 5 dana. Biljke su uzgajane 3 nedelje u kontrolisanim uslovima: fotoperiod 16:8h, temperatura 22°C, intenzitet svetlosti 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i relativna vlažnost oko 70%. Nakon 3 nedelje, koren, stablo i list su sakupljeni i istog trenutka zamrznuti u tečnom azotu i skladišteni na -70°C. Pored toga uzgajane su biljke kojima su ubodima sterilnom iglom nanesena mehanička oštećenja lista.

3.2.2. Priprema različitih ekstrakata krastavca

Ekstrakti lista krastavca pripremljeni su metodom particionih ekstrakcija rastvaračima različite polarnosti. 100 g lista je sprášeno u tečnom azotu i podeljeno na dva jednaka dela i ekstrahovano po protokolima prikazanim na slikama 3 i 4. Ekstrakcija i maceracija prvih 50 g je uraðena u 500 mL 100% MeOH, na sobnoj temperaturi (RT, od eng. Room Temperature), uz mešanje na 180 rpm na šejkeru (Adolf Kühner AG) u staklenim erlenmajerima od 1 L tokom 24h. Nakon isteka vremena, metanolni ekstrakt je proceden kroz filter papir, prebačen u balon za uparavanje i uparen do suva koristeći vakuum uparivač (Rotavapor R-200, Buchi). Talog u balonu je resuspendovan u 100 mL 90% MeOH i ekstrahovan sa 100 mL *n*-heksana (3 × 33 mL) u levku za ekstrakciju. Heksanski sloj je potom odbačen, a 90% MeOH frakcija je koncentrovana pod sniženim pritiskom do vodene faze. Zatim je vodenoj fazi dodata voda do 100 mL i vodeni sloj je ekstrahovan sa 100 mL CHCl_3 (3 × 33 mL). Dobijena CHCl_3 frakcija je osušena upotrebom anhidrovanog Na_2SO_4 , a zatim uparena do suva, rastvorena u EtOH do željene koncentracije i označena kao E1. Vodeni sloj zaostao nakon ekstrakcije sa CHCl_3 je podvrgnut ekstrakciji sa 100 mL EtOAc (3 × 33 mL).

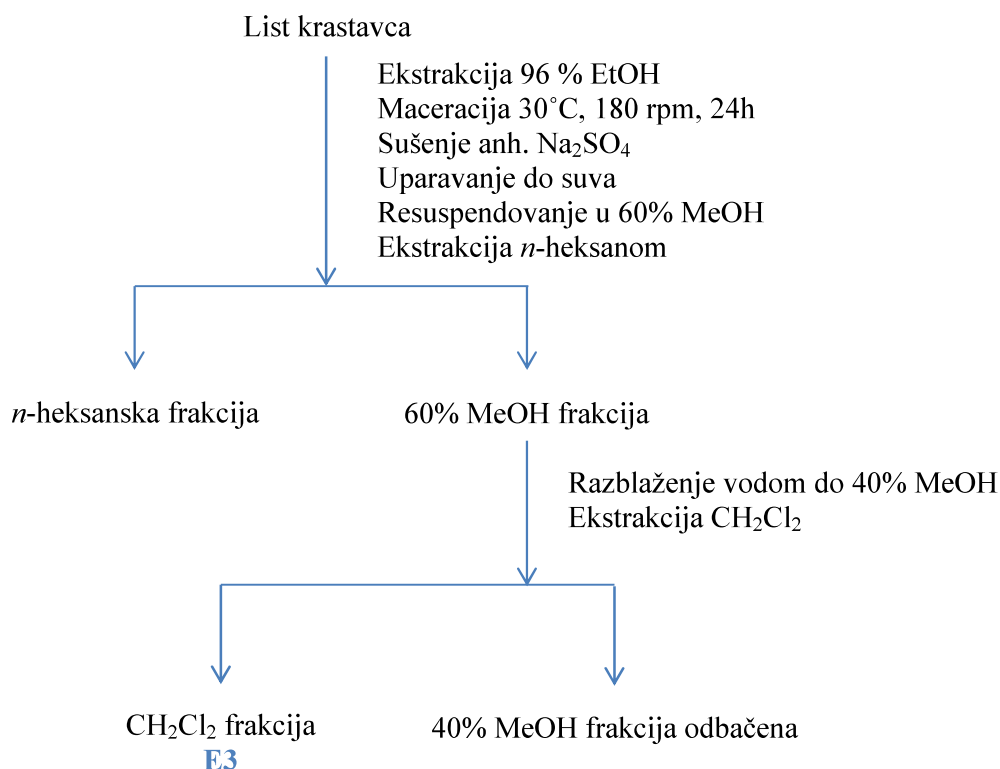
Dobijena EtOAc frakcija je osušena upotrebom anhidrovanog Na_2SO_4 , uparena do suva, rastvorena u EtOH do željene koncentracije i označena kao E2. Vodeni sloj zaostao nakon ekstrakcije sa EtOAc je odbačen.



Slika 3. Shematski prikaz protokola 1 ekstrakcije lista krastavca.

Drugi 50 g lista je ekstrahovano po protokolu sličnom prethodnom. Ekstrakcija je urađena u 500 mL 96% EtOH, a maceracija izvedena na isti način kao u prethodnom protokolu. Nakon 24h, etanolni ekstrakt je proceđen kroz filter papir, osušen upotrebom anhidrovanog Na₂SO₄ i uparen do suva. Nakon toga, talog je resuspendovan u 100 mL 60% MeOH i ekstrahovan sa 100 mL *n*-heksana (3 × 33 mL).

Heksanski sloj je odbačen, a 60% MeOH frakcija je razblažena vodom do 40% MeOH i ekstrahovana sa 100 mL CH₂Cl₂ (3 × 33 mL). CH₂Cl₂ frakcija je osušena anhidrovanim Na₂SO₄, a zatim uparena do suva, rastvorena u EtOH do željene koncentracije i označena kao E3. Ekstrahovani 40% MeOH sloj je odbačen.



Slika 4. Shematski prikaz protokola 2 ekstrakcije lista krastavca.

Ekstrakti korena i stabla krastavca su pripremljeni na isti način kao ekstrakt lista po protokolu 2.

3.2.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakta lista krastavca

Hromatografsko razdvajanje jedinjenja je rađeno upotrebom tečne hromatografije ultravisokih performansi (UHPLC, od eng. Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography) sa kvaternom pumpom Accela 600 i uzorkivačem Accela (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). UHPLC sistem je bio povezan sa lenearnim jonskim trapom - OrbiTrap hibridnim masenim spektrometrom (LTQ OrbiTrap MS) koji je opremljen zagrejanim jonizacionim izvorom elektrospreja (HESI-II, od engl. Heated Electrospray Ionization Probe, ThermoFisher Scientific). Za razdvajanje jedinjenja je korišćena C18 kolona (100 × 2.1 mm, veličina čestica 1.7 μm, Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza se sastojala od rastvora (A) vode + 0.1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Za eluiranje je korišćen linearni gradijent rastvarača protoka 0.300 mL/min u sledećim uslovima: 0.0–1.0 min 5% (B), 1.0–16.0 min od 5% do 95% (B), 16.0–16.1 min od 95% do 5% (B), zatim 5% (B) 4 min. Zapremina uzorka je bila 5 μL (2 mg/mL) u MeOH.

Maseni spektrometar je bio podešen u negativnom jonizacionom modu. Parametri HESI su bili sledeći: voltaža izvora 4.5 kV, voltaža kapilare -10 V, voltaža optike -35 V, temperatura kapilare 300 °C, pri protoku gasa N₂ od 32 i 8 odgovarajućih jedinica (AU, od eng. Arbitrary Units). Maseni spektri su snimani u opsegu masa od 100 do 1500 m/z pri rezoluciji 30 000. Fragmentacija MS² je rađena na najintezivnijim jonima detektovanim u opsegu MS spektra. Joni od interesa su izolovani jon-trapom i aktivirani sa 35% nivoom kolizione energije. Smanjenje ponavljanja identičnih jona prekursora u analizi je urađeno kao što je ranije opisano (Banjanac i sar., 2017). Jedinjenja su identifikovana na osnovu karakteristika spektara: maseni spektar, tačna masa, karakteristična fragmentacija i karakteristično retenciono vreme. Za kontrolu instrumenta, prikupljanje i obradu podataka je korišćen softverski paket Xcalibur (verzija 2.1, Thermo Fisher Scientific). Analiza čitavog spektra je urađena kako bi se detektovale monoizotopske mase nepoznatih jedinjenja sa nivoom fragmentacije do MS⁴. Za računanje masa jedinjenja korišćen je program ChemDraw (verzija 12.0).

Kvantitativna analiza metanolnog ekstrakata lista krastavca je rađena korišćenjem UHPLC sistema Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) povezanog sa tripl-kvadrupol masenim spektrometrom (TSQ Quantum Access Max, Thermo Fisher Scientific, Bazel, Švajcarska). Za razdvajanje jedinjenja korišćena je C18 kolona (50×2.1 mm) sa veličinom čestica $1.9 \mu\text{m}$ (Thermo Fisher Scientific, SAD), sa pretkolonom (20×2.1 mm). Kolona je termostatorirana na 30°C . Mobilna faza se sastojala od rastvora (A) vode + 0.1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila sa protokom 0.4 mL/min i gradijentnom elucijom kao što je ranije opisano (Mišić i sar., 2015). Zapremina uzorka je bila $10 \mu\text{L}$ u MeOH.

Uslovi rada masenog spektrometra sa HESI izvorom su bili sledeći: temperatura isparavanja 350°C , voltaža spreja 3510 V , gas N_2 na pritiscima 28 AU, 0 AU i 4 AU sa temperaturom kapilare 270°C , naponom kapilare 35 V i naponom skimera 0 V . Za kvantifikaciju jedinjenja u uzorcima korišćena je metoda selektivnog reakcionog praćenja (SRM, od eng. Selected Reaction Monitoring). Podaci su prikupljeni u negativnom modu, dok je za fragmentaciju korišćen argon kao kolizioni gas. Jedinjenja su kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda u opsegu koncentracija od $0.001 \mu\text{g/mL}$ do $100 \mu\text{g/mL}$. Koncentracija jedinjenja je izražena u $\text{ng}/100 \text{ mg}$ suvog ekstrakta. Koncentracija 4 jedinjenja koja pripadaju kukurbitacinima je određena na osnovu standardne prave napravljene za KukB. Za kontrolu instrumenta, prikupljanje i obradu podataka je korišćen softverski paket Xcalibur.

3.3. Metode indukcije eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

3.3.1. Eksperimentalne životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su ženke pacova genetički visokosrodnog soja Dark Aguti (DA), starosti od 2 - 3 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, (Br. 2-10/15).

3.3.2. Imunizacija životinja

Za imunizaciju životinja su korišćeni MBP (1 mg/mL) ili peptid MOG₃₅₋₅₅ (2 mg/mL) emulgovni istom količinom CFA koji je sadržao 5 mg/mL toplotom ubijenih i liofilizovanih bakterija *Mycobacterium tuberculosis H37 RA*. Za praćenje toka kliničke slike aktivni EAE je indukovao imunizacijom pacova homogenatom kičmene moždine (HKM) u puferisanom fiziološkom rastvoru (PBS, 50% w/v) emulgovanim istom količinom CFA. EAE je indukovao intradermalnom injekcijom po 100 µL encefalitogene emulzije u zadnje šape pacova.

3.3.3. Primena ekstrakta lista krastavca na pacovima *in vivo*

ELK je primenjivan u emulziji za imunizaciju. Za *in vivo* eksperimente korišćene su emulzije: MOG₃₅₋₅₅ + CFA + ekstrakt lista krastavca (0.5 mg/mL) i HKM + CFA + ekstrakt lista krastavca (1 mg/mL).

3.3.4. Evaluacija kliničke slike

Klinička slika razvoja EAE je praćena svakodnevno od dana imunizacije životinje, a stepen težine bolesti izražavan je kroz skalu od 0 do 4 na sledeći način: 0, odsustvo kliničkih manifestacija bolesti; 1. atonija repa; 2. pareza zadnjih ekstremiteta; 3. paraliza zadnjih ekstremiteta i 4. moribundno stanje ili smrt životinje.

Stepeni 2 i 3 često su bili udruženi sa inkontinencijom urina i fecesa. U slučaju kada su neurološki znaci bili slabije izraženi od tipičnih za određeni stepen, korišćene su i intermedijarne vrednosti (npr. jedan i po za vrlo blago izraženu parezu zadnjih ekstremiteta).

3.4. Metode izolovanje ćelija i tkiva

3.4.1. Izolovanje ćelija drenirajućeg limfnog čvora

Sedmog dana nakon imunizacije tj. u induktivnoj fazi bolesti, životinje su žrtvovane i izvađeni su drenirajući (poplitealni) limfni čvorovi (DLČ) i iz njih izolovane ćelije. Tkivo je homogenizovano u PBS protiskivanjem kroz metalne mrežice i potom filtrirano kroz konusne najlonske mrežice promera 70 μm . Dobijena ćelijska suspenzija je cetrifugirana (500 g, 3 min), a ćelije su resuspendovane u 2% RS RPMI-1640 i prebrojane. Ćelije DLČ su dalje iskorišćenje za uspostavljenje kulture ćelija u kojem su stimulisane odgovarajućim antigenom i tretirane različitim ekstraktima i jedinjenjima kukurbitacin B i kukurbitacin E. Dalje, ćelije DLČ su iskorišćene i za izolavanje CD4^+ T limfocita ili za analizu na protočnoj citofluorimteriji u *ex vivo* eksperimentima. U svim koracima, od početka do kraja izolovanja ćelija drenirajućih limfnih čvorova korišćeni su sterilni rastvori i pribor.

3.4.2. Prečišćavanje CD4^+ T ćelija magnetnom separacijom

Izolovane ćelije DLČ su resuspendovane u 800 μL hladnog pufera za obeležavanje ćelija antitelima (3% FCS PBS) i dodato im je 10 μL anti-CD4 antitela obeleženog biotinom. Sve je rađeno u plastičnim tubama od 2 mL (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka). Ćelije su inkubirane 1h na ledu uz povremeno mućkanje. Nakon toga, ćelije su prane dva puta sa 1 mL PBS i jednom sa 1 mL hladnog pufera za magnetne kuglice (0,5% BSA, 2 mM EDTA PBS) i finalno resuspendovane u 800 μL ovog pufera. Ovako pripremljenoj ćelijskoj suspenziji je dodato 40 μL magnetnih kuglica obeleženih streptavidinom i suspenzija je ostavljena 1h na $+4^\circ\text{C}$ uz povremeno mućkanje. Potom je ćelijska suspenzija izlagana magnetnom polju u trajanju od 8 min. Magnetne kuglice su se pod uticajem magnetnog polja lepile za zidove epruvete povlačeći sa sobom CD4^+ T ćelije koje su bile vezane za magnetne kuglice interakcijom streptavidin-biotin.

Rastvor iz epruveta je pažljivo odstranjen dok se još uvek nalazio u magnetnom polju, a ćelije zalepljene za zidove epruvete su ponovo resuspendovane u 800 μL rastvora za vezivanje magnetnih kuglica. Postupak izlaganja magnetnom polju je ponavljan još 2 puta u trajanju od 4 min u cilju dobijanja visoko prečišćenih CD4^+ T limfocita.

Na kraju, ćelije su resuspendovane u medijumu sa 5% FCS i prebrojane. CD4⁺ T limfociti su dalje iskorišćeni za uspostavljanje kulture ćelija sa različitim ekstraktima i jedinjenjima kukurbitacin B i kukurbitacin E nakon čega su iskorišćenje za izolaciju RNK i ukupnih protein.

3.4.3. Izolovanje infiltrata kičmene moždine

Infiltrati kičmene moždine (KM) izolovani su iz životinja imunizovanih HKM + CFA. Na piku bolesti (klinički slika 2 - 3) životinje se žrtvovane i izvađene su kičmene moždine. U cilju eliminisanja ćelija prisutnim u krvnim sudovima iz KM, životinje su najpre perfundovane sterilnim rastvorom PBS. KM su izolovane iz perfundovanih životinja i držane na ledu do narednog koraka. KM su homogenizovane u rastvoru PBS protiskivanjem kroz metalne mrežice. Dobijena ćelijska suspenzija je cetrifugirana (800 g, 3 min), a talog je resuspendovan u 3 mL 30% Perkola i nanesen na 2,5 mL 70% Perkola pri čemu se formirao koncentracijski gradijent Perkola. Izotonične koncentracije Perkola su pripremane od štoka koji je pravljen mešanjem 9 V Perkola i 1 V 10 x koncentrovanog PBS. Nakon centrifugiranja u trajanju od 50 minuta na 870 g u plastičnim tubama mogao se uočiti beli prsten infiltriranih ćelija KM koji se nalazio na granici dva sloja. Interfazni prsten je pažljivo sakupljan i pran od ostataka Perkola u PBS. Ćelijska suspenzija je centrifugirana (900 g, 10 min), a ćelije resuspendovane u medijumu sa 5% FCS i brojane. Infiltrati KM (IKM) su iskorišćeni za uspostavljanje kulture ćelija sa ekstraktom lista krastavca i jedinjenjima kukurbitacina B i E. I u ovom protokolu kao i u prethodnom se vodilo računa o sterilnosti u radu.

3.4.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka

Ćelije peritonealnog ispirka (PEC, od eng. Peritoneal Exudate Cell) su dobijene ubrizgavanjem po 10 mL sterilnog hladnog PBS u peritonealnu šupljinu pacova i sakupljanjem peritonealne tečnosti u sterilne epruvete. Za dobijanje kulture PEC, peritonealni ispirak je centrifugiran (500 g, 3 min). Dobijene ćelije PEC su iskorišćenje za dobijanje populacije peritonealnih makrofaga, uspostavljanje kulture makrofaga i njihov tretman ekstraktom lista krastavca i jedinjenjima KukB i KukE.

3.4.5. Dobijanje dendritskih ćelija iz matičnih ćelija kostne srži

Iz DA pacova je vađen femur i stavljen u 10% FCS RPMI-1640. Kost je sečena sa obe strane i sadržaj ispiran sa 10 mL 10% FCS RPMI-1640 u petri šolju. Krvave krpice su razbijane pipetiranjem. Sadržaj petri šolje je potom prebacivan u tube od 50 mL i centrifugiran (500 g, 5 min). Supernatant je odlivan, a ćelijski talog je resuspendovan u 1 mL pufera za lizu eritrocita u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena, reakcija liziranja je prekidana sa 9 mL 10% FCS RPMI-1640 i ćelije su profiltrirane kroz konusne najlonske mrežice promera 70 μm i centrifugirane (500 g, 5 min). Ćelijski talog je resuspendovan u medijumu za gajenje DĆ i ćelije su prebrojavane.

U cilju dobijanja DĆ, ćelije kostne srži su postavljane u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/mL u ploči sa 24 bunara i stimulisane sa GM-CSF (20 ng/mL). Medijum je menjan svaki drugi dan narednih 6 dana, tako da je polovina medijuma zamenjenjivana svežim i novom količinom GM-CSF. Ćelije su razdvajane 4 dana tako što je pipetom uz blago mućkanje polovina medijuma (500 μL) zajedno sa ćelijama prebacivana u nove bunare, a ostatak medijuma do 1 mL nadoknađivan svežim medijumom i propisanom količinom GM-CSF. Sedmog dana DĆ su stimulisane LPS u cilju dobijanja zrelih DĆ i tretirane ekstraktom lista krastavca i dalje korišćenje za eksperimente ko-kultivacije sa CD4^+ T limfocitima.

3.4.6. Određivanje broja ćelija

Broj ćelija u dobijenim ćelijskim suspenzijama je određen brojanjem živih ćelija pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u, pri čemu je 20 μL ćelijske suspenzije mešano sa 180 μL 0.1% rastvorom TB i nanošeno na komoru. Mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušene građe membrane) nisu brojane.

3.4.7. Uspostavljanje kulture ćelija

Na osnovu dobijenog broja ćelija, ćelijska suspenzija DLČ je razblaživana medijumom sa 2% RS RPMI-1640 kako bi se dobila željena koncentracija ćelija za dalje eksperimente. Ćelije su kultivisane u ploči za kultivisanje sa 24 bunara (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka). Svaki bunar je sadržavao približno 5×10^6 ćelija u 1 mL. Ćelije su u zavisnosti od prethodne imunizacije restimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ ili MBP u finalnoj koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$ i tretirane različitim koncentracijama ekstrakata ili KukB ili Kuke. Ploča je zatim inkubirana 24 časa u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO₂ od 5 %. Nakon 24h, sadržaji bunara su sakupljeni i centrifugirani (500 g, 3 min), supernatanti su korišćeni za merenje produkcije citokina testom ELISA, a ćelijski talozi su korišćeni za merenje metaboličkog vijabiliteta ćelija testom MTT ili za izolaciju RNK.

CD4⁺ T limfociti dobijeni prečišćavanjem iz ćelija DLČ su stimulisani anti-CD3 i anti-CD28 antitelima u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$ i tretirani različitim koncentracijama ekstrakata ili KukB ili Kuke. Ćelije su kultivisane u ploči za kultivisanje sa 24 bunara. Ploča je inkubirana 24 časa u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37°C i pri koncentraciji CO₂ od 5 %. Nakon isteka vremena, sadržaji bunara su sakupljeni i centrifugirani (500 g, 3 min), supernatanti su korišćeni za merenje produkcije citokina testom ELISA, a ćelijski talozi su korišćeni za merenje metaboličkog vijabiliteta ćelija testom MTT ili za izolaciju RNK. U eksperimentima koji su zahtevali analizu unutarćelijskih signalnih puteva, 2.5×10^6 CD4⁺ T limfocita je kultivisano u 5% FCS RPMI-1640, i tretirano ekstraktima lista krastavca (10 $\mu\text{g/mL}$) ili Kuke (50 ng/mL) u trajanju od 30 i 60 min, nakon čega su ćelije iz oba tretmana korišćene za pripremu uzoraka za analizu na Western blotu ili za izolaciju RNK u slučaju tretmana sa Kuke.

Infiltrati KM dobijeni iz KM na piku bolesti EAE su kultivisani u ploči sa 24 bunara u koncentraciji 2×10^6 ćelija/mL u 5% FCS RPMI-1640 u prisustvu ekstrakta lista krastavca (10 $\mu\text{g/mL}$) ili KukB (50 ng/mL) ili Kuke (50 ng/mL). Nakon inkubacije od 24h, ćelije su centrifugirane (500 g, 3 min), a supernatanti korišćeni za merenje produkcije citokina testom ELISA.

Ćelije PEC su korišćene za dobijanje kulture peritonealnih makofaga. Ćelije su kultivisane u ploči za kultivisanje sa 24 bunara. U svaki bunar je dodato po 300 μL ćelijske suspenzije koja je sadržala 2×10^6 ćelija. Ploča je zatim inkubirana 2h u inkubatoru kako bi se peritonealni makrofagi adherirali za dno bunara ploče. Nakon inkubacije supernatant je odbačen, bunari isprani 2×1 mL PBS, pri čemu su ćelije koje su adherirale za podlogu smatrane makrofagima, a potom je dodat medijum za kultivaciju ćelija. Ćelije su stimulisane LPS (10 ng/mL) i tretirane ekstraktom lista krastavca (5 i 10 $\mu\text{g/mL}$), ili KukB (50 ng/mL) ili Kuke (50 ng/mL). Inkubacija kulture je trajala 24h. Nakon 24h, supernatanti su sakupljeni u cilju određivanja produkcije citokina testom ELISA i produkcije nitrta metodom po Grisu, a ćelije su korišćene za merenje vijabilnosti testom CV ili za merenje nivoa ekspresije površinskih molekula, nivoa fagocitoze, produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, od eng. Reactive Oxygen Species) metodom protočne citofluorimetrije.

DĆ dobijene iz ćelija kostne srži diferencijacijom u prisustvu GM-CSF, sedmog dana su stimulisane LPS (100 ng/ml) i tretirane ekstraktom lista krastavca (10 $\mu\text{g/mL}$) u trajanju od 24h. Nakon toga ćelije su analizirane metodom protočne citofluorimetrije ili su tretirane peptidom MOG₃₅₋₅₅ u cilju pripreme za ko-kultivaciju sa CD4⁺ T limfocitima.

3.4.8. Ko-kultivacija dendritskih ćelija sa CD4⁺ T limfocitima

DĆ dobijene iz ćelija kostne srži diferencijacijom u prisustvu GM-CSF, sedmog dana su stimulisane LPS (100 ng/ml) i tretirane ekstraktom lista krastavca (10 $\mu\text{g/mL}$) u trajanju od 24h. Nakon toga u kulturu je dodat peptid MOG₃₅₋₅₅ (10 $\mu\text{g/mL}$) u trajanju još 24h. CD4⁺ T limfociti su izolovani sedmog dana metodom magnetne separacije iz DLČ životinja prethodno imunizovanih sa MOG₃₅₋₅₅ u CFA.

DĆ i CD4⁺ T limfociti su pomešani u odnosu 1:10 u U-ploči sa 96 bunarića u ukupnoj zapremini od 250 µL u medijumu za DĆ. Čelije su inkubirane narednih 120h u inkubatoru, nakon čega su supernantanti sakupljeni za određivanje produkcije citokina metodom ELISA.

3.5. Testovi za određivanje funkcija ćelija imunskog sistema

3.5.1. Merenje vijabilnosti ćelija testom MTT

Metabolička vijabilnost neadherentnih ćelija je određivana kolorimetrijskim testom MTT. Test je zasnovan na redukciji tetrazolijumove soli MTT pomoću mitohondrijskih oksidoreduktaza pri čemu nastaje nerastvorno ljubičasto obojeno jedinjenje formazan. Uzorci kultura ćelija u kojima je trebalo da se odredi vijabilnost ćelija su prebačeni u tube od 1.5 mL i centrifugirani (500 g, 3 min). Nakon toga, supernatanti su odliveni, a talogu ćelija je dodato po 300 μ L 0.5 mg/mL rastvora MTT u medijumu za kultivisanje ćelija. Uzorci su inkubirani 1 - 2h u inkubatoru nakon čega su ponovo centrifugirani (500 g, 3 min), ćelijski talog je resuspendovan u 200 μ L DMSO i razliven u triplikatima (po 50 μ L) u ploču sa 96 bunarića. Apsorbancija rastvora je merena pomoću spektrofotometra (Titertek) na 540 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao procenat ili kao A_{540} .

3.5.2. Merenje vijabilnosti ćelija testom CV

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

3.5.3. Merenje produkcije citokina testom ELISA

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura je određivana primenom testa ELISA. U tu svrhu korišćene su mikrotitar ploče MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska) sa 96 mesta (bunarića) i komercijalni parovi antitela za merenje koncentracija odgovarajućih citokina: IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17 i IL-10 (eBioscience). Sam postupak izvođenja metode obavljen je prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Prvi korak je podrazumevao oblaganje bunarića ploča odgovarajućim primarnim antitelom (50 μ L u bunariće) u razblaženju preporučenom od strane proizvođača, u rastvoru PBS preko noći. Nakon inkubacije, ploče su ispirane 3 \times 0.05% rastvorom Tween 20 u PBS (tPBS). Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela za ploču rađeno je rastvorom 10% FCS PBS (za citokine IFN- γ , IL-17, IL-10 i TNF), odnosno 1% BSA PBS (za citokine IL-1 β i IL-6). Nakon ponovnog ispiranja, uzorci i standardi su nanošeni (50 μ L u bunariće) i ploče su inkubirane 2h na sobnoj temperaturi. Sledilo je ponovno ispiranje rastvorom tPBS i dodavanje sekundarnog antitela obeleženog biotinom odgovarajućeg razblaženja u odgovarajućem rastvoru za blokiranje. Nakon 1h inkubiranja u rastvoru sekundarnog antitela, ploče su ispirane i dodavan je rastvor avidina konjugovanog HRP, 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su ponovo ispirane (3 \times tPBS) i dodavano je po 50 μ L TMB, supstrata za peroksidazu. Po razvijanju boje reakcija je prekidana 50 μ L 1M HCl, a apsorbancija merena pomoću spektrofotometra (Titertek) na 450 nm. Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Količina citokina (ng/mL) određivana je korišćenjem standardne prave dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za rekombinantni citokin koji je prethodno serijski razblažen.

3.5.4. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula i protočna citofluorimetrija

Fenotipska karakterizacija ćelija DLČ, infiltrata KM, makrofaga i DĆ je vršena tehnikom direktne i indirektno imunofluorescencije korišćenjem protočnog citofluorimetra (CyFlow Space, Partec, Munster, Nemačka). U DLČ ispitivana je ekspresija površinskih molekula CD4, CD134, MHC II i CD80. Na makrofagima je detektovan nivo ekspresije MHC II, CD86 i CD11b, a na DĆ MHC II i CD86.

Po dobijanju suspenzije ćelija, ćelije su prebacivane u plastične epruvete za protočnu citofluorimetriju (u broju od 5×10^5 do 1×10^5) i centrifugirane (800 g, 3 min). Posle centrifugiranja i odlivanja supernatanta ćelije su resuspendovane u 100 μ L 10% RS u PBS i dodavana su antitela odgovarajućeg razblaženja. Ćelije su inkubirane 30 min na 4 °C u mraku. Po isteku inkubacije, ćelije su ispirane 2×1 mL PBS, centrifugirane (800 g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 mL PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

3.5.5. Merenje nivoa apoptoze

Apoptotične ćelije su detektovane metodom protočne citofluorimetrije pomoću aneksinV-FITC proteina koji se vezuje za fosfatidilserin na spoljašnjoj površini membrane ćelija koje ulaze u proces apoptoze. Uzorci ćelija (1×10^6) su prebacivani u plastične epruvete za protočnu citofluorimetriju i centrifugirani (500 g, 3 min). Nakon centrifugiranja, supernatanti su odlivani, ćelijski talog je resuspendovan u 100 μ L ABB i dodavan je aneksinV-FITC odgovarajućeg razblaženja. Ćelije su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega su uzorci ispirani sa 1 mL ABB i finalno resuspendovani u 2 mL ABB i analizirani na protočnom citofluorimetru.

3.5.6. Merenje nivoa fagocitoze

Nivo fagocitoze je određivan u makrofagima i dendritskim ćelijama metodom protočne citofluorimetrije. Fluorescentno obeležene kuglice za fagocitozu su preopsonizovane u 50% FCS PBS, 1h na 37 °C. Rastvor kuglica (500 μ L) u preporučenom razblaženju je stavljan preko makrofaga i dendritskih ćelija koji su bili u kulturi 24h sa LPS i inkubiran 1h u inkubatoru. Nakon isteka inkubacije, rastvor je sklonjen, ćelije su ispirane 2×1 mL PBS i dodato je po 300 μ L duplo razblaženog radnog rastvora TB (1-2 min) u cilju gašenja zelene fluorescence koja potiče od kuglica koje su se polepile po površini samih ćelija. Rastvor TB je odlivan, ćelije su ispirane 2×1 mL PBS, skidane sa podloge, centrifugirane (500 g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 mL PBS i analizirane protočnom citofluorimetrijom.

3.5.7. Merenje produkcije reaktivih vrsta kiseonika

Produkcija ROS u makrofagima je određivana metodom protočne citofluorimetrije. Po 500 μ L 1 μ M DHR u 10% RS RPMI je stavljano preko makrofaga. Čelije su inkubirane 30 min u inkubatoru. Nakon 30 min, supernatanti su odlivani, a preko ćelija je dodavan rastvor LPS (100 ng/mL) u medijumu u cilju stimulacije produkcije ROS i ćelije su dodatno inkubirane 90 min u inkubatoru. Nakon isteka inkubacije, ćelije su ispirane 2×1 mL PBS, skinute sa podloge, centrifugirane (500 g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 mL PBS i analizirane protočnom citofluorimetrijom.

3.5.8. Merenje produkcije azot monoksida

Produkcija NO od strane makrofaga je određivana Grisovom reakcijom koja se zasniva na određivanju koncentracije nitrita kao indikatora proizvodnje NO. U cilju stimulacije produkcije NO makrofagi su tretirani LPS. Ukratko, 50 μ L supernatanta iz svakog bunara pomešano je sa 50 μ L Grisovog reagensa (1:1 rastvor 0.1% naftiletildiamin dihidrohlorida i 1% sulfanilamida u 5% H_3PO_4). Apsorbancija tako nastalog rastvora merena je u mikrotitar ploči na spektrofotometru (Titertek) na 570 nm, a koncentracija nitrita izračunavana na osnovu kalibracione prave dobijene određivanjem apsorbancija poznatih koncentracija $NaNO_2$.

3.5.9. Metoda reakcije lančanog umnožavanja (PCR)

3.5.9.1. Izolovanje ukupne RNK

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

Vodena faza je prebacivana u plastične tube od 1.5 mL u koje je već odmereno 300 μ L izopropil-alkohola, a ostatak je odbacivan. Nakon izlaganja temperaturi od -20°C u trajanju od 30 min sledilo je ponovno centrifugiranje (12000 g, 20 min, $+4^{\circ}\text{C}$). RNK je precipitirala na dnu, a supernatanti su odlivani. Talog je ispiran dodavanjem 500 μ L 70% etanola, i centrifugiran (12000 g, 10 min, $+4^{\circ}\text{C}$). Etanol je odlivan, a talog RNK je sušen i finalno rastvaran u 13 μ L vode bez nukleaza (eng. RNase Free Water). Alternativno za određivanje realtivne promene miRNK uzorci su resuspendovani u 26 μ L.

U oba slučaja, po 3 μ L uzorka je uzimano za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije RNK. Pravljeni su dva razblaženja svakog uzorka: 1 μ L + 49 μ L vode i 2 μ L + 48 μ L vode. Koncentracija RNK ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) je merena u uzorcima zadavanjem programa za određivanje koncentracije RNK na spektrofotometru. Finalna koncentracija je računata kao srednja vrednost iz dva merenja različitog razblaženja. Na osnovu dobijene koncentracije RNK izračunata je količina (μg) RNK u uzorcima. Takođe, meren je i odnos apsorbancija A_{260}/A_{280} koji je govorio o čistoći uzoraka.

3.5.9.2. Reakcija reverzne transkripcije (RTs)

Reakcija RTs se koristi da bi se izolovana RNK prevela u cDNK. Za reakciju RTs su korišćene jednake količine (1 - 3 μg) RNK svakog uzorka. U 11.5 μ L svakog uzorka je dodato po 1 μ L nasumičnih heksamernih prajmera. Uzorci su inkubirani 5 min na 70°C , a potom prebacivani na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 7.5 μ L rastvora koji je po uzorku sadržao: 4 μ L koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju, 0.5 μ L inhibitora RNaze, 2 μ L smeše dNTP (10 mM) i 1 μ L enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije. Finalna zapremina reakcione smeše je bila 20 μ L. Reakcije je nastavljena inkubacijom 10 min na 25°C , a potom 60 min na 42°C . Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70°C tokom 10 minuta i na 95°C tokom 3 minuta. Uzorci cDNK su čuvani na $+4^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe. Za prevođenje molekula miRNK u cDNK koristili su se miRNK specifični prajmeri (Stem-loop prajmeri, Invitrogen, Carlsbad, SAD, Tabela 1).

Svaki uzorak je bio podeljen na dve reakcione smeše od po 11.5 μL . Jedna reakciona smeša je služila za prevođenje miRNK u cDNK upotrebom miRNK specifičnog prajmera, a druga za standardnu reakciju RT. U svaku reakcionu smešu je dodavano po 1 μL odgovarajućeg prajmera, nakon čega je nastavljeno sa reakcijom RTs kao što je već opisano.

3.5.9.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-time qPCR, od eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction) korišćena je za analizu relativne promene transkripcije iRNK gena od interesa. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bunarčića adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmpTM Optical, Applied Biosystems, SAD) i u bunariće je dodavano po 8 μL reakcione smeše za PCR. Korišćene su po dve reakcione smeše u duplikatu za svaki uzorak, jedna za gen od interesa, a druga za referentni gen (*Gapdh* ili *U6*). Reakcione smeše za kvantitativni PCR su sadržale po uzorku: 5 μL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 1 μl specifičnih prajmera (Forward i Reverse, Tabela 1) za gen od interesa ili za referentni gen i 2 μL dejonizovane vode. Nakon nalivanja ploče sa reakcionim smešama u bunariće je dodavano po 2 μL odgovarajućeg uzorka cDNK prethodno razblaženog 5 puta u dejonizovanoj vodi. Ploča je pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, SAD), centrifugirana kratko i prenošena u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 10 minuta na 95°C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali korake od 15 sekundi na 95°C i 60 sekundi na 60°C. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Vrednosti relativnih promena miRNK određivane su u odnosu na referentni gen *U6* dok su promene svih ostalih gena određivane u odnosu na referentni gen *Gapdh* i iskazane kao $2^{-\text{dCt}}$ gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i referentnog gena.

3.5.9.4. Prajmeri

U reakciji RT za prevođenje miRNK u cDNK su korišćeni miR-155 i miR-146 Stem Loop specifični prajmer, dok su u reakciji RT-qPCR korišćeni Forward i Reverse prajmeri. Sekvence prajmera date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Sekvence prajmera korišćene u reakciji RTs i RT-qPCR.

Sekvenca (5'→3')
miR-155 Stem Loop prajmer 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC CCC TA-3'
miR-146 Stem Loop prajmer 5'-GTC GTA TCC AUC AGG GTC CGA GGT ATT CGC ACT GGA TAC GAC AAC CCA-3'
U6 <i>F</i> – 5'-TGC TTC GGC AGC ACA TAT AC-3' <i>R</i> - 5'-TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'
Gapdh <i>F</i> - 5'- TGG ACC TCA TGG CCT ACA T-3' <i>R</i> - 5'-GGA TGG AAT TGT GAG GGA GA-3'
miR-155 <i>F</i> - 5'-GGA GGT TAA TGC TAA TTG TGA TAG-3' <i>R</i> - 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
IFN-γ <i>F</i> - 5'-TGG CAT AGA TGT GGA AGA AAA GAG-3' <i>R</i> - 5'-TGC AGG ATT TTC ATG TCA CCA T-3'
IL-10 <i>F</i> - 5'-GAA GAC CCT CTG GAT ACA GCT GC <i>R</i> - 5'-TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT-3'
IL-17 <i>F</i> - 5'-ATC AGG ACG CGC AAA CAT G-3' <i>R</i> - 5'-TGA TCG CTG CTG CCT TCA C-3'
T-bet <i>F</i> - 5'-CCA ACA ATG TGA CCC AGA TGA T-3' <i>R</i> - 5'-CTG GCT CAC CGT CAT TCA-3'

TGF- β *F* - 5'-CCC TGC CCC TAC ATT TGG A-3'*R* - 5'-ACG GTG ATG CGG AAG CAC-3'

miR-146*F* - 5'-GGC GAT GAG AAC TGA ATT CCA-3'*R* - 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'

Cyp1A*F* - 5'-GGG GAG GTT ACT GGT TCT GG-3'*R* - 5'-CGG ATG TGG CCC TTC TCA AA-3'

3.5.10. Metoda Western blot**3.5.10.1. Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju**

Priprema uzoraka za analizu metodom Western blot podrazumevala je izolovanje ukupnih proteina iz ćelija. Ćelije su lizirane u 100 μ L pufera za liziranje (62.5 mM Tris (pH 6.8), 2% w/v SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT). Usled liziranja ćelija i oslobađanja DNK stvarao se sluzavi rastvor koji je homogenizovan uvlačenjem i istiskivanjem sadržaja pomoću šprica kroz igle promera 16G. Nakon toga je merena koncentracija proteina u uzorcima, metodom po Loriju. Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza proteina i bakarnih jona u alkalnoj sredini pri čemu nastaje kompleks, koji uz oksidoredukcionu reakciju fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom daje postojanu boju čija se apsorbanacija meri na 670 nm. 5 μ L uzorka je razblaživano 4 \times u dejonizovanoj vodi i dodavano je 300 μ L reagensa C koji je dobijan mešanjem rastvora 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH i 1% CuSO₄ x 5H₂O i 2% K-Na-tartarat u H₂O u razmeri 98:1:1. Nakon snažnog vorteksiranja i inkubiranja na sobnoj temperaturi 15 min dodavano je 60 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Uzorci su ponovo vorteksovani i inkubirani 30 min uz povremeno vorteksovanje, dok se boja nije razvila. Istim postupcima su tretirani i rastvori poznatih koncentracija proteina BSA (1 - 10 mg/mL) koji su bili potrebni za pravljenje standardne prave.

Apsorbancija uzoraka i standardnih razblaženja je merena na 670 nm u mikrotitar ploči na spektrofotometru (Titertek). Nepoznata koncentracija proteina u uzorcima je određivana pomoću standardne prave poznatih koncentracija BSA.

3.5.10.2. Elektroforeza proteinskih uzoraka na SDS poliakrilamidnom gelu i transfer proteina na polivinildifluoridnu (PVDF) membranu

Uzorci (30 µg proteina) su mešani u odnosu 3:1 sa puferom za uzorke (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 20% β-ME, 0,008% bromfenol plavo, 40% glicerol), kuvani 5 min na 95 °C i nanošeni na 12% SDS poliakrilamidni gel postavljen u sistemu za elektroforezu (Biometra). Pored uzoraka nanošeni su i proteinski markeri poznatih molekulskih masa (PageRuler, Thermo Fisher Scientific). Sistem je nalivan Tris-glicinskim puferom, a elektroforeza se odvijala u uslovima jačine struje od 25 mA kroz koncentrujući gel i 30 mA kroz gel za razdvajanje.

Nakon završene elektroforeze, gelovi su vađeni iz sistema nakon čega je sledio transfer proteina sa gela na polivinildifluoridnu (PVDF) membranu korišćenjem polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Gethingen, Nemačka). Jačina struje prilikom transfera je bila 5 mA/cm² gela.

3.5.10.3. Vizuelizacija proteinskih traka i denzitometrijska analiza

Nakon transfera proteina sa gela na membranu sledila je detekcija proteina od interesa. Najpre su blokirana nespecifična mesta vezivanja antitela na membrani korišćenjem 5% BSA u tPBS (0,1% Tween 20 PBS), 1 h na sobnoj temperaturi. Zatim je membrana sečena u nivou molekulskih masa željenih proteina i svaki deo membrane je inkubiran preko noći na +4°C sa odgovarajućim primarnim antitelima specifičnim za proteine STAT3, p38 i IκB i njihove fosforilisane forme pSTAT3, p-p38 i pIκB (Santa Cruz) u razblaženju preporučenom od strane proizvođača.

Sledećeg dana, membrana je ispirana 5 × 5 min u rastvoru tPBS i inkubirana 1h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antelom. Nakon inkubacije membrana je ponovo ispirana 5 × 5 min u rastvoru tPBS.

Vizuelizacija specifičnih proteinskih traka na fotografskim filmovima ostvarivana je u reakciji hemiluminiscencije upotrebom ECL reagensa (GE Healthcare). Količina proteina merena je denzitometrijski pomoću softverskog programa ImageJ nakon čega je izražena kao odnos ukupne i fosforilisane forme ispitivanog proteina.

3.6. Test za određivanje toksičnosti u *in vivo* modelu zebrice

Odrasle jedinke zebrice, soja Tübingen, su gajene po standardnoj proceduri opisanoj u protoklima (Westerfield, 2007). Embrioni dobijeni nakon mrešćenja su gajeni na 28°C i praćen je njihov razvoj sledećih 72h. Tretman različitim dozama ekstrakta lista krastavca, KukB i KukE usledio je 6h nakon fertilizacije. Svaki tretman je podrazumevao prisustvo 12 embriona u 750 µL rastvora za gajenje embriona u ploči sa 24 bunara. Tretmani su izvođeni u duplikatima. Kontrolne grupe su umesto tretmana sadržale rastvarač odgovarajućeg razblaženja. Embrioni su posmatrani u tri vremenske tačke (24, 48 i 72h nakon fertilizacije) pod svetlosnim mikroskopom pri uveličanju 40x.

Praćen je razvoj embriona, odnosno smrtnost i različite morfološke promene tokom razvića (razvoj tela, glave, očiju, repa, srca, cirkulacija, skolioza, pigmentacija, deformitet žumanceta, formiranje edema). Opaženi efekti su bili značajni ako su uočeni u više od 50% embriona po tretmanu u poređenju sa kontrolnom grupom.

Svi eksperimenti na zebricama su sprovedeni u skladu sa standardnim protokolima (Westerfield, 2007).

3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (SV \pm SD) dobijene u više nezavisnih eksperimenata. Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti je korišćen Studentov t-test, Mann-Whitney test, one-way ANOVA Dunette post hoc test, two-way ANOVA Sidak post hoc test. Svi testovi su urađeni pomoću softverskog paketa Graphpad Prism 7 (Graphpad, San Diego, SAD). Vrednost parametara p manja od 0.05 je smatrana statistički značajnom.

4. Rezultati

4.1. Uporedna analiza imunomodulacijskog efekta različitih ekstrakata lista krastavca na ćelije drenirajućih limfnih čvorova i prečišćene CD4⁺ T limfocite *in vitro*

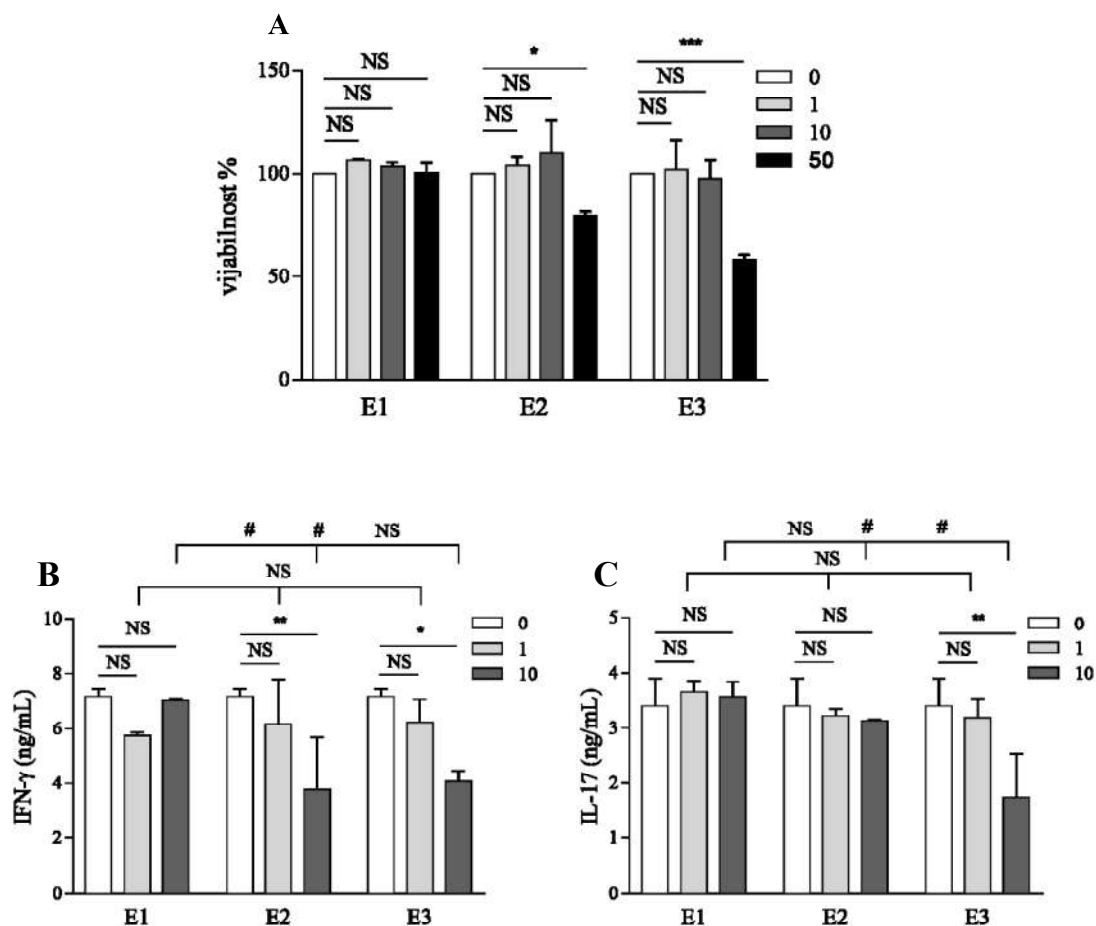
Ekstrakcijama su dobijena tri različita ekstrakta lista krastavca, poznatih koncentracija, rastvorena u etanolu i označena kao E1-3. E1 - hloroformski ekstrakt; E2 - etilacetatni ekstrakt; E3 - metilenhloridni ekstrakt.

Na početku su ispitane imunomodulacijske aktivnosti pripremljenih ekstrakata *in vitro*. Ćelije DLČ su izolovane sedmog dana nakon imunizacije DA pacova peptidom MOG₃₅₋₅₅ i tretirane različitim koncentracijama ekstrakata E1-3 u prisustvu MOG₃₅₋₅₅ u trajanju od 24h sa ciljem restimulacije T limfocita. Nakon isteka vremena, metabolička vijabilnost ćelija je određena testom MTT, dok je testom ELISA određivana produkcija glavnih proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17.

Dobijeni rezultati su poređeni u okviru samih ekstrakata, ali i ekstrakata međusobno. Rezultati testa MTT su pokazali da ekstrakti E2 i E3 u koncentracijama od 50 $\mu\text{g/mL}$ smanjuju preživljavanje ćelija DLČ nakon 24h u kulturi, dok u nižim koncentracijama od 1 i 10 $\mu\text{g/mL}$ ovaj efekat izostaje (Slika 5A). Iz tog razloga, niže koncentracije ekstrakata su izabrane za dalji rad. Hloroformski ekstrakt E1 nije imao uticaja na preživljavanje ćelija ni u jednoj primenjenoj koncentraciji.

Rezultati merenja produkcije citokina IFN- γ i IL-17 u supernatantima ćelija DLČ su pokazali da ekstrakt E3 smanjuje produkciju oba citokina u primenjenoj koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$, dok E2 u istoj koncentraciji smanjuje produkciju citokina IFN- γ . Ekstrakt E1 ne ostvaruje efekat na produkciju pomenutih citokina ni u jednoj od testiranih koncentracija (Slika 5B, C).

Poređenje produkcije ovih citokina pod uticajem netoksičnih koncentracija ispitivanih ekstrakata, pokazalo je da ekstrakt E3 ostvaruje najsnažniji uticaj na njihovo smanjenje u ćelijama DLČ.

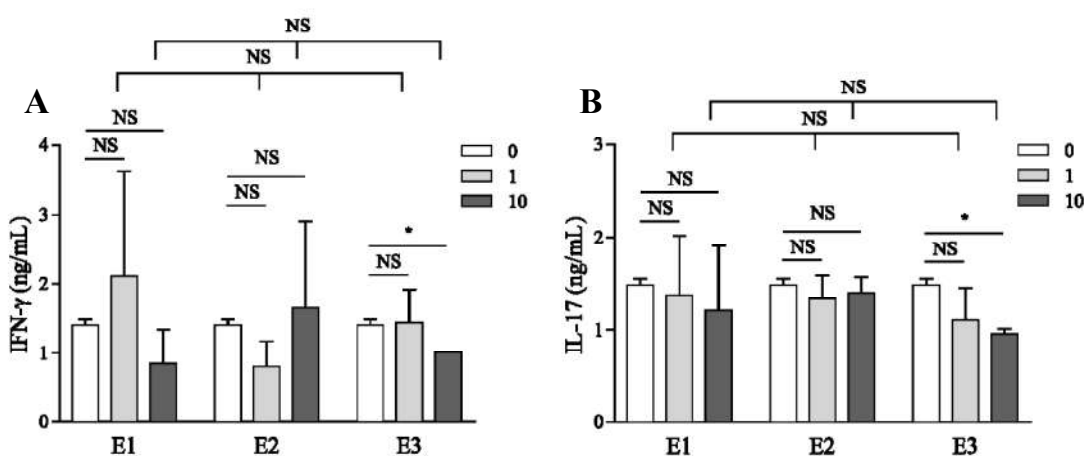


Slika 5. Efekat različitih ekstrakata lista krastavca na vijabilnost i produkciju citokina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Ćelije DLČ su stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 μg/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (1 i 10 μg/mL) ekstrakata u trajanju od 24h. Nakon 24h, metabolička vijabilnost ćelija je određena testom MTT (A). Produkcija citokina IFN-γ i IL-17 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA (B, C). Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; # p < 0.05 predstavlja statističku značajnost između istih koncentracija u različitim tretmanima; NS - bez statističke značajnosti.

Kao što je već rečeno u uvodu, CD4⁺ T limfociti, odnosno Th1 i Th17 ćelijske populacije predstavljaju glavne ćelije uključene u imunopatogenezu EAE i MS. Imajući to u vidu, sledeći cilj je bio da se ispita efekat pripremljenih ekstrakata na CD4⁺ T limfocite dobijene magnetnom separacijom ćelija DLČ iz životinja koje su prethodno imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅.

Nakon prečišćavanja magnetnom separacijom dobijeni CD4⁺ T limfociti su stimulisani 24h sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima u prisustvu 1 i 10 µg/mL ekstrakata. Produkcija citokina IFN-γ i IL-17 je merena u supernatantima ćelija testom ELISA.

Rezultati su pokazali da jedino ekstrakt E3 dovodi do smanjenja produkcije oba ispitivana citokina u koncentraciji od 10 µg/mL, kako u poređenju sa sopstvenom kontrolom, tako i u poređenju sa istim koncentracijama ekstrakata E1 i E2 (Slika 6A, B).



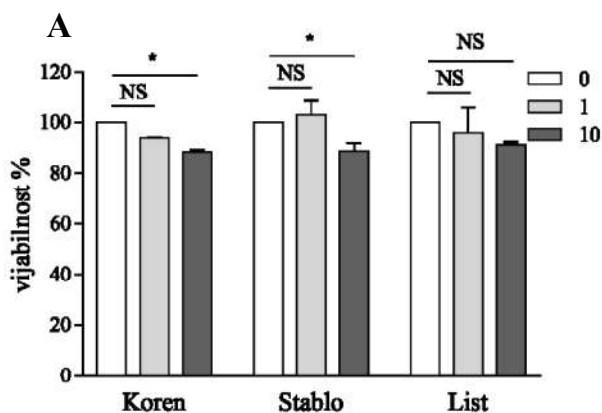
Slika 6. Efekat različitih ekstrakata lista krastavca na produkciju citokina u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ i stimulisani u prisustvu anti-CD3 i anti-CD28 antitela (1 µg/mL) i u odsustvu (0) ili prisustvu (1 i 10 µg/mL) različitih ekstrakata u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN-γ i IL-17 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA (A, B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; # p < 0.05 predstavlja statističku značajnost između istih koncentracija u različitim tretmanima; NS - bez statističke značajnosti.

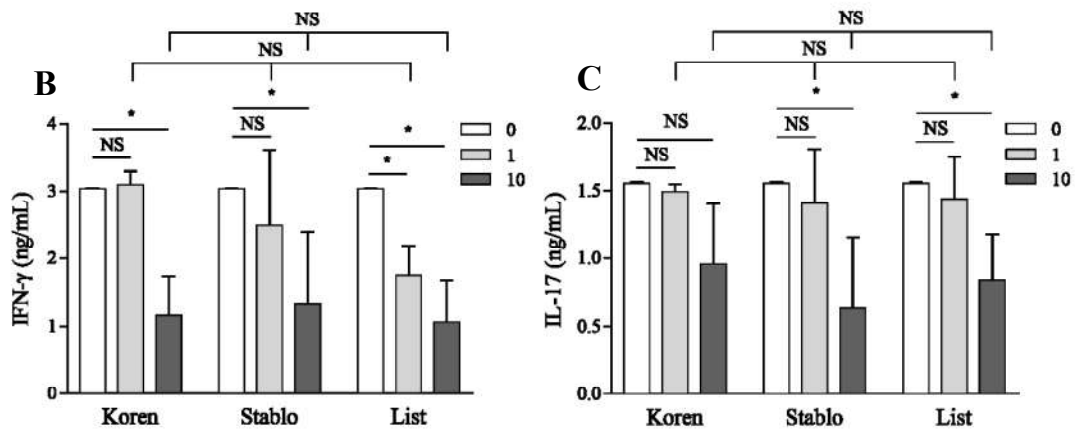
Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je ekstrakt E3 u koncentracijama koje ne utiču na preživljavanje ćelija DLČ i CD4⁺ T limfocita ostvario najizraženiji uticaj na smanjenje produkcije glavnih proinflamacijskih citokina uključenih u patogenezu EAE. Zbog toga je metoda njegove pripreme izabrana kao standardna metoda za pripremanje ekstrakata koji će biti korišćeni u svim daljim istraživanjima.

4.2. Uporedna analiza imunomodulacijskog efekta ekstrakata korena, stabla i lista krastavca na ćelije drenirajućih limfnih čvorova *in vitro*

Nakon izbora metode za pripremu ekstrakata, pripremljeni su ekstrakti korena, stabla i lista biljaka koje su gajene u normalnim uslovima i biljaka kojima su ubodom igle izazvana mehanička oštećenja (rupe) lista sa ciljem indukcije stresa i eventualnog povećanja produkcije bioaktivnih jedinjenja u biljci. Uporedno su testirani njihovi imunomodulacijski efekti. Kao i u prethodnom eksperimentu, ekstrakti su primenjeni na ćelijama DLČ imunizovanih životinja u koncentracijama od 1 i 10 $\mu\text{g/mL}$ nakon čega je merena metabolička vijabilnost ćelija testom MTT i produkcija citokina IFN- γ i IL-17.

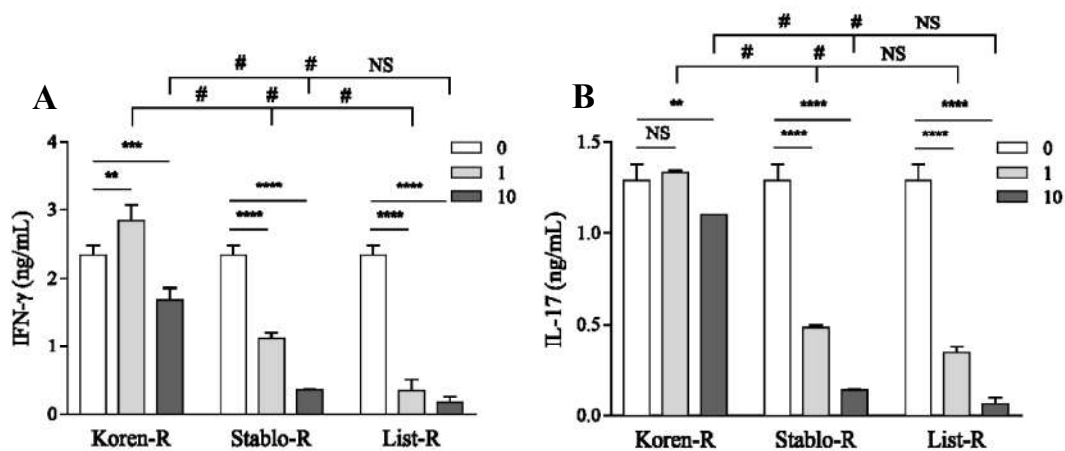
Rezultati su pokazali da ekstrakti korena i stabla smanjuju preživljavanje ćelija u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$, dok ekstrakt lista ne utiče na preživljavanje ćelija DLČ ni u jednoj od dve testirane koncentracije (Slika 7A). Sve tri vrste ekstrakata značajno su smanjile produkciju citokina IFN- γ u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$, dok je produkcija citokina IL-17 bila smanjena nakon tretmana ćelija ekstraktima stabla i lista. I u jednom i u drugom slučaju nije bilo značajne razlike u produkciji ispitivanih citokina kada su se ekstrakti međusobno poredili (Slika 7B, C).





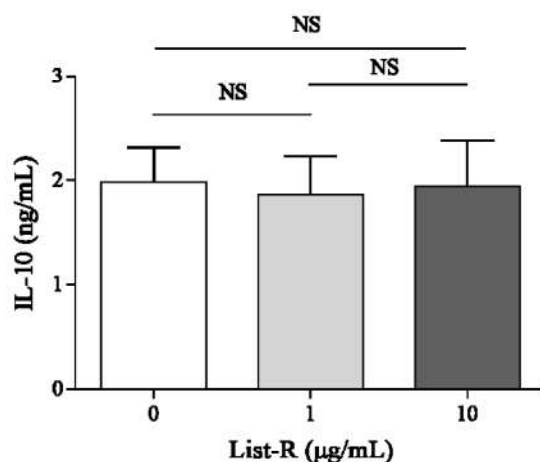
Slika 7. Efekat ekstrakata korena, stabla i lista krastavca na vijabilnost i produkciju citokina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Ćelije DLČ su stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 µg/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (1 i 10 µg/mL) ekstrakata u trajanju od 24h. Nakon 24h, metabolička vijabilnost ćelija je određena testom MTT (A). Produkcija citokina IFN-γ i IL-17 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA (B, C). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; # p < 0.05 predstavlja statističku značajnost između istih koncentracija u različitim tretmanima; NS - bez statističke značajnosti.

Sa druge strane, ekstrakti korena, stabla i lista biljaka kojima su bila naneta mehanička oštećena lista (Koren-R, Stablo-R, List-R) značajno su smanjili produkciju oba citokina IFN-γ i IL-17 u obe ispitivane koncentracije, bilo da je poređenje rađeno u okviru samih ekstrakata ili ekstrakata međusobno, s tim što je uticaj ekstrakta List-R bio najizraženiji (Slika 8A, B).



Slika 8. Efekat ekstrakata Korena-R, Stabla-R i Lista-R na produkciju citokina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Ćelije DLČ su stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 µg/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (1 i 10 µg/mL) ekstrakata u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN-γ i IL-17 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA (A, B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; # p < 0.05 predstavlja statističku značajnost između istih koncentracija u različitim tretmanima; NS-bez statističke značajnosti.

S obzirom da je ekstrakt List-R pokazao najizraženiji uticaj na smanjenje produkcije proinflamacijskih citokina IFN-γ i IL-17, sledeći cilj je bio da se u supernatantima ćelija tretiranih ekstraktom List-R odredi i produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10. Rezultati su pokazali da je produkcija IL-10 ostala nepromenjena u poređenju sa netretiranom kontrolom, što je ukazalo da ovaj ekstrakt specifično utiče na citokine IFN-γ i IL-17 (Slika 9).



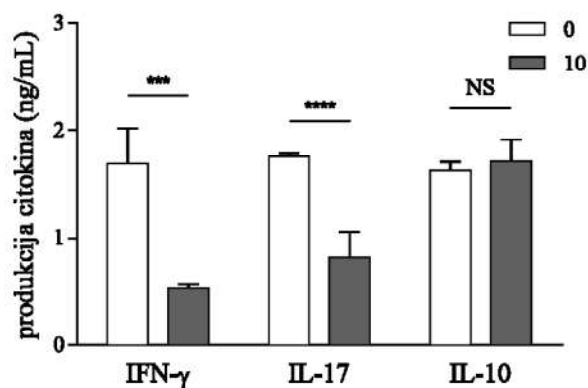
Slika 9. Efekat ekstrakta List-R na produkciju citokina IL-10 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Ćelije DLČ su stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 µg/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (1 i 10 µg/mL) ekstrakta u trajanju od 24h. Produkcija citokina IL-10 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u svim poređenjima; NS - bez statističke značajnosti.

Ovi rezultati su pokazali da su svi pripremljeni ekstrakti (Koren, Stablo, List, Koren-R, Stablo-R i List-R) ostvarili imunomodulacijske aktivnosti na ćelijama DLČ s tim što se u svakoj grupi ekstrakt lista krastavca izdvajao kao najpotentniji. Posebno je izražen antiinflamacijski potencijal ekstrakta List-R (u daljem tekstu ELK) koji je očuvao produkciju citokina IL-10 i pokazao izrazit uticaj na smanjenje produkcije citokina IFN- γ i IL-17 u reaktiviranim ćelijama DLČ. Iz tog razloga imunomodulacijske osobine ELK su ispitane i na drugim ćelijama imunskog sistema.

4.3. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na CD4⁺ T limfocite *in vitro*

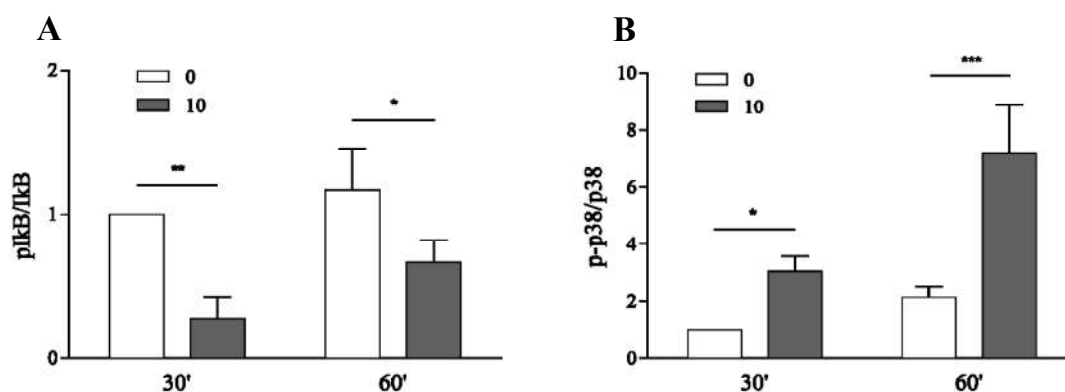
S obzirom da je ELK pokazao antiencefalitogeni efekat na ćelijama DLČ, sledeći cilj je bio da se taj efekat ispita na CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz DLČ životinja koje su prethodno imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅. Nakon prečišćavanja magnetnom separacijom dobijeni CD4⁺ T limfociti su stimulisani 24h sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima u prisustvu 10 μ g/mL ELK. Produkcija citokina IFN γ , IL-17 i IL-10 je merena u supernatantima ćelija testom ELISA.

Rezultati su pokazali da ELK u koncentraciji od 10 μ g/mL značajno smanjuje produkciju proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17, dok produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10 ostaje nepromenjena u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 10).



Slika 10. Efekat ELK na produkciju citokina u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ i stimulisani u prisustvu anti-CD3 i anti-CD28 antitela (1 µg/mL) i u odsustvu (0) ili prisustvu (10 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN-γ, IL-17 i IL-10 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

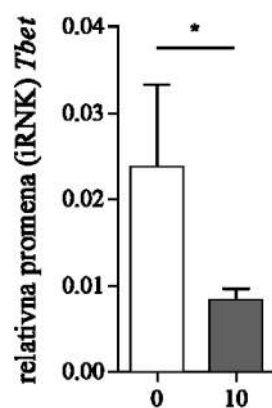
Nakon što je utvrđeno da ELK ostvaruje efekat na produkciju citokina u CD4⁺ T limfocitima sledeći cilj je bio da se ispita uticaj ELK na glavne unutarćelijske signalne puteve NF-κB i p38 MAPK (od eng. Mitogen-Activated Protein Kinase) uključene u aktivnost CD4⁺ T limfocita. U tu svrhu, ćelije su u kratkim vremenskim intervalima od 30 i 60 minuta tretirane sa 10 µg/mL ELK, nakon čega su ukupni proteini izolovani i pripremljeni za analizu metodom Western blot. Merenjem nivoa ukupne i fosforilisane forme regulatornih proteina IκB i p38 pokazano je da ELK smanjuje aktivaciju signalnog puta NF-κB i aktivira signalni put p38 u poređenju sa nestimulisanom kontrolom (Slika 11A, B).



Slika 11. Efekat ELK na signalne puteve u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (10 µg/mL) ELK u trajanju od 30 i 60 min. Nakon isteka vremena, ukupni proteini su izolovani iz ćelija i metodom Western blot je određen odnos proteina pIκB/IκB (A) i p-p38/p38 (B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Dalje, relativna promena (iRNK) *Tbet*, glavnog regulatornog proteina odgovornog za diferencijaciju i održavanje Th1 subpopulacije CD4⁺ T limfocita, merena je metodom RT-qPCR. Rezultati su pokazali da ELK u koncentraciji od 10 µg/mL značajno smanjuje ekspresiju (iRNK) *Tbet* u poređenju sa kontrolom (Slika 12).

Slika 12. Efekat ELK na ekspresiju T-bet. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (10 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Relativna promena (iRNK) *Tbet* određena je metodom RT-qPCR. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

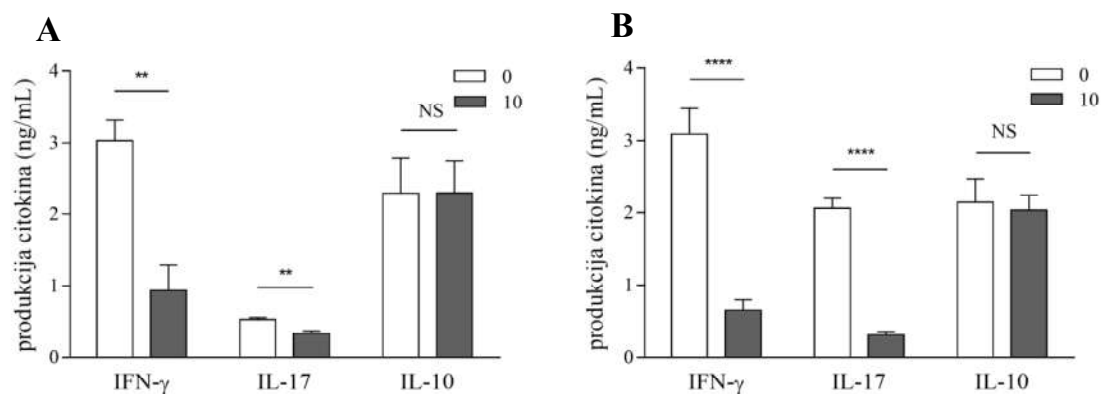


Ovi rezultati su pokazali da je ELK smanjio aktivnost encefalitognih CD4⁺ T limfocita *in vitro*, tako što je smanjio produkciju citokina IFN-γ i IL-17 u ovim ćelijama. Ovaj efekat je najverovatnije ostvaren inhibicijom unutarćelijskog signalnog puta NF-κB, produkcije (iRNK) regulatornog proteina TBET i aktivacije signalnog puta p38 MAPK u ovim ćelijama.

4.4. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na imunske ćelije creva *in vitro*

S obzirom da su creva bitno mesto za uspostavljanje i homeostazu imunskog sistema, ali i za patogenezu EAE, sledeći od ciljeva je bio da se ispita uticaj ELK na imunskim ćelijama creva. Ćelije mezenteričnih limfnih čvorova i ćelije Pejerovih ploča DA pacova su izolovane i stimulisane konkanavalinom A (ConA) u cilju nespecifične aktivacije limfocita. U isto vreme ćelije su tretirane sa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ELK u trajanju od 24h. Testom ELISA merena je produkcija citokina IFN- γ , IL-17 i IL-10 u supernatantima ćelija.

Rezultati su pokazali da primenjena koncentracija ELK značajno smanjuje produkciju citokina IFN- γ , IL-17 i u MLC i u PP, dok produkcija IL-10 ostaje očuvana (Slika 13A, B).



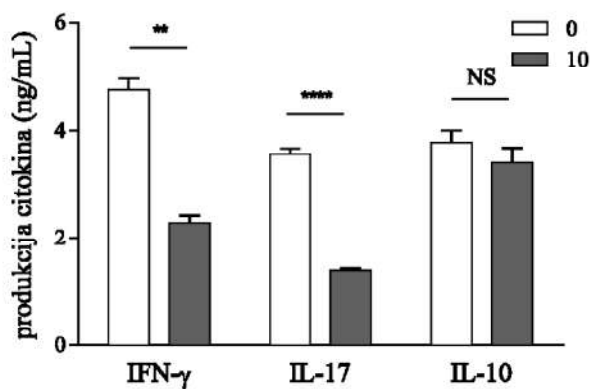
Slika 13. Efekat ELK na produkciju citokina u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova i pejerovih ploča. Ćelije MLC i PP su stimulisane sa ConA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) u odsustvu (0) ili prisustvu (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ELK u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN γ , IL-17 i IL-10 je određena u supernatantima ćelijskih kultura MLC (A) i PP (B) testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Ovi rezultati su jasno ukazali na supresivni efekat koji ELK ostvaruje na ćelijama imunskog sistema creva kroz inhibiciju produkcije proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17 i održavanje produkcije antiinflamacijskog citokina IL-10 nakon nespecifične poliklonske aktivacije limfocita.

4.5. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na infiltrate kičmene moždine *in vitro*

Nakon indukcije aktivnog EAE imunizacijom DA pacova sa HKM + CFA, u toku pika bolesti dolazi do infiltracije efektorskih CD4⁺ T limfocita, makrofaga i drugih ćelija imunskog sistema u CNS što dovodi do inflamacije i oštećenja tkiva. Stoga je sledeći cilj ove doktorske disertacije bio da se ispita uticaj ELK na ćelijama koje su infiltrirale KM imunizovanih pacova (IKM) *in vitro*. Infiltrati imunskih ćelija su izolovani na gradijentu Perkola, a potom tretirani sa ELK bez dodatne stimulacije jer se ove ćelije smatraju *in vivo* reaktiviranim u CNS.

Rezultati su pokazali da ELK u primenjenoj koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$ značajno smanjuje produkciju glavnih efektorskih citokina IFN γ i IL-17 od strane IKM, dok produkcija IL-10 ostaje nepromenjena (Slika 14).



Slika 14. Efekat ELK na produkciju citokina u infiltratima kičmene moždine. Infiltrati imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine su tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (10 $\mu\text{g/mL}$) ELK u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN γ , IL-17 i IL-10 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

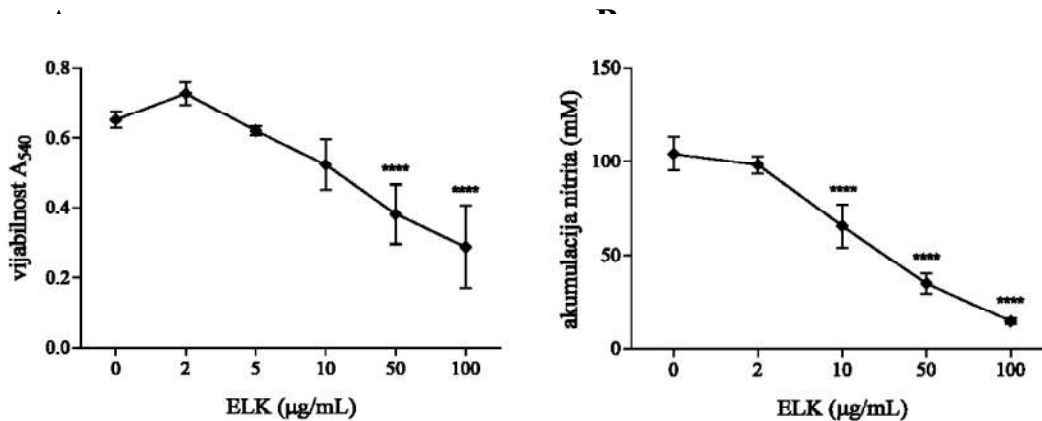
Ovi rezultati pokazuju da u *in vitro* uslovima ELK ostvaruje antiencefalitogeni potencijal na IKM odgovornim za oštećenje i inflamaciju CNS.

4.6. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na makrofage *in vitro*

S obzirom da makrofagi predstavljaju značajnu ćelijsku populaciju koje učestvuju u efektorskoj fazi EAE, sledeći cilj je bio da se ispita efekat ELK na funkcionisanje ovih ćelija.

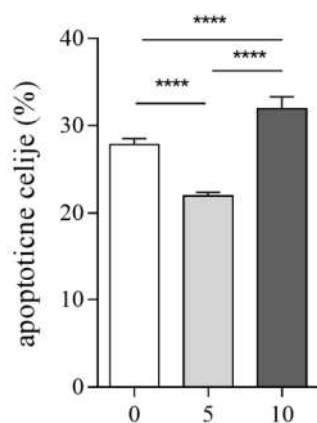
Peritonealni makrofagi su dobijeni lavažom peritonealne šupljine zdravih DA pacova, a potom su stimulisani LPS i tretirani različitim koncentracijama ELK. Nakon 24h analizirana je vijabilnost ćelija testom CV, a aktivacioni status ćelija je procenjen merenjem produkcije proinflamacijskih citokina IL-1 β , IL-6, TNF testom ELISA, zatim merenjem produkcije nitrita metodom po Grisu, merenjem reaktivnih kiseoničnih vrsta, nivoa fagocitoze i ekspresije površinskih molekula (MHC II, CD86, CD11b) metodom protočne citofluorimetrije.

Rezultati su pokazali da ELK u koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$ smanjuje preživljavanje ćelija, dok u nižim koncentracijama od 2, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ nema efekta na vijabilitet (Slika 15A). Iz tog razloga, niže koncentracije ELK, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$, su korišćene u eksperimentima sa makrofagima *in vitro*. Rezultati metode po Grisu, pokazali su da ELK u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$ značajno smanjuje produkciju nitrita od strane aktiviranih makrofaga (Slika 15B).

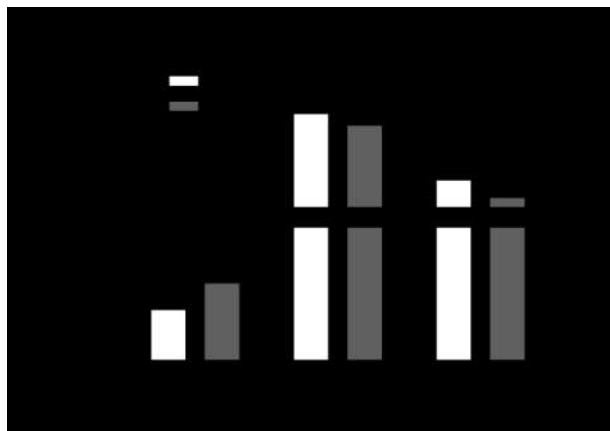


Slika 15. Efekat ELK na vijabilnost i produkciju NO u makrofagima. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (2, 10, 50 i 100 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, vijabilnost ćelija je određena testom CV (A), a akumulacija nitrita testom Gris (B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Koncentracija ELK od 10 µg/mL povećava apoptozu u odnosu na netretiranu kontrolu, dok koncentracija od 5 µg/mL blago smanjuje procenat apoptotičnih ćelija (Slika 16). Rezultati testa ELISA su pokazali da ELK u koncentraciji od 10 µg/mL smanjuje produkciju citokina TNF, dok produkcija IL-1β i IL-6 ostaje nepromenjena u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 17).

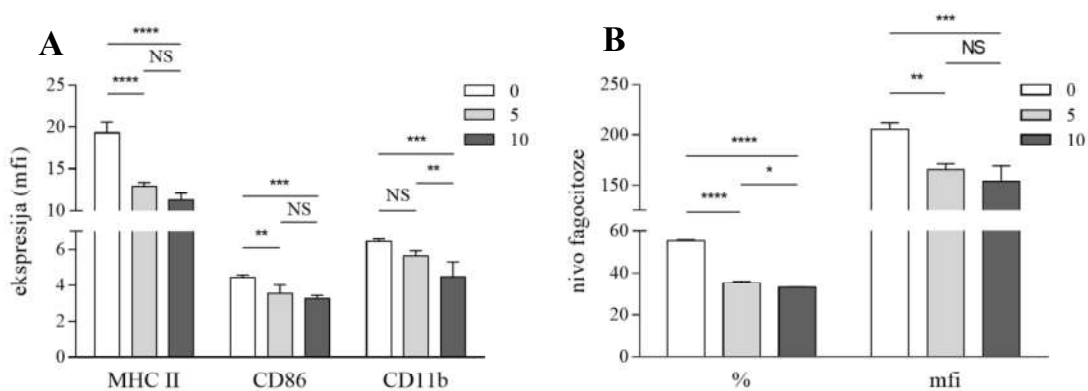


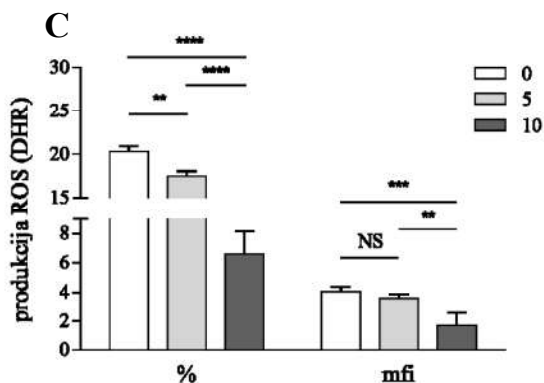
Slika 16. Efekat ekstrakta lista krastavca na apoptozu makrofaga. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (5 i 10 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, apoptoza ćelija je određena metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u svim poređenjima; NS - bez statističke značajnosti.



Slika 17. Efekat ELK na produkciju citokina u makrofagima. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (10 μ g/mL) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, produkcija citokina IL-1 β , IL-6 i TNF je određena testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. **** p < 0.0001, *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Merenjem nivoa ekspresije površinskih molekula pokazano je da ELK u obe koncentracije značajno smanjuje nivo ekspresije MHC II, CD86 i CD11b na površini makrofaga (Slika 18A). Takođe, ELK smanjuje procenat ćelija koje vrše fagocitozu kao i nivo fagocitoze po ćeliji (Slika 18B). Isto tako, procenat ćelija i produkcija ROS po ćeliji je smanjena nakon tretmana makrofaga sa ELK (Slika 18C).





Slika 18. Efekat ELK na nivo ekspresije površinskih molekula, nivo fagocitoze i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u makrofagima. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (5 i 10 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, procenat ćelija i nivo ekspresije (mfi) površinskih molekula MHC II, CD86 i CD11b (A), fagocitoza (B) i produkcija ROS (C) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u svim poređenjima; NS–bez statističke značajnosti.

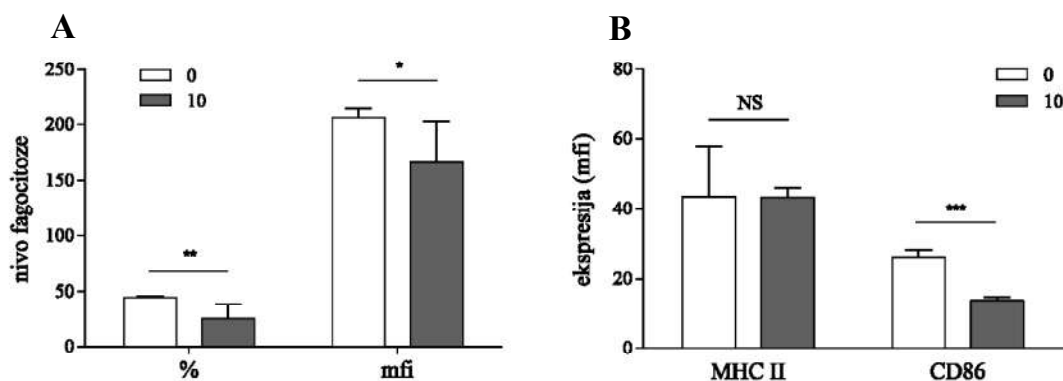
Iz ovih rezultata se može zaključiti da ELK u koncentracijama koje ne utiču na preživljavanje makrofaga *in vitro*, značajno smanjuje aktivacioni status ovih ćelija smanjenjem produkcije glavnih medijatora inflamacije kao što su NO, ROS i citokini, smanjenjem nivoa fagocitoze i ekspresije površinskih molekula uključenih u prezentaciju antigena.

4.7. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na dendritske ćelije *in vitro*

Uloga DĆ u započinjanju imunskog odgovora, aktivaciji i diferencijaciji naivnih T limfocita, kao i u reaktivaciji već postojećeg antigen-specifičnog odgovora je neizostavna. S obzirom da model EAE omogućava izučavanje antigen-specifičnog imunskog odgovora, sledeći cilj je bio da se ispita uticaj ELK na ovaj proces. Efekat je ispitan u *in vitro* modelu diferencijacije DĆ, kao i u sistemu ko-kultivacije DĆ sa CD4⁺ T limfocitima.

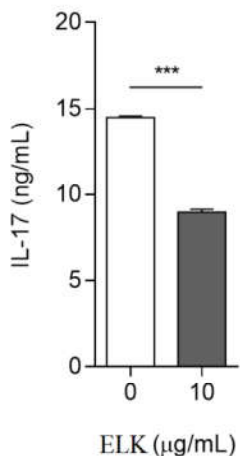
DĆ su dobijene diferencijacijom iz ćelija kostne srži u prisustvu GM-CSF. ELK (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) je dodat sedmog dana zajedno sa LPS koji je stimulator sazrevanja nezrelih DĆ u zrele DĆ. Nakon završene diferencijacije u trajanju od sedam dana i dobijanja zrelih DĆ, meren je nivo fagocitoze kao i nivo ekspresije površinskih molekula (MHCII i CD86) metodom protočne citofluorimetrije.

Rezultati su pokazali da DĆ u prisustvu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ELK odlikuje značajno smanjen nivo fagocitoze u ukupnoj populaciji i po ćeliji (Slika 19A). Dalje, pokazano je da ELK u istoj koncentraciji smanjuje ekspresiju molekula CD86 na površini DĆ dok ekspresija MHC II ostaje nepromenjena (Slika 19B).



Slika 19. Efekat ELK na ekspresiju površinskih molekula i nivo fagocitoze u dendritskim ćelijama. Dendritske ćelije su stimulisane LPS (100 ng/mL) u odsustvu ili prisustvu (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, procenat ćelija i nivo ekspresije (mfi) površinskih molekula MHC II i CD86 (A), i fagocitoza (B) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

U eksperimentu ko-kultivacije zrele DĆ dobojene u prisustvu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ELK su izložene peptidu MOG₃₅₋₅₅ i kokultivisane sa CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz MOG₃₅₋₅₅ imunizovanih DA pacova u trajanju od 5 dana. Nakon završene ko-kultivacije, merena je produkcija proinflamacijskog citokina IL-17 testom ELISA u supernatantima ćelija. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da DĆ, sazrele u prisustvu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ELK inhibiraju produkciju IL-17 od strane CD4⁺ T limfocita (Slika 20).



Slika 20. Efekat ELK na produkciju citokina IL-17 u sistemu ko-kultivacije dendritskih ćelija sa Th limfocitima. Dendritske ćelije su stimulisane LPS (100 ng/mL) u odsustvu ili prisustvu (10 µg/mL) ELK u trajanju od 24h. Nakon 24h, DĆ su ko-kultivisane sa CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz ćelija DLČ životinja imunizovanih peptidom MOG₃₅₋₅₅. Ko-kultivacija je izvedena u prisustvu peptida MOG₃₅₋₅₅ (10 µg/mL) u trajanju od 120h. Nakon isteka vremena, produkcija citokina IL-17 je određena u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

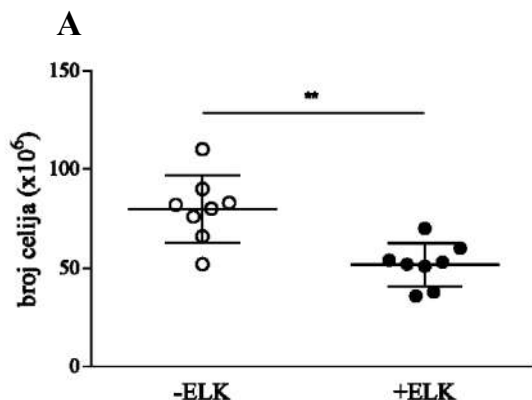
Ovi rezultati su pokazali da ELK utiče na funkcionisanje DĆ tako što smanjuje produkciju citokina IL-17, odnosno ograničava Th17 specifični imunski odgovor u sistemu ko-kultivacije. Pored toga, DĆ tretirane sa ELK pokazale su značajno smanjen nivo fagocitoze i ekspresije površinskog molekula CD86. Dobijeni rezultati govore o tome da ELK najverovatnije utiče na antigen-prezentujuću aktivnost DĆ.

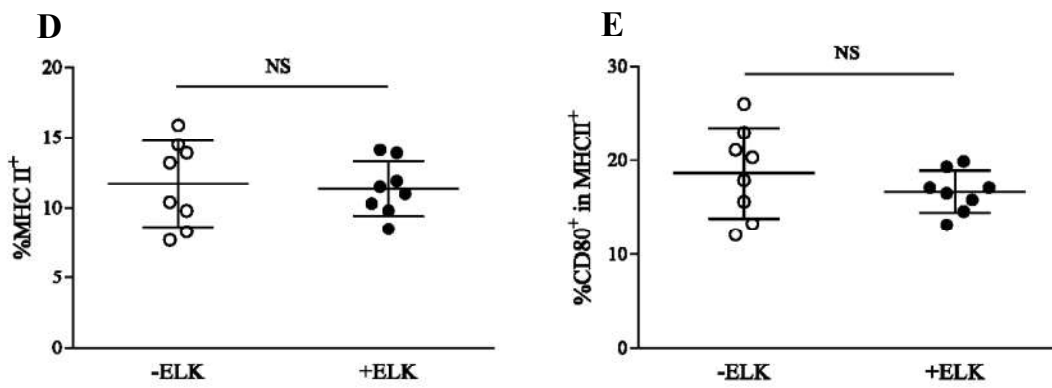
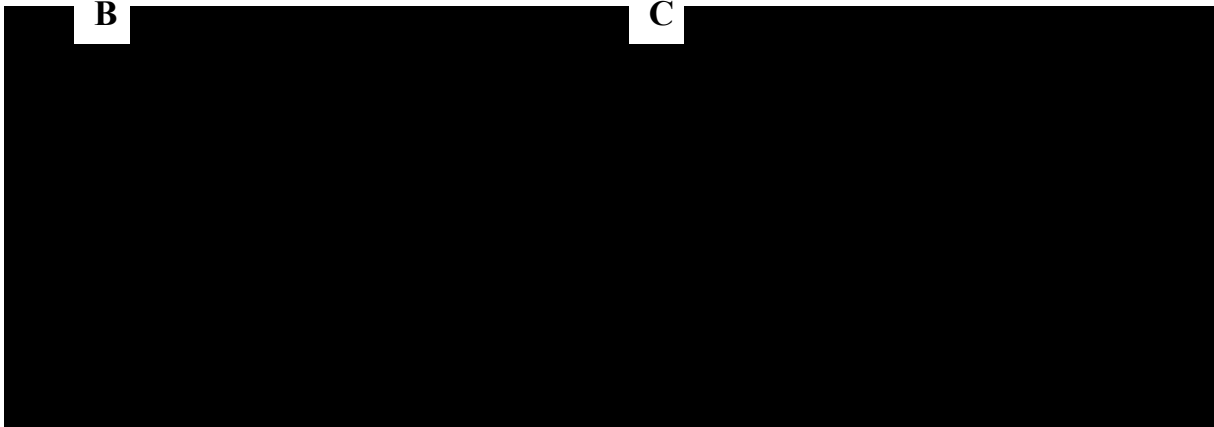
4.8. Imunomodulacijski uticaj ekstrakta lista krastavca na encefalitogene ćelije *in vivo* i *ex vivo*

Pošto je pokazan imunomodulacijski efekat ELK *in vitro*, gde se jasno vidi da ELK inhibira encefalitogeni potencijal CD4⁺ T limfocita, kao i efektorske funkcije makrofaga i antigen-prezentujuću aktivnost DC, sledeći cilj je bio da se ispita efekat ELK *in vivo*, u modelu EAE.

U tu svrhu, ELK je primenjen zajedno sa emulzijom za imunizaciju (MOG₃₅₋₅₅ + CFA + 0.5 mg/mL ELK). Ženke DA pacova su imunizovane i sedmi dan nakon imunizacije DLČ su izolovani, ćelije prebrojane i određen procenat CD4⁺, procenat aktiviranih CD4⁺ ćelija (CD134⁺ u CD4⁺), zatim procenat MHC II⁺ kao i procenat CD80⁺ u MHC II⁺ ćelijama.

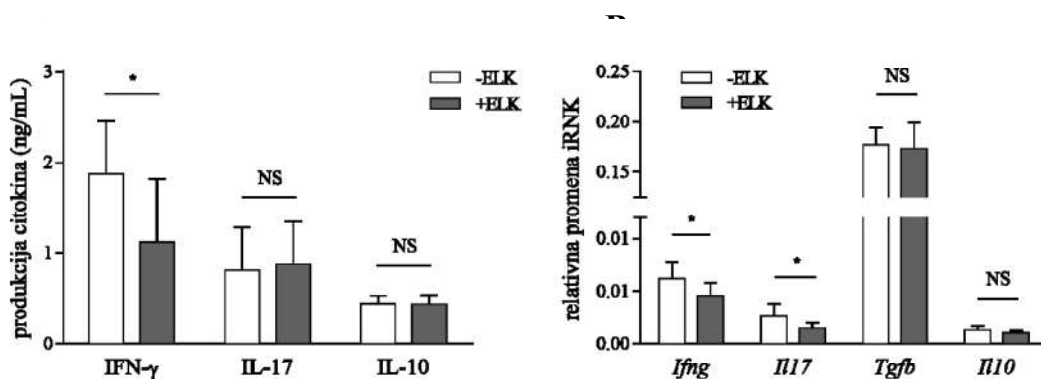
Rezultati su pokazali da je ukupan broj ćelija DLČ bio smanjen kod životinja koje su dobile ELK u emulziji za imunizaciju (Slika 21A), dok je procenat CD4⁺ kao i MHC II⁺ ostao nepromenjen u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 21B, D). Sa druge strane, procenat CD134⁺ ćelija u okviru CD4⁺ je bio smanjen kod životinja koje su primile ELK, sugerišući njihovu smanjenu aktivnost (Slika 21C). Međutim, procenat MHC II⁺ ćelija, kao i udeo CD80⁺ među njima ostao je nepromenjen (Slika 21E).





Slika 21. Efekat ELK na encefalitogene ćelije *in vivo* i *ex vivo*. Ženke DA pacova su imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅ + CFA ili peptidom MOG₃₅₋₅₅ + CFA + ELK (0.5 mg/mL). Sedmi dan nakon imunizacije poplitealni limfni čvorovi su izolovani. Određen je ukupan broj ćelija po limfnom čvoru (A). Odnos procenta CD4⁺ (B), CD134⁺ u CD4⁺ (C), MHC II⁺ (D) i CD80⁺ u MHC II⁺ (E) određen je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti (n=6 pacova po grupi) ± SD. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na -ELK; NS - bez statističke značajnosti.

U cilju provere funkcionalnosti ovako dobijenih ćelija, ćelije su izložene peptidu MOG₃₅₋₅₅ u trajanju od 24h, nakon čega je merena produkcija relevantnih citokina testom ELISA. Pored toga, jedan deo ćelija je direktno iskorišćen za izolovanje ukupne RNK i merenje relativne promene (iRNK) *Ifng*, *Il17*, *Tgfb* i *Il10* metodom RT-qPCR. Rezultati su pokazali da ćelije dobijene iz DLČ životinja koje su primile ELK značajno manje proizvode citokine IFN- γ i IL-17 nakon restimulacije peptidom MOG₃₅₋₅₅, dok produkcija citokina TGF- β i IL-10 ostaje nepromenjena (Slika 22A). S druge strane, rezultati RT-qPCR pokazali su da je smanjenje u ekspresiji iRNK jedino uočljivo kod *Ifng* (Slika 22B).

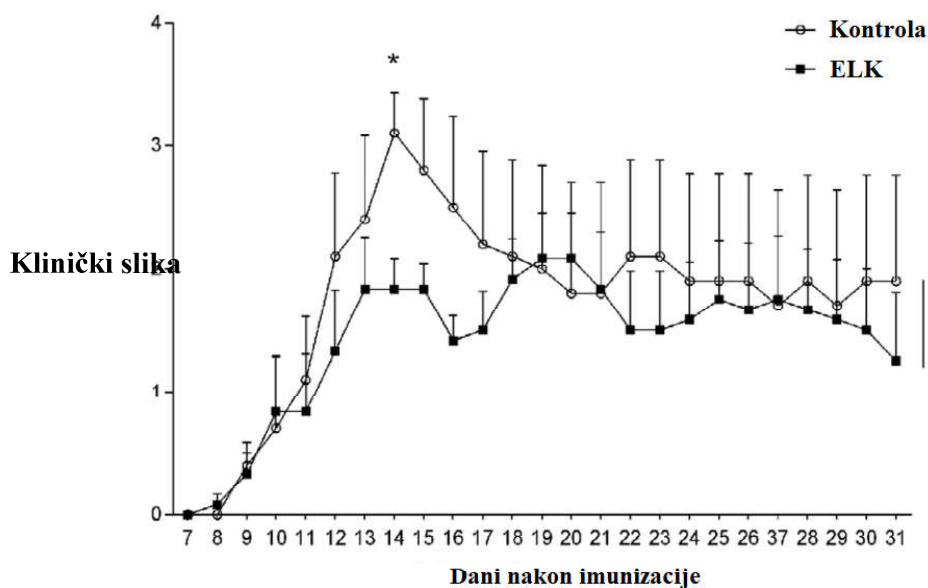


Slika 22. Efekat ELK na produkciju citokina u encefalitogenim ćelijama u *ex vivo* uslovima. Ženke DA pacova su imunizovane peptidom MOG₃₅₋₅₅ + CFA ili peptidom MOG₃₅₋₅₅ + CFA + ELK (0.5 mg/mL). Sedmi dan nakon imunizacije ćelije su izolovane iz poplitealnih limfnih čvorova i tretirane su peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 μ g/mL) u trajanju od 24h. Produkcija citokina IFN- γ , IL-17 i IL-10 je određena testom ELISA (A). Alternativno, u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova određena je relativna promena (iRNK) *Ifng*, *Il17*, *Tgfb* i *Il10* metodom RT-qPCR (B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=6 pacova po grupi) \pm SD. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na -ELK; NS - bez statističke značajnosti.

Ovi rezultati ukazuju da primena ELK zajedno sa emulzijom za imunizaciju negativno utiče na formiranje encefalitogenog imunskog odgovora u DLČ pacova na taj način što smanjuje ukupan broj ćelija, kao i procenat i aktivnost CD4⁺ T limfocita. Takođe, ispitivanje produkcije (iRNK) *Ifng*, *Il17*, *Tgfb* i *Il10* i relevantnih citokina pokazalo je da ELK smanjuje funkcionalni status ćelija u DLČ.

4.9. Efekat ekstrakta lista krastavca na klinički tok eksperimentalnog autoimunuskog encefalomijelitisa

Da bi ispitali efekat ELK na klinički tok EAE, ženke DA pacova su imunizovane emulzijom HKM + CFA koja je sadržavala ELK (1 mg/mL) ili bila bez njega. Praćen je klinički tok bolesti. Rezultati su pokazali da primena ELK zajedno sa emulzijom utiče na klinički tok bolesti, ublažavajući simptome u početnim fazama bolesti (Slika 23).



Slika 23. Klinička slika EAE. Ženke DA pacova su imunizovane sa HKM + CFA u odsustvu (kontrola) ili prisustvu ELK (1 mg/mL). Klinička slika bolesti praćena je od 7. do 31. dana. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=6 pacova po grupi) + SD. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na kontrolu.

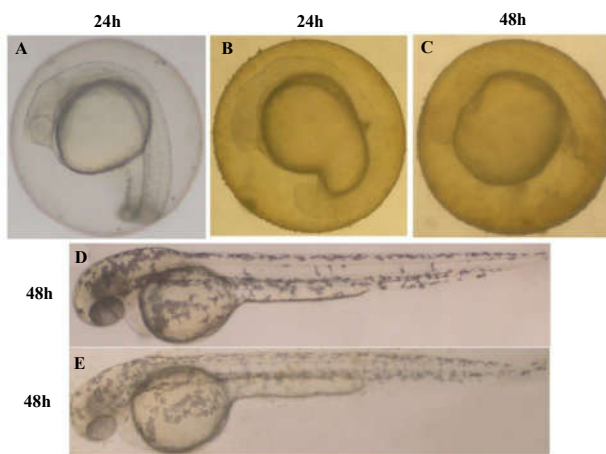
Ovi rezultati ukazuju da *in vivo* primena ELK u modelu EAE poseduje terapijski učinak u početnim fazama bolesti.

4.10. Efekat ekstrakta lista krastavca na razvoj embriona zebrice

Model zebrice zbog svojih osobina predstavlja široko korišćen model sistem za ispitivanje embriotoksičnosti i citotoksičnosti različitih jedinjenja. Zbog toga, sledeći cilj istraživanja je bio da se ispita toksičnost ELK na modelu zebrice.

Oplođena jaja zebrice su sakupljena i tretirana različitim dozama ELK i naredna 72h se pratio razvoj embriona, odnosno smrtnost i različite morfološke promene tokom razvića (razvoj tela, glave, očiju, repa, srca, cirkulacija, skoiloza, pigmentacija, deformitet žumanceta, formiranje edema).

Rezultati su pokazali da doze ELK od 10 i 50 $\mu\text{g/mL}$ ne ispoljavaju efekat na razvoj embriona zebrice, dok je doza od 100 $\mu\text{g/mL}$ uticala na hipopigmetaciju embriona nakon 48h (Slika 24E). Međutim, doza od 500 $\mu\text{g/mL}$ ELK dovela je do deformacije žumanceta, glave i repa u prvih 24 i 48 h nakon oplođenja kao i do formiranja edema, izmenjenih očiju i pigmetacije nakon 48h u poređenju sa kontrolnom netretiranom grupom (Slika 24B, C).



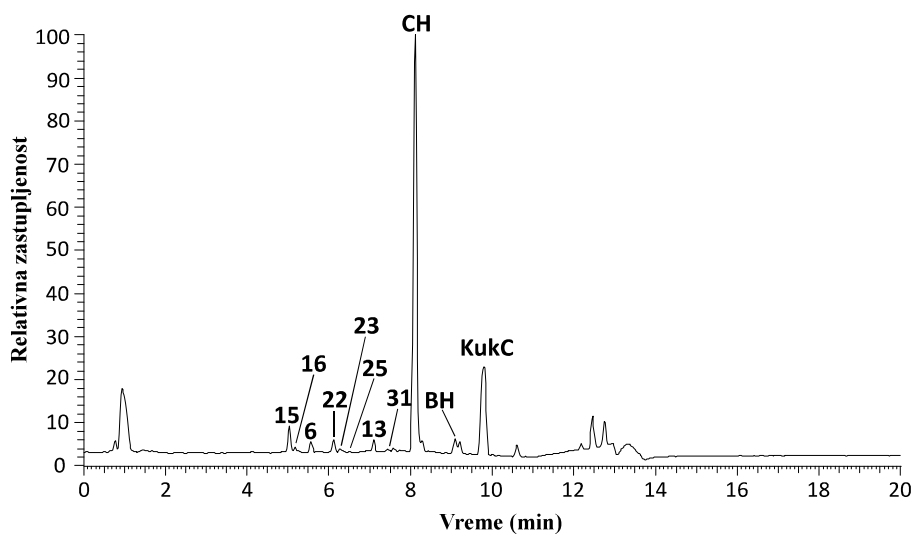
Slika 24. Efekat ELK na razvoj embriona zebrice *in vivo*. Razvoj embriona se pratio u odsustvu (A, D) i prisustvu različitih doza ELK (10, 50, 100 (E) i 500 (B, C) $\mu\text{g/mL}$). Prikazane su reprezentativne slike (40x uveličanje) embriona u razvoju u različitim vremenskim tačkama nakon fertilizacije (24h i 48h). Opaženi efekti su bili značajni ako su uočeni u više od 50% embriona po tretmanu u poređenju sa kontrolnom grupom.

Rezultati toksičnosti ELK u *in vivo* modelu zebrice pokazali su da ELK ne ostvaruje toksični efekat na embrionima zebrice u dozama koje su iznad doza koje ostvaruju imunomodulacijski efekat u *in vitro* uslovima.

4.11. Kvalitativna i kvantitavna analiza ekstrakata lista krastavca

Nakon *in vitro* i *in vivo* eksperimenata usledila je fitohemijska analiza ELK. Kvalitativna analiza je urađena pomoću UHPLC sistema povezanog sa OrbiTrap masenim spektrometrom.

Rezultati su pokazali prisustvo 37 različitih jedinjenja koji se mogu svrstati u dve strukturno različite grupe: fenole (13 fenolnih kiselina i njihovih derivata, 9 flavonoida u formi aglikana i glikozida) i tetraciklične triterpenoide (4 derivata kukurbitacina). 15 jedinjenja je potvrđeno korišćenjem dostupnih standarda, dok su preostala identifikovana na osnovu masa njihovih deprotovanih molekula ($[M-H]^-$), MS⁴ fragmentacije kao i na osnovu poređenja sa hromatogramima i masenim spektrima dostupnih u literaturi. Hromatogram ELK je prikazan na slici 25.



Slika 25. Hromatogram UHPLC analize ekstrakta lista krastavca. Uzorak ELK 5 μL (2 mg/mL) rastvoren u MeOH je injektovan u UHPLC sistem opremljen C18 kolonom koji je bio povezan sa linearnim jonskim trapom - OrbiTrap hibridnim masenim spektrometrom (LTQ OrbiTrap MS). Za razdvajanje i eluiranje jedinjenja je korišćen linearni gradijent rastvarača vode + 0.1% mravlje kiseline i acetonitrila. Rezultati su prikazani kao hromatogram relativne zastupljenosti jedinjenja i vremena elucije. Oznake pikova odgovaraju oznakama u Tabeli X.

Redni broj pikova, retenciona vremena (t_R , min), nazivi jedinjenja, molekulske formule, izračunate i tačne mase ($[M - H]^-$, m/z), greške masa (Δ mDa), kao i glavni joni fragmentacija MS^2 , MS^3 i MS^4 prikazani su u tabeli 2. Među 14 derivata fenolnih kiselina pronađenih u ekstraktu, 4 su bili heksozidi kofeinske, kumarinske, sinapinske i ferulinske kiseline (Tabela 2). Svaka od njih je pokazala karakterističnu fragmentaciju (gubitak heksoze, 162 kDa). Pored toga, identifikovano je 19 derivata flavonoida od kojih 8 C,O-di i -tri glikozida, 7 O-glikozida, 2 C-glikozida i 2 aglikana. Jedinjenje 17, čije je t_R (5.30 min) i $[M - H]^-$ na 623 m/z označeno je kao hrizoeriol 6-C-heksozid-7-O-heksozid. Ovo jedinjenje fragmentacijom MS^2 dalo je osnovni pik na 503 m/z (gubitak 120 kDa) i fragmentacijom MS^3 osnovni pik na 341 (gubitak još 162 kDa, tj. heksoze). Pozivajući se na studiju (Ferrerres i sar., 2007), jedinjenje 15 je identifikovano kao 2''-O-heksozil derivat jedinjenja 17, dok je jedinjenje 22 pozicioni izomer jedinjenja 15. Jedinjenja 14 i 16 identifikovana su kao analozi jedinjenja 15 sa različitim aglikanskim delom, apigenin i luteolin, redom. Dva slična jedinjenja, 18 (5.44 min) i 19 (5.72 min) sa identičnim molekulskim jonom $[M - H]^-$ na 609 m/z ali različitim obrazcem fragmentacije, identifikovani su kao luteolin 6-C-heksozid-7-O-heksozid i luteolin 6-C-(2''-O-heksozil)heksozid, redom. Fragmentacioni obrasci ova dva jedinjenja mogu se pronaći u literaturi (Ferrerres i sar., 2008). Apigenin 6-C-(2''-O-heksozil)heksozid (jedinjenje 26) sa t_R 6.13 min i $[M - H]^-$ na 593 m/z, fragmentacijama MS^2 i MS^3 dalo je bazne pikove na 443 i 323 m/z što je u saglasnosti sa (Shizhong i sar., 2016). Pozivajući se na referencu (Yin i sar., 2008) jedinjenje 20, t_R 5.85 min i 595 m/z označeno je kao naringenin 7-O-(2''-heksozil)heksozid. Pik na t_R 7.07 min i $[M - H]^-$ na 477 m/z identifikovan je kao isorhamnetin 3-O-heksozid (jedinjenje 27). Ovo jedinjenje daje osnovne pikove MS^2 na 314 i 315 m/z, koji odgovaraju gubitku heksoze (162 kDa) i MS^3 osnovni pik na 285 m/z. MS^2 spektar jedinjenja 30, t_R 7.38 min i $[M - H]^-$ na 461 m/z, identifikovanog kao hrizoeriol 7-O-heksozide, dao je osnovni pik fragmenta na 299 m/z (deprotonovani hrizoeriol). MS^3 i MS^4 spektri ovog jedinjenja na 284 m/z i 256

m/z , redom, konačno su potvrdili prisustvo hrizoeriola u ekstraktu. Na osnovu fragmentacija ovo jedinjenje je identifikovano kao hrizoeriol 7-*O*-heksozid (Pereira i sar., 2013). U ekstraktu su bila pronađena i 4 triterpenoida iz grupe kukurbitacina: kukurbitacin F (KukF), kukurbitacin C (KukC), 2-*O*-heksozid kukurbitacina B (BH) i 3-*O*-heksozid kukurbitacina C (CH). Sva 4 jedinjenja pojavila su se u MS spektru kao konjugati sa mravljom kiselinom ($[M + HCOOH-H]^-$), tako da su fragmentacioni joni koji zaista odgovaraju molekulskim jonima identifikovani u MS² spektrima. Zajednička karakteristika glikozida kukurbitacina je bio nedostatak fragmenta koji bi odgovarao aglikanskom delu molekula u MS² spektru, s obzirom da se fragmentacija desila na nekoj drugoj poziciji steroidnog molekula. Npr. jedinjenje BH, t_R 9.22 min dalo je molekulski jon na 765 m/z i osnovni pik MS² na 701 m/z čija razlika odgovara gubitku mravlje kiseline i vode. Dalje, osnovni pik MS³ na 683 m/z odgovara gubitku još jednog molekula vode. CH je pokazao sličan obrazac fragmentacije kao BH.

Table 2. Kvalitativna analiza ekstrakta lista krasavca ubotrebom *UHPLC/LTQ Orbitrap MS⁺*.

Ozna- čeni pik ^a	<i>t_R</i> min	Naziv jedinjenja	Molekulska formula, [M- H] ⁻	Izračunate mase, [M-H] ⁻	Tačne mase, [M-H] ⁻	Δ mDa	MS ² fragmenti, (% osnovnog pika)	MS ³ fragmenti, (% osnovnog pika)	MS ⁴ fragmenti, (% osnovnog pika)
Fenolne kiseline i njihovi derivati									
1	4.44	Protokatehuinska kiselina ^b	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153.01933	153.01848	0.85	109 ^c (100), 95 ^c (75), 79(20), 59(10)	81(100), 68(25), 65(15)	–
2	4.70	Heksozid kofeinske kiseline	C ₁₅ H ₁₇ O ₅ ⁻	341.08781	341.08539	2.42	203(10), 179(100), 135(10)	135(100)	135(100), 107(50)
3	5.27	Heksozid kumarinske kiseline	C ₁₅ H ₁₇ O ₈ ⁻	325.09289	325.09152	1.37	265(20), 187(40), 163(80), 145(100), 119(10)	117(100)	–
4	5.41	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^b	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137.02442	137.02359	0.83	109(10), 93(100)	93(100)	–
5	5.52	Heksozid sinapinske kiseline	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	385.11402	385.11292	1.10	223(100)	208(100), 179(50), 164(30)	193(10), 164(100), 163(40), 149(20)
6	5.57	Heksozid ferulinske kiseline	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355.10346	355.10226	1.20	193(100)	178(70), 149(100), 134(80)	134(100)
7	5.77	Aeskuletin ^b	C ₉ H ₉ O ₄ ⁻	177.01933	177.01877	0.56	147(10), 135(100), 133(60), 131(30), 105(10)	107(30), 91(100)	–
8	5.80	Kofeinska kiselina ^b	C ₉ H ₉ O ₄ ⁻	179.03498	179.03389	1.09	135(100)	135(60), 117(15), 107(100), 91(55), 79(15)	–
9	6.01	Siringinska kiselina ^b	C ₉ H ₉ O ₅ ⁻	197.04555	197.04404	1.51	183(100), 153(40), 138(10)	167(100), 138(10), 123(5)	–
10	6.68	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^b	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163.04007	163.03917	0.90	119(100)	119(60), 101(20), 93(25), 91(100), 72(10)	–
11	6.82	Vanilinska kiselina ^b	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167.03498	167.03406	0.92	153(10), 152(80), 124(10), 123(100), 108(20)	108(100)	123(30), 80(35), 78(100)
12	7.03	Sinapinska kiselina ^b	C ₁₁ H ₁₁ O ₅ ⁻	223.06120	223.05992	1.28	208(100), 179(30), 164(20)	193(10), 164(100), 149(15), 135(5)	149(100), 135(35)
13	7.06	Ferulinska kiselina ^b	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193.05063	193.04984	0.79	178(70), 149(100), 134(40)	134(100)	–
14	7.99	Metil kafeat	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193.05063	193.04965	0.98	178(25), 161(100), 149(30), 147(30), 134(70)	133(100)	–
Flavonoidi i njihovi derivati									
15	5.04	Apigenin 6- <i>C</i> -(2'′,6'′-di- <i>O</i> - heksozil)heksozid	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀ ⁻	755.20402	755.20013	3.89	635(10), 593(100), 455(90), 413(60), 293(20)	575(10), 473(100), 413(60), 341(15), 293(20)	383(10), 353(10), 311(100), 293(20), 282(70)
16	5.18	Nepoznati C-glikozid I	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₁ ⁻	785.21458	785.21051	4.07	665(15), 623(100), 485(90), 443(40), 432(15)	605(10), 503(100), 443(50)	488(10), 413(10), 341(80), 323(15), 312(100)
17	5.29	Luteolin 6- <i>C</i> -(2'′- <i>O</i> - heksozil)heksozid -8- <i>C</i> - heksozid	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁ ⁻	771.19893	771.19672	2.21	609(100), 591(10), 489(5), 429(10)	489(70), 429(100), 357(30), 339(15), 309(30)	411(10), 369(10), 351(50), 339(20), 309(100)
18	5.30	Diosmetin 6,8-di- <i>C</i> -glukozid	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	623.16176	623.16040	1.36	605(5), 533(20), 503(100)	383(10), 341(100), 326(15), 312(25)	326(100), 313(10), 298(10)
19	5.44	Luteolin 6- <i>C</i> -(2'′- <i>O</i> - heksozil)heksozid	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14398	2.13	519(80), 429(75), 447(100), 357(60), 327(50)	429(30), 357(95), 327(100)	299(100), 284(10)

20	5.72	Luteolin 6,8-di-C-heksozid	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14417	1.94	489(60), 429(100), 357(25), 339(15), 309(25)	351(50), 339(20), 309(100)	267(100), 175(20)
21	5.85	Naringenin 6-C-(2''-O-heksozil)heksozid	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅ ⁻	595.16684	595.16412	2.72	475(70), 415(30), 343(30), 313(100), 295(60)	269(10), 219(20), 193(100), 167(15), 149(10)	165(100), 145(35), 125(20), 121(15), 105(10)
22	6.13	Apigenin 6-C-(2''-O-heksozil)heksozid	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593.15119	593.14777	3.42	473(10), 413(100), 293(30)	335(5), 293(100)	275(20), 265(60), 249(100), 221(35), 173(80)
23	6.26	Nepoznati C-glikozid 2	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	623.16176	623.16064	1.12	503(5), 443(100), 323(20)	323(100)	308(100)
24	6.44	Kvercetin 3-O-(6''-O-ramnozil)glukozid ^b	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14550	0.61	301(100)	179(100), 151(78), 107(4)	151(100), 107(2)
25	6.59	Apigenin 8-C-glukozid ^b	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431.09837	431.09634	2.03	341(20), 311(100)	283(100)	283(50), 239(100), 224(40), 197(50), 183(60)
26	6.71	Kvercetin 3-O-glukozid ^b	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08685	1.35	301(100), 300(30)	273(25), 257(20), 179(100), 151(75)	151(100)
27	6.83	Diosmetin 6-C-heksozid	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ ⁻	461.10894	461.10626	2.68	443(5), 371(20), 341(100)	298(100)	298(100), 297(40), 269(30), 253(20)
28	7.07	Isorhamnetin 3-O-heksozid	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	477.10385	477.10162	2.23	357(20), 315(50), 314(100), 300(5), 285(10)	300(30), 285(100), 271(75), 257(10), 243(25)	270(100)
29	7.19	Naringenin 7-O-heksozid	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	433.11402	433.11279	1.23	271(100), 272(15)	151(100), 119(5), 107(5), 177(10)	-
30	7.25	Apigenin-7-O-glukozid ^b	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431.09837	431.09680	1.57	311(5), 269(100)	269(30), 255(100), 197(45), 183(30), 151(20)	210(10), 197(100), 181(50), 169(40)
31	7.38	Diosmetin 7-O-heksozid	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	461.10894	461.10721	1.73	425(5), 415(5), 341(5), 323(5), 299(100)	284(100)	256(100)
32	9.50	Naringenin ^b	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271.06120	271.05957	1.63	225(5), 177(10), 151(100)	107(100)	65(100)
33	9.55	Apigenin ^b	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269.04554	269.04419	1.35	225(5), 177(15), 151(100)	65(100)	-
Kukurbitacini i njihovi derivati									
KukF	7.93	Kukurbitacin F	C ₃₁ H ₄₇ O ₆ ⁻	563.32256	563.31964	5.18	517(100), 499(20), 487(10), 459(15), 355(30)	499(50), 487(60), 459(100), 451(40), 427(40)	451(100), 427(5), 411(15), 385(34), 357(20)
CH	8.11	Kukurbitacin C 2-O heksozid	C ₃₉ H ₅₉ O ₁₅ ⁻	767.38594	767.38318	3.60	721(90), 703(100), 691(20), 679(40), 673(60)	685(75), 673(100), 655(25), 629(40), 613(10)	655(40), 629(100), 611(30), 511(30), 493(60)
BH	9.22	Kukurbitacin B 2-O heksozid	C ₃₉ H ₅₇ O ₁₅ ⁻	765.37029	765.36680	4.56	719(35), 701(100), 683(5), 677(10), 659(15)	683(100), 657(20), 641(15), 477(15)	665(80), 655(95), 641(30), 555(75), 485(100)
KukC	9.83	Kukurbitacin C	C ₃₃ H ₄₉ O ₁₀ ⁻	605.33312	605.33069	4.01	577(5), 559(15), 541(15), 499(100)	469(20), 413(20), 383(100), 339(5), 273(65)	365(10), 339(30), 327(35), 273(100), 245(10)

^a "u" - Nedektovani fragmenti.

^b Brojevi pikova i oznake koje odgovaraju Slici 25.

^c Potvrđeni korišćenjem dostupnih standarda. Ostala jedinjenja su potvrđena hromatografskim i masenim podacima dostupnim u literaturi.

^d **Podebljani** pikovi su dalje fragmentisani u MS³ i MS⁴ eksperimentima.

^e Molekulski joni derivata kukurbitacina su detektovani u masenom spektru kao konjugati sa mravljom kiselinom.

Pored kvalitativne, urađena je i kvantitativna analiza 16 fenolnih jedinjenja i 4 kukurbitacina u ELK pomoću UHPLC-qqqMS² sistema. Fenolna jedinjenja su raspoređena prema zastupljenosti u ELK u sledeće grupe: (1) fenolne kiseline i njihovi derivati, to su hidroksicinaminske (jedinjenja 7, 8, 10, 12, 13) i hidroksibenzoeve kiseline (1, 4, 9, 11) i (2) flavonoidi, uključujući flavone (33, 30, 25), flavonole (24, 26) i flavanone (32). Strukture fenolnih jedinjenja su nedvosmisleno potvrđene na osnovu njihovih retencionih vremena, MS i MS² spektara referentnih standarda. Kukurbitacini su identifikovani na osnovu standarda KukB. Koliziona energija (20-30 eV) eksperimentalno je optimizovana za svako jedinjenje dok nije postignut stabilan fragmentacioni obrazac. 30 eV za fenolna jedinjenja i glikozide kukurbitacina i 20 eV za aglikane kukurbitacina. Po dva karakteristična fragmenta su izabrana za kvantifikaciju svakog jedinjenja u SRM modu UHPLC/MS instrumenta (Tabela 3).

Rezultati su pokazali da su kukurbitacini daleko najzastupljenija grupa jedinjenja u ELK. Koncentracija najzastupljenijeg kukurbitacina, kukurbitacina C 3-*O*-heksozida bila je oko 282,833 ng/100 mg suvog ekstrakta, što je skoro 8 puta više nego koncentracija kukurbitacina C, drugog najzastupljenijeg jedinjenja (Tabela 3). Kukurbitacini F i kukurbitacin B 2-*O*-heksozid bili su prisutni u značajno nižim koncentracijama (~6744 ng/100 mg i ~4943 ng/100 mg suvog ELK, redom). Među fenolima, apigenin 8-*C*-glukozid (25) je bio najzastupljenije jedinjenje ~2384 ng/100 mg, zatim kofeinska kiselina ~1313 ng/100 mg i naringenin ~802 ng/100 mg. Ostali fenoli su bili prisutni u značajno nižim količinama.

Table 3. Kvantitativna analiza odabranih jedinjenja ekstrakta lista krastavca upotrebom *UHPLC-qqqMS²* sistema u SRM modu koristeći dva karakteristična MS² fragmenta za svako jedinjenje.

Označeni pik ^a	t _R , min	Naziv jedinjenja	[M-H] ⁻	MS ² fragmenti [M-H] ⁻	Koncentracija (ng/100 mg suvog ELK)
1	1.75	Protokatehuinska kiselina ^b	153	109;108	t
4	2.53	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^b	137	109; 93	t
7	3.07	Aeskuletin ^b	177	149; 105	0,594±0,209
8	3.19	Kofeinska kiselina ^b	179	135; 134	1312,997±106,743
9	3.54	Siringinska kiselina ^b	197	182; 123	1,433±0,213
10	4.03	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^b	163	119; 93	72,832±2,905
11	4.25	Vanilinska kiselina ^b	167	152; 123	t
12	4.51	Sinapinska kiselina ^b	223	193; 121	38,275±1,517
13	4.51	Ferulinska kiselina ^b	193	178; 134	30,382±7,899
24	4.58	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (Rutin) ^b	609	301; 300	8,260±0,146
25	4.61	Apigenin 8- <i>C</i> -glukozid (Viteksin) ^b	431	311; 269	2383,974±51,477
26	4.84	Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid (Isokvercetin) ^b	463	300; 243	50,149±4,179
30	5.09	Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid (Apigetrin) ^b	431	268; 211	22,197±2,812
32	6.36	Naringenin ^b	271	151; 119	802,433±38,156
33	6.40	Apigenin ^b	269	149;117	5,263±2,028
KukF	5.40	Kukurbitacin F ^{c,d}	563	517; 487	6744,213±132,292
CH	5.75	Kukurbitacin C 2- <i>O</i> heksozid ^{c,d}	767	722; 704	282833,200±1067,685
BH	6.42	Kukurbitacin B 2- <i>O</i> heksozid ^{c,d}	765	702; 618	4943,665±41,840
KuCC	6.57	Kukurbitacin C ^{c,d}	605	559; 500	35128,750±363,370

"t"- Detektovani u tragovima.

^a Označeni pikovi, odgovaraju pikovima u Tabeli 2 i Slici 25.

^b Kvantifikovani korišćenjem dostupnih standarda.

^c Kvantifikovani na osnovu standardne prave KukB. Jedinjenja su potvrđena hromatografskim i masenim podacima dostupnim u literaturi.

^d Molekulski joni derivata kukurbitacina su detektovani u masenom spektru kao konjugati sa mravljom kiselinom.

Koncentracije jedinjenja su izražene kao ng/100 mg suvog ekstrakta lista krastavca.

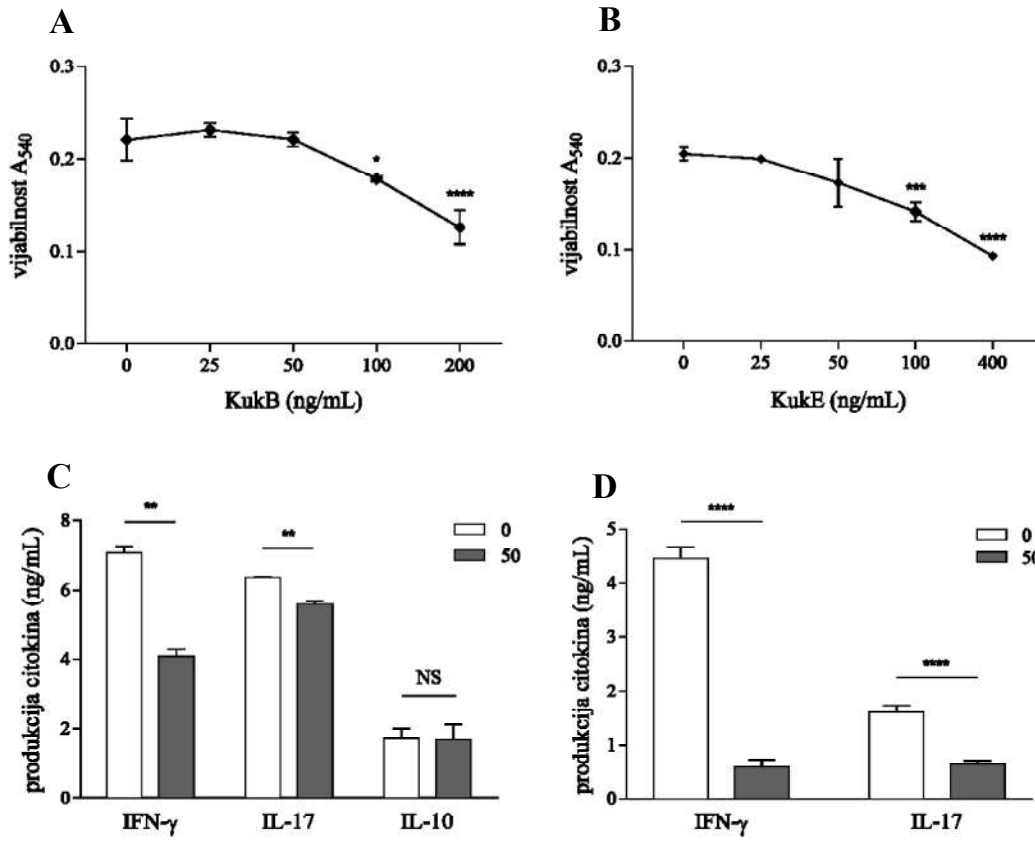
Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da ekstrakt lista krastavca obiluje različitim klasama jedinjenja, od kojih triterpeni kukurbitacini predstavljaju daleko najzastupljenije forme sekundarnih biljnih metabolita. Među kukurbitacinima, po zastupljenosti u ELK izdvojio se KukC i njegov 3-*O*-glikozid, a zatim KukF i glikozid KukB.

4.12. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na ćelije drenirajućih limfnih čvorova *in vitro*

Nakon utvrđenog hemijskog sastava ELK i zaključka da ekstrakt u najvećoj meri sadrži glikozid KukC i KukC u odnosu na ostala jedinjenja, pretpostavka je bila da zapaženi efekti ekstrakta potiču od ovog jedinjenja. Međutim KukC je komercijalno nedostupan, a za izolovanje čistog jedinjenja su potrebne ogromne količine biljnog materijala. Pošto svi kukurbitacini dele veoma sličnu hemijsku strukturu, pretpostavljeno je da različiti kukurbitacini ostvaruju slične biološke efekte. Zbog toga je odlučeno da se ispituju imunomodulacijske osobine KukB čiji glikozid je takođe prisutan u ELK, kao i KueE, koji je jedan od najzastupljenijih i najispitivanijih kukurbitacina u prirodi.

Prvi korak je bio da se ispita efekat KukB i KueE na ćelije DLČ *in vitro*. Ćelije DLČ su izolovane 7. dana nakon imunizacije DA pacova MOG₃₅₋₅₅ peptidom, a potom restimulisane istim peptidom i tretirane različitim koncentracijama KukB i KueE u trajanju od 24h. Nakon toga, metabolička vijabilnost ćelija merena je testom MTT, a produkcija relevantnih citokina testom ELISA.

Rezultati su pokazali da KukB u koncentracijama od 100 i 200 ng/mL smanjuje preživljavanje ćelija, dok u nižim koncentracijama nema uticaja na preživljavanje (Slika 26A). Slični rezultati su dobijeni i za KueE gde je pokazano da koncentracije niže od 100 ng/mL ne utiču na preživljavanje ćelija DLČ (Slika 26B). Za dalja istraživanja izabrana je koncentracija od 50 ng/mL i jednog i drugog jedinjenja. Tretiranjem ćelija DLČ sa 50 ng/mL KukB došlo je do značajnog smanjenja produkcije citokina IFN- γ i IL-17, dok je produkcija IL-10 ostala nepromenjena u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 26C). KueE je pokazao sličan trend u smanjenju produkcije IFN- γ i IL-17 (Slika 26D).



Slika 26. Efekat KukB B i KukE E na vijabilnost i produkciju citokina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Ćelije DLČ su stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (10 μg/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (25, 50, 100 i 200 odnosno 400 μg/mL) KukB ili Kuke u trajanju od 24h. Nakon 24h, metabolička vijabilnost ćelija je određena testom MTT (A, B). Testom ELISA je određena produkcija citokina IFN-γ, IL-17 i IL-10 u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa KukB (C), dok je produkcija citokina IFN-γ i IL-17 određena u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa Kuke (D). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

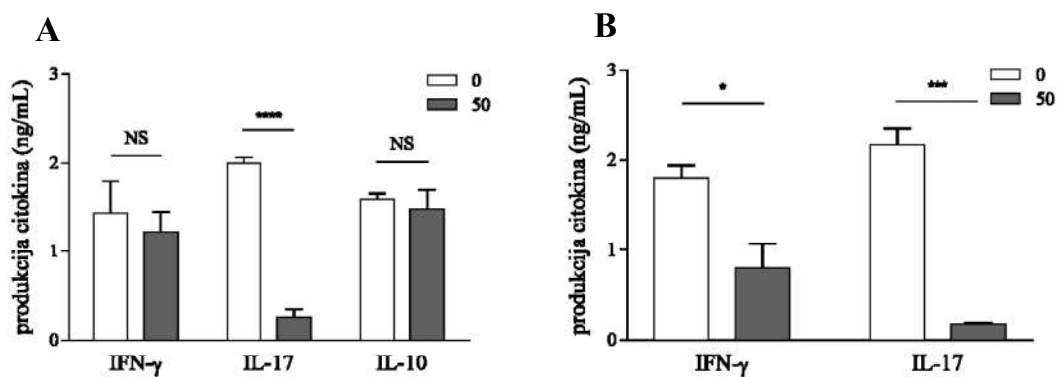
Ovi rezultati su pokazali da jedinjenja KukB i Kuke u koncentraciji koja ne utiče na preživljavanje ćelija ostvaruju značajno imunomodulacijsko dejstvo tako što smanjuju produkciju proinflamacijskih citokina IFN-γ i IL-17 u ćelijama DLČ.

4.13. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na prečišćene CD4⁺ T limfocite *in vitro*

S obzirom da je u više prethodnih navrata opisan značaj CD4⁺ T ćelija u EAE, sledeći cilj je bio da se utvrdi efekat odabranih jedinjenja na ovim ćelijama.

CD4⁺ T limfociti su prečišćeni magnetnom separacijom iz ćelija DLČ imunizovanih životinja kako je to već naglašeno ranije. Tako dobijene ćelije su potom stimulisane anti-CD3 i anti CD-28 antitelima i tretirane jedinjenjima KukB i Kuke.

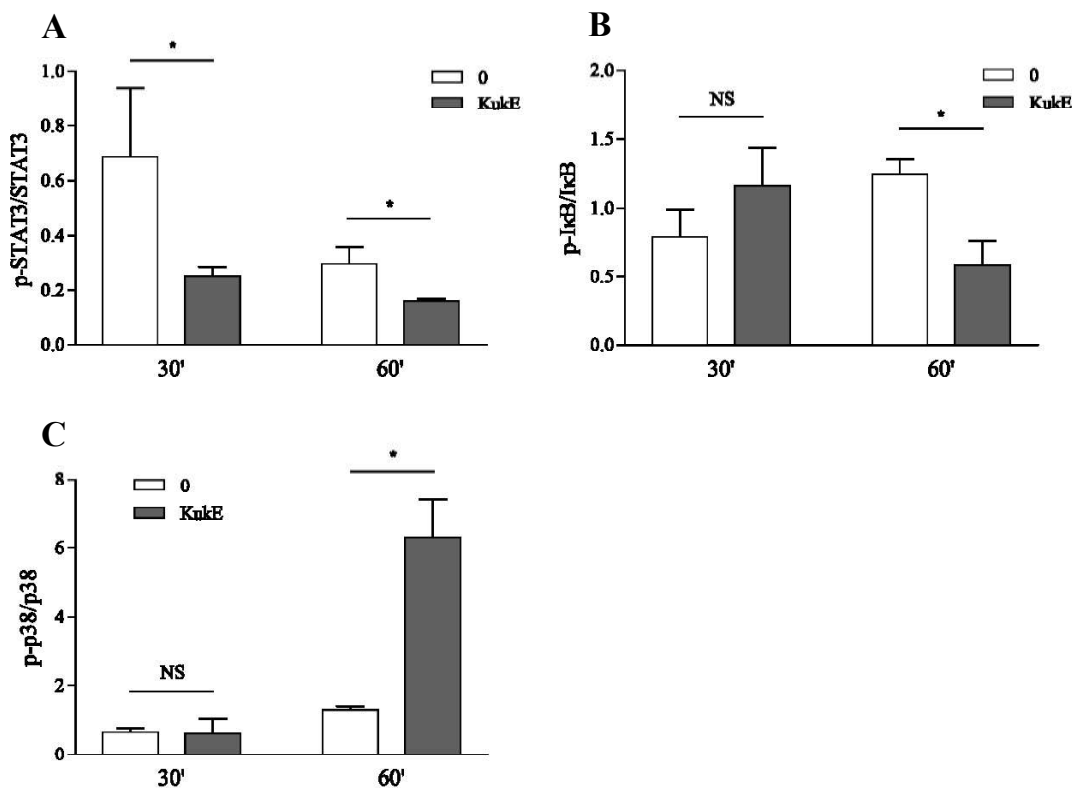
Rezultati su pokazali da je KukB smanjio produkciju IL-17, dok je produkcija IL-10 i IFN- γ ostala nepromenjena u CD4⁺ T limfocitima iz MOG₃₅₋₅₅ imunizovanih pacova (Slika 27A). Slično, Kuke je doveo do smanjenja produkcije IFN- γ i IL-17 od strane CD4⁺ T limfocita iz MBP imunizovanih pacova (Slika 27B).



Slika 27. Efekat KukB i Kuke na produkciju citokina u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ životinja imunizovanih sa MOG₃₅₋₅₅ ili MBP, a potom stimulisani u prisustvu anti-CD3 i anti-CD28 antitela (1 μ g/mL) i u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) KukB ili Kuke u trajanju od 24h. Testom ELISA je određena produkcija citokina IFN- γ , IL-17 i IL-10 u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa KukB (A), dok je produkcija citokina IFN- γ i IL-17 određena u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa Kuke (B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

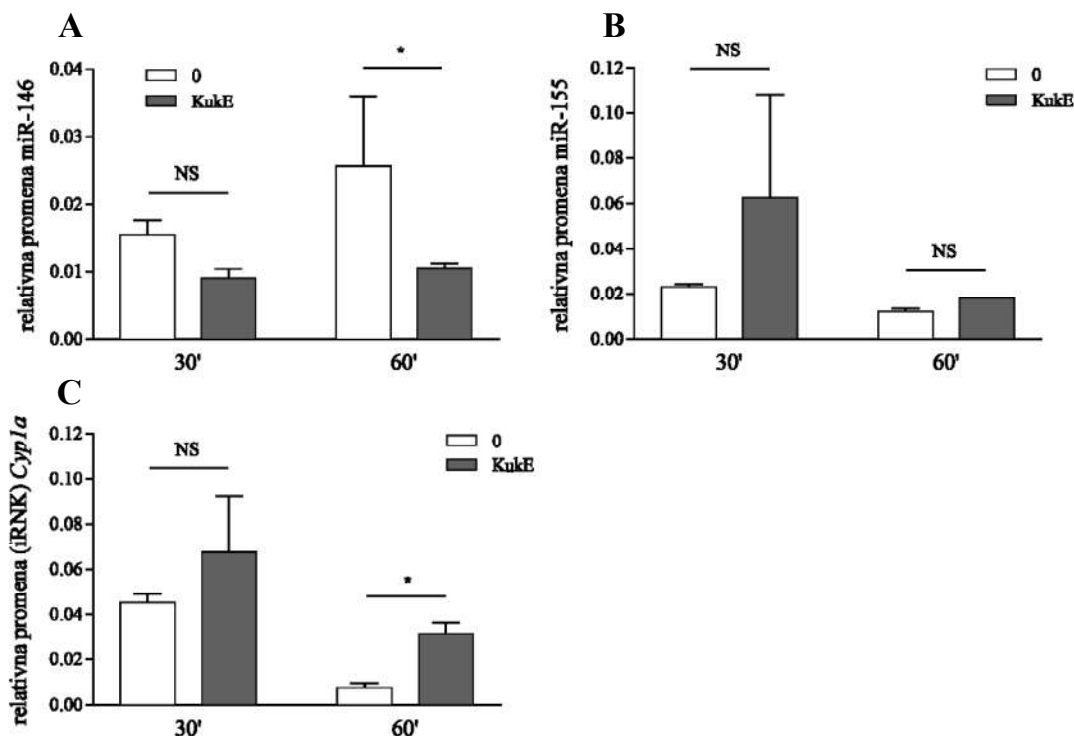
S obzirom da su uočeni isti trendovi u smanjenju produkcije glavnih efektorskih citokina od strane antigen-specifičnih CD4⁺ T limfocita, odlučeno je da se ispituju unutarćelijski molekularni signalni putevi u ovim ćelijama. U tu svrhu izolovani CD4⁺ T limfociti iz MBP imunizovanih pacova su tretirani sa KueE u kratkim vremenskim intervalima od 30 i 60 min nakon čega su izolovani ukupni proteini i pripremljeni za analizu metodom Western blot.

Merenjem nivoa ukupne i fosforilisanе forme regulatornih proteina STAT3, IκB i p38 došlo se do zaključka da KueE smanjuje aktivaciju STAT3 signalnog puta u oba vremenska intervala (Slika 28A), dok je aktivacija signalnog puta NF-κB smanjena nakon 60 min (Slika 28B). Nasuprot smanjenoj aktivaciji signalnih puteva STAT3 i NF-κB, KueE je doveo do aktivacije p38 signalnog puta (Slika 28C).



Slika 28. Efekat Kuke na signalne puteve u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ i tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) Kuke u trajanju od 30 i 60 min. Nakon isteka vremena, ukupni proteini su izolovani iz ćelija i metodom Western blot je određen odnos proteina p-STAT3/STAT3 (A), pIκB/IκB (B) i p-p38/p38 (C). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni denzitometrijskom analizom iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Pored analize ova tri signalna puta, analiziran je i relativan nivo ekspresije miR-155, miR-146 i (iRNK) *Cyp1a* za koje je pokazana bitna uloga u funkcionisanju efektorskih CD4⁺ T limfocita. Rezultati RT-qPCR su pokazali da Kuke dovodi do smanjenja nivoa relativne ekspresije miR-146 nakon 60 min (Slika 29A), dok su nivoi ekspresije miR-155 i (iRNK) *Cyp1a* blago povišeni (Slika 29B, C).



Slika 29. Efekat Kuke na signalne puteve u prečišćenim CD4⁺ T limfocitima. CD4⁺ T limfociti su prečišćeni iz ćelija DLČ i tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) Kuke u trajanju od 30 i 60 min. Nakon isteka vremena, ukupna RNK je izolovana i određena je relativna promena miR-146 (A), miR-155 (B) i (iRNK) *Cyp1a* (C) metodom RT-qPCR. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

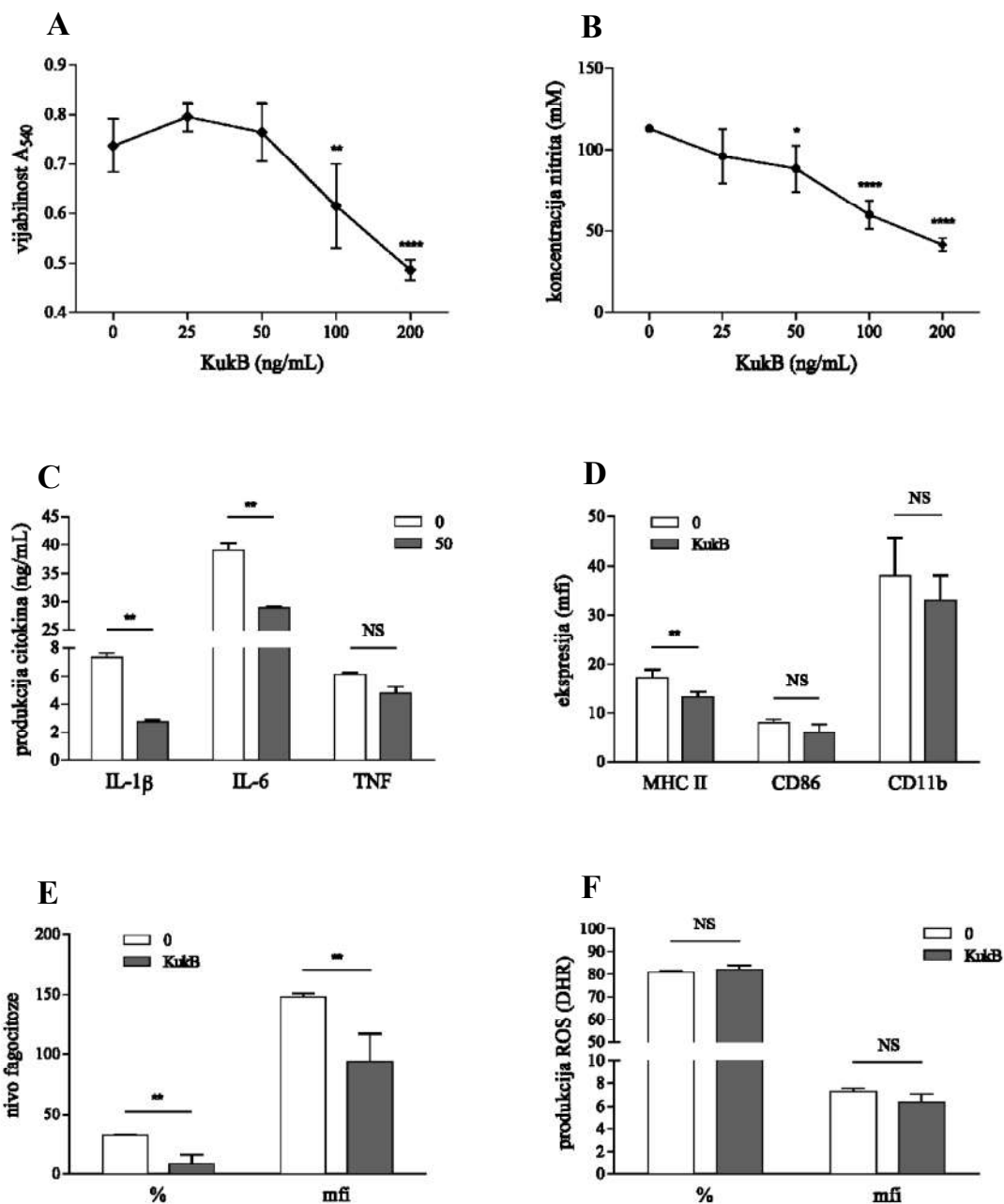
Ovi rezultati nam ukazuju da KukB i KueE ostvaruju inhibični efekat na encefalitogene CD4⁺ T limfocite smanjujući produkciju citokina IFN- γ i IL-17 od strane ovih ćelija. Uočeni efekat je posledica modulacije različitih signalnih puteva u CD4⁺ T limfocitima što je i pokazano u eksperimentima sa KueE, koji je inhibirao signalni put STAT3, NF- κ B i nivo miR-146, dok je sa druge strane uticao na aktiviranje signalnog puta p38 MAPK i blago povećanje nivoa miR-155 i (iRNK) *Cyp1a*.

4.14. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na makrofage *in vitro*

Sledeći cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj KukB i KueE na efektorske funkcije peritonealnih makrofaga.

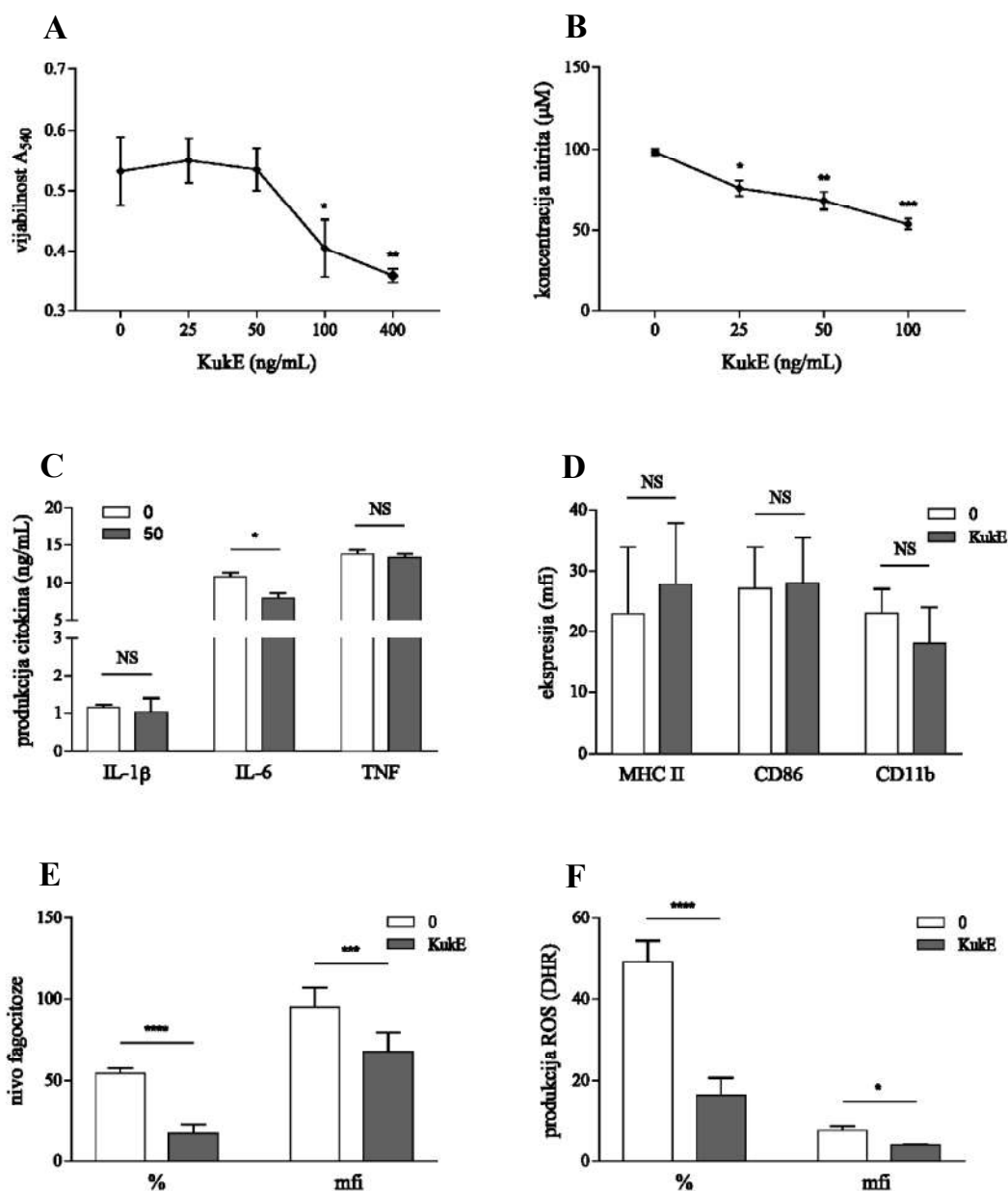
Peritonealni makrofagi su dobijeni lavažom zdravih DA pacova, a potom su stimulisani LPS i tretirani različitim koncentracijama KukB i KueE. Funkcionalni status ćelija je utvrđen merenjem istih parametara kao i u eksperimentima sa ELK.

Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da KukB u koncentraciji od 100 ng/mL, kao i u višim koncentracijama smanjuje preživljavanje ćelija, zbog čega je u daljim eksperimentima korišćena koncentracija od 50 ng/mL (Slika 30A). U koncentraciji od 50 ng/mL KukB značajno smanjuje produkciju nitrita, kao i produkciju citokina IL-1 β , IL-6 i TNF (Slika 20B, C). Isto tako, smanjen je nivo ekspresije molekula MHC II na površini ćelija, dok je nivo ekspresije CD86 i CD11b ostao nepromenjen (Slika 30D). Kada se govori o fagocitozi, tu je takođe uočljiv efekat KukB jer dolazi do smanjenja nivoa fagocitoze u ukupnom procentu ćelija i po ćeliji (Slika 30E). Međutim, efekat KukB izostaje kada je u pitanju produkcija ROS, gde ne postoje statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom (Slika 30F).



Slika 30. Efekat KukB na vijabilnost, produkciju nitrita, ekspresiju površinskih molekula, nivo fagocitoze i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u makrofagima. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) KukB u trajanju od 24h. Nakon 24h, vijabilnost ćelija je određena testom CV (A), a produkcija nitrita testom Gris (B). Procenat ćelija i nivo ekspresije (mfi) površinskih molekula MHC II, CD86 i CD11b (C), fagocitoza (D) i produkcija ROS (E) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Što se tiče uticaja KukE na makrofage može se reći da je ostvareno toksično dejstvo na preživljavanje makrofaga u koncentracijama 100, 400 ng/mL i višim, dok niže koncentracije nisu imale uticaja (Slika 31A). Dalje, KukE je smanjio produkciju nitrita i to na dozno zavisnan način (Slika 31B). KukE u koncentraciji od 50 ng/ml je smanjio produkciju IL-6, ali ne i drugih ispitanih citokina (Slika 31C). Kada je reč o nivou ekspresije površinskih molekula MHC II, CD86 i CD11b, KukE nije ostvario značajni efekat (Slika 31D), ali je zato procenat i nivo fagocitoze kao i produkcija ROS smanjena u makrofagima nakon tretmana KukE (Slika 31E, F).



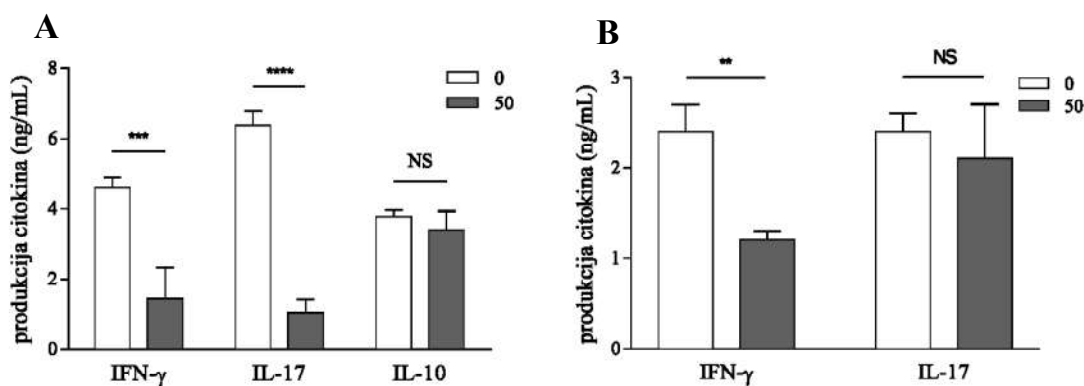
Slika 31. Efekat KukE na vijabilnost, produkciju nitrita, ekspresiju površinskih molekula, nivo fagocitoze i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u makrofagima. Peritoenalni makrofagi su stimulisani LPS (10 ng/mL) u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) KukE u trajanju od 24h. Nakon 24h, vijabilnost ćelija je određena testom CV (A), a produkcija nitrita testom Gris (B). Procenat ćelija i nivo ekspresije (mfi) površinskih molekula MHC II, CD86 i CD11b (C), fagocitoza (D) i produkcija ROS (E) su određeni metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS - bez statističke značajnosti.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da KukB i KukE ostvaraju vrlo sličan efekat delovanja na peritonealne makrofage *in vitro*, tako što oba jedinjenja u koncentraciji koja ne utiče na preživljavanje ćelija smanjuju nivo fagocitoze, kao i produkciju NO i citokina IL-6. Razlike su uočavaju na nivou produkcije ROS, gde je KukE za razliku od KukB inhibirao njihovu produkciju, dok je KukB sa druge strane smanjio produkciju citokina IL-1 β i nivo ekspresije molekula MHC II u makrofagima.

4.15. Imunomodulacijski uticaj odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na infiltrate kičmene moždine *in vitro*

Infiltrati imunskih ćelija su izolovani na piku bolesti iz kičmene moždine DA pacova imunizovanih HKM u CFA. IKM su potom tretirani sa KukB ili Kuke bez dodatne stimulacije jer se ove ćelije već smatraju *in vivo* reaktiviranim u CNS.

Rezultati su pokazali da KukB u primenjenoj koncentraciji od 50 ng/mL značajno smanjuje produkciju glavnih efektorskih citokina IFN- γ i IL-17 od strane IKM, dok produkcija IL-10 ostaje nepromenjena (Slika 32A), dok Kuke jedino utiče na smanjenje produkcije IFN- γ (Slika 32B).



Slika 32. Efekat Kukurbitacina B i Kukurbitacina E na produkciju citokina u infiltratima kičmene moždine. Infiltrati imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine su tretirani u odsustvu (0) ili prisustvu (50 ng/mL) KukB ili Kuke u trajanju od 24h. Testom ELISA je određena produkcija citokina IFN γ , IL-17 i IL-10 u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa KukB (A), dok je produkcija citokina IFN γ i IL-17 određena u supernatantima ćelijskih kultura tretiranih sa Kuke (B). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odnosu na 0; NS—bez statističke značajnosti.

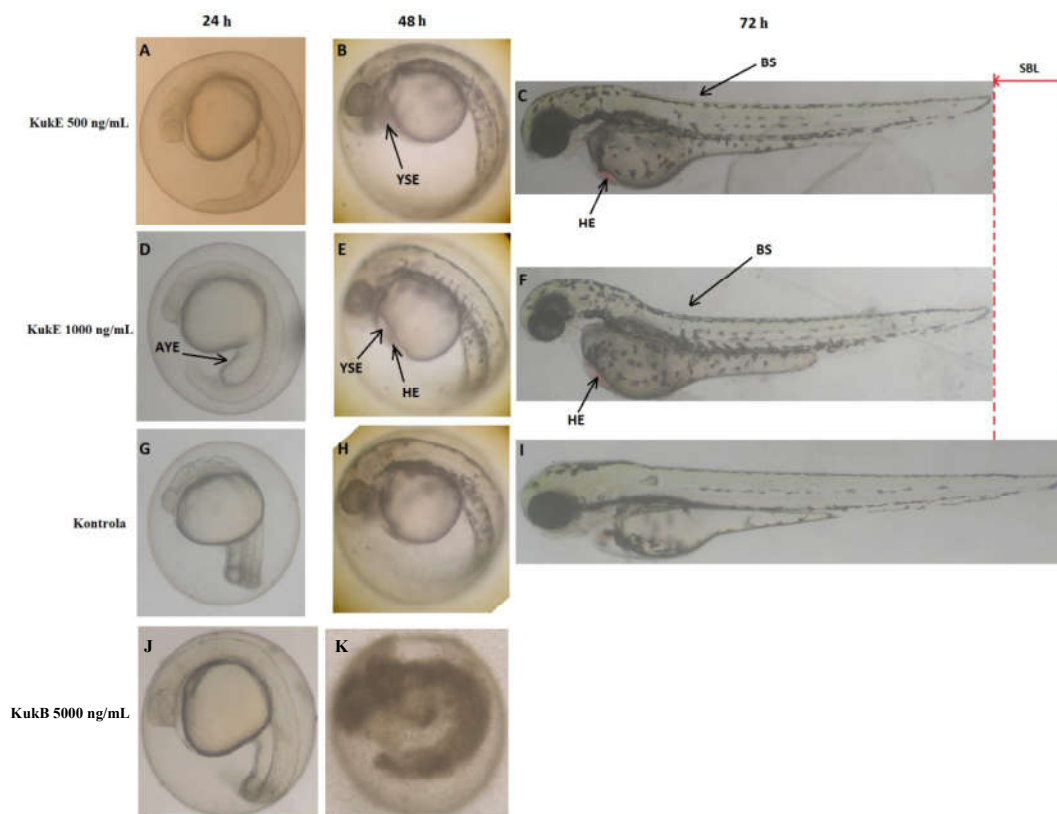
Ovi rezultati nam govore da oba jedinjenja smanjuju produkcije citokina IFN- γ od strane IKM, dok je KukB zadržao ovaj efekat i u slučaju citokina IL-17. Produkcija citokina IL-10 je ostala nepromenjena u tretmanu sa KukB. Sveukupni efekat govori o značajnom antiencefalitogenom potencijalu KukB i Kuke.

4.16. Efekat odabranih jedinjenja kukurbitacina B i kukurbitacina E na razvoj embriona zebrice

Kao što je prethodno opisano u odeljku 4.10. cilj je bio da se ispita toksičnost odabranih jedinjenja KukB i KukE na modelu zebrice.

Oplođena jaja zebrice su sakupljena i tretirana različitim dozama KukB i KukE i naredna 72 h se pratio razvoj embriona, odnosno smrtnost i različite morfološke promene tokom razvića.

Rezultati su pokazali da doze KukB od 10, 50, 100, 500 i 1000 ng/mL ne ispoljavaju toksični efekat na razvoj embriona zebrice. Jedino je doza od 5 µg/mL dovela do 100% smrtnosti embriona nakon 48h (Slika 33J, K). Za razliku od KukB, embrioni tretirani sa 500 ng/mL KukE razvili su edeme žumancetne kesice nakon 48h dok je savijena kičma i hemaglutinacija uočena nakon 72h (Slika 33C, F). Pored simptoma koji su uočeni u dozi od 500 ng/mL u dozi od 1000 ng/mL uočeno je i proširenje žumanceta nakon 24h (Slika 33D).



Slika 33. Efekat KukB i Kuke na razvoj embriona zebriće *in vivo*. Razvoj embriona se pratio u odsustvu (G,H,I) i prisustvu različitih doza KukB i Kuke (10, 50, 100, 500, 1000 i 5000 ng/mL). Prikazane su reprezentativne slike (40x uveličanje) embriona u razvoju u različitim vremenskim tačkama nakon fertilizacije (24h, 48h i 72h). YSE - yolk sac edema, AYE - abnormal yolk extension, BS - bent spine, HE – hemaglutinacija, SBL - shortening of the body length. Opaženi efekti su bili značajni ako su uočeni u više od 50% embriona po tretmanu u poređenju sa kontrolnom grupom.

Ovi rezultati pokazuju da KukB i Kuke ne ostvaruju toksičan efekat na embrionima zebriće u dozama koje su iznad onih primenjenih u *in vitro* eksperimentima.

5. Diskusija

Terapijski pristupi u autoimunskim bolestima predstavljaju veliki izazov posebno zato što su uzročnici ovih bolesti često nepoznati, a za najveći broj ovih bolesti važi da nastaju kao posledica kombinacije genetičkih faktora i faktora spoljašnje sredine. Samim tim je teže identifikovati ciljeve delovanja lekova. Kada je MS u pitanju, različiti terapijski pristupi se primenjuju u tretmanu ove bolesti, a svi se u osnovi bave modulacijom imunskog sistema u cilju ublažavanja autoimunskog odgovora protiv CNS i povratka imunske ravnoteže. Jedinjenja biljaka, a posebno polifenoli, su pokazala da poseduju različite imunomodulacijske osobine delujući na različitim nivoima, od započinjanja, efektorskih funkcija do završetka imunskog odgovora. Pored polifenola biljke poseduju i druge sekundarne metabolite koji su vredni istraživanja, jer mogu imati farmakološki potencijal u lečenju bolesti. Zbog toga, u ovoj doktorskoj disertaciji su ispitivana imunomodulacijska svojstva različitih ekstrakata krastavca, biljke koja se svakodnevno koristi u ishrani ljudi širom sveta, a čija su antiinflamacijska, antioksidacijska i druga blagotvorna svojstva već potvrđena u različitim istraživanjima (Mukherjee i sar., 2013).

Kao model sistem u ovoj doktorskoj disertaciji je korišćen EAE. Bolest je indukovana aktivnom imunizacijom ženki pacova soja DA antigenima CNS emulgovanim u CFA. Nakon imunizacije, praćen je imunomodulacijski uticaj različitih ekstrakata krastavca na ćelije i tkiva imunskog sistema i CNS. Ekstrakti krastavca su pripremani od biljaka koje su gajene u kontrolisanim uslovima hidroponike. Za pripremu ekstrakata primenjeni su različiti pristupi ekstrakcije. Svi ekstrakti su preliminarno testirani u *in vitro* sistemu na ćelijama dobijenim iz pacova imunizovanih da razviju EAE. U tom smislu najpre je ispitivan uticaj različitih ekstrakata krastavca na Th1 i Th17 ćelijski odgovor koji se formira u DLČ nakon imunizacije, a praćena je produkcija glavnih encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17. Ovo je učinjeno sa ciljem odabira ekstrakta sa najpotentnijim imunomodulacijskim svojstvima. Nakon odabira ekstrakta lista krastavca u daljim istraživanjima, ispitani su molekularni mehanizmi koji leže u osnovi delovanja ELK na CD4⁺ T limfocite. Posmatrana je produkcija citokina (IFN- γ , IL-17, IL-10) kao i aktivacija glavnih signalnih puteva odgovornih za aktivaciju i diferencijaciju CD4⁺ T limfocita kao što su signalni put Nf- κ B i p38 (MAPK).

Dalje je ispitivan uticaj ELK na imunske ćelije creva, jer se smatra da se upravo u crevima vrši ključna regulacija (auto)imunskog odgovora. Takođe, vršeno je i ispitivanje ELK na ćelije koje su infiltrirale u kičmenu moždinu i dovele do inflamacije CNS, odnosno na encefalitogene ćelije dobijene iz samog ciljnog organa. *In vitro* je praćena produkcija citokina IFN- γ , IL-17 i IL-10 u ovim ćelijama.

Takođe, pored ćelija adaptivne imunosti, ispitivan je i uticaj ELK na ćelije urođene imunosti kao što su DĆ i makrofagi *in vitro*. Eksperimenti ko-kultivacije DĆ sa encefalitogenim T limfocitima u prisustvu ELK dali su odgovor o uticaju ELK na DĆ ćelije koje su bitne za otpočinjanje imunskog odgovora. Isto tako, ispitan je uticaj ELK na makrofage koji su bitni u efektorskoj fazi EAE. U tom smislu, posmatrani su glavni parametri aktivacije makrofaga kao što su produkcija proinflamacijskih citokina IL-1 β , IL-6 i TNF, ekspresija antigen prezentujućeg molekula MHC II i ko-stimulatornog molekula CD86. Pored toga, procenjen je i uticaj ELK na fagocitnu aktivnost makrofaga i produkciju ROS i NO.

U cilju definisanja potencijalnih molekula odgovornih za imunomodulacijske osobine ELK, urađena je kvalitativna i kvantitativna analiza ELK upotrebom masene spektrometrije. Na osnovu dobijenih rezultata i konsultovanjem literature odabrana su jedinjenja kukurbitacin E i kukurbitacin B čija su imunomodulacijska dejstva takođe testirana u modelu EAE *in vitro* i *in vivo*. Na kraju, ELK, Kuke i KukB su primenjeni *in vivo* u modelu zebrice i EAE. Rezultati na modelu zebrice su dali uvid u citotoksičnost ekstrakta i primenjenih jedinjenja. Testiranje u modelu EAE je omogućilo procenu potencijalnog farmakološkog dejstva ELK gde je u nezavisnim eksperimentima praćena klinička slika i *ex vivo* analizirani DLČ u cilju procene aktivacije CD4⁺ T limfocita, APĆ i produkcije citokina od interesa.

Prvi korak u ispitivanju bioloških aktivnosti prirodnih proizvoda je njihova izolacija iz prirodnog izvora. Sam proces obično započinje ekstrakcijom tečnim rastvaračima, a nastavlja se različitim separacionim tehnikama u cilju dobijanja čistog jedinjenja. Ekstrakcija rastvaračima se zasniva na korišćenju dva rastvarača različite polarnosti koji se ne mešaju ili se mešaju u malom procentu. Tokom ekstrakcije jedinjenja se raspoređuju između rastvarača u zavisnosti od njihovih particionih koeficijenata koji zavise od fizičkih i hemijskih osobina molekula (Sarker i sar., 2005).

Zbog toga, izbor rastvarača predstavlja fudamentalni korak u optimizaciji procedure za ekstrakciju. Kada je potrebno izvesti veliki broj ekstrakcija, generalno nije prikladno ekstrahovati svaki biljni uzorak sa prilagođenim sistemom rastvarača. Iz tog razloga, obično se razvija opšti postupak pripreme ekstrakata koji uzima u obzir testiranje različitih frakcija ekstrakcije na biološku aktivnost (Statz i Coon, 1976). Ovakav pristup je primenjen u ovoj tezi. Za pripremu ekstrakata, konsultovanjem literature (Sarker i sar., 2005), izabrana su dva pristupa ekstrakcije, prvi u kojem je ekstrakcija vršena korišćenjem nemešljivih rastvarača (protokol 1), i drugi gde su korišćeni delimično mešljivi rastvarači (protokol 2). U početnoj fazi sva jedinjenja su ekstrahovana iz biljnog tkiva sa MeOH ili EtOH. U protoklu 1, maceracija se odvijala u 100% MeOH na sobnoj temperaturi, a u drugom protokolu u 96% EtOH na +30°C. U oba slučaja je korišćeno mešanje kako bi se potpomogla ekstrakcija. Zatim je usledio korak „odmaščivanja“ sa *n*-heksanom u cilju uklanjanja nepolarnih jedinjenja kao što su hlorofil, lipidi i slično. Nakon ovog koraka usledila je ekstrakcija različitim rastvaračima pri čemu su dobijene frakcije koje su testirane na biološku aktivnost. U protokolu 1, vodeni rastvor je ekstrahovan rastvaračima rastuće polarnosti CHCl₃ i EtOAc, dok je u drugom protokolu 40% MeOH rastvor ekstrahovan sa CH₂Cl₂. Na ovaj način se obezbeđuje razdvajanje jedinjenja na osnovu njihove polarnosti, gde se jedinjenja srednje polarnosti kao što su flavonoidi i neki terpeni očekuju u CHCl₃ i CH₂Cl₂ dok u EtOAc prelaze više polarna jedinjenja kao što su monoglikozidi flavonoida. U zaostalom vodenom i 40% MeOH sloju se očekuju najpolarniji glikozidi i šećeri. Kao biljni materijal u oba protokola je korišćen list krastavca zbog svoje prednosti u biomasi i lakoći pripreme u odnosu na stablo i koren. Dobijena su tri različita ekstrakta: E1 - hloroformski ekstrakt; E2 - etilacetatni ekstrakt; E3 - metilenhloridni ekstrakt.

Testiranje ekstrakata na ćelijama DLČ i CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz DLČ imunizovanih životinja pokazalo je da ekstrakt E3 pripremljen po protokolu 2 u koncentraciji koja ne utiče na preživljavanje ćelija dovodi do značajnog smanjenja produkcije citokina IFN- γ i IL-17 u ovim ćelijama u odnosu na ekstrakte E1 i E2. Na osnovu ovog rezultata, metoda pripreme ekstrakta prema protoklu 2 je izabrana za pripremu svih drugih ekstrakta.

U sledećem koraku odabranom metodom ekstrakcije napravljeni su ekstrakti korena, stabla i lista biljaka gajenih u normalnim uslovima, kao i ekstrakti listova kojima su nanošena mehanička oštećenja. Nanošenjem ovakvih oštećenja u biljkama se aktiviraju biološki mehanizmi odbrane biljaka od stresa koji kao posledicu imaju povećanje produkcije različitih sekundarnih jedinjenja (de Matos Nunes i sar., 2014).

Napravljeni ekstrakti su takođe testirani na ćelijama DLČ i ustanovljeno je da ekstrakt lista krastavca (ELK) kome su naneta mehanička oštećenja ostvaruje najizraženiji efekat na smanjenje produkcije proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17. Iz tog razloga, ELK dobijen ekstrakcijom lista sa mehaničkim oštećenjem je korišćen u daljim istraživanjima ove doktorske disertacije.

Fitohemijska analiza ELK je ustanovila prisustvo 37 različitih jedinjenja iz grupe polifenola i tetracikličnih triterpena kukurbitacina. Identikovana polifenolna jedinjenja u ELK su već potvrđena u krastavcu i srodnim vrstama. Derivati flavona (apigenin, luteolin i hrizoeriol) se uglavnom pojavljuju kao flavonoid C-glikozidi u ekstraktu krastavca (Abu-Reidah i sar., 2012) (Yasir i sar., 2016), što je i potvrđeno u ovoj studiji. Među izmerenim flavonoidima, apigenin 8-C-glukozid je najzastupljeniji u ELK. Pored toga identifikovano je prisustvo kvercetina, kofeinske kiseline i naringenina. Fitohemijska analiza ELK je i u saglasnosti sa nekim ranijim studijama, koje su pokazale visoku zastupljenost kukurbitacina u krastavcu i generalno u vrstama familije *Cucurbitaceae*. Kukurbitacin C predstavlja najzastupljeniji kukurbitacin u krastavcu (Chen i sar., 2005). Glikozilovane forme ovog kukurbitacina (Kukurbitacin C 3-O heksozid) izolovane su iz lišća krastavca cultivar 9930 (Zhong i sar., 2017), koji je takođe korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji. Ovo jedinjenje je potvrđeno kao dominantan kukurbitacin u ELK. Iako je KukB prisutan u mnogim *Cucurbitaceae* vrstama (Chen i sar., 2005), ovo jedinjenje nije identifikovano u ELK. Međutim, njegov glikozid (Kukurbitacin B 2-O-heksozid) je pronađen u ELK, a njegovo prisustvo je prethodno detektovano u dinji (*Cucumis melo*) (Xu i sar., 2013). Takođe, kukurbitacin F je široko rasprostranjen u *Cucurbitaceae* familiji (Chen i sar., 2005), a pronađen je i u ELK. Kako najzastupljenija komponenta ELK, KukC, nije komercijalno dostupan, istraživanja su bila fokusirana na KukB i Kuke.

Iako su kukurbitacini dominantno prisutani u ELK kao glikozidi, pretpostavka je da se aglikanski deo oslobađa dejstvom biljnih i bakterijskih glikozidaza tokom varenja (Gry i Andersson, 2006). Isto tako, treba napomenuti da kukurbitacini dele veoma sličnu hemijsku strukturu, zbog čega je pretpostavka da će ostvariti slične efekte u biološkim sistemima. Iz tog razloga, imunomodulacijski efekti jedinjenja KukB i KukE su ispitani na CD4⁺ T limfocitima i makrofagima *in vitro*.

U ovoj studiji je pokazano da ELK, KukB i KukE ostvaruje inhibitorni efekat na produkciju proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17 u ćelijama DLČ restimuliranih peptidom MOG₃₅₋₅₅. Pored toga, produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10 ostala je očuvana nakon primene ELK i KukB. Ovi rezultati ukazuju da ELK, KukB i KukE imaju sposobnost da ograniče Th1 i Th17 imunski odgovor u ćelijama koje su izolovane iz DLČ u kojima je odgovor i započeo. Takođe, smanjena produkcija citokina IFN- γ i IL-17 je uočena u MLČ i PP nakon primene ELK što govori o uticaju ELK na imunске ćelije creva gde se dešava propagacija i regulacija encefalitogenih T ćelija (Wekerle i sar., 2013). Pored toga, ELK i KukE su inhibirali produkciju IFN- γ i IL-17 u CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz DLČ imunizovanih životinja, dok je KukB bio uspešan u inhibiciji IL-17. I u ovim slučajevima produkcija citokina IL-10 je ostala očuvana. Sa druge strane, ELK i KukB su uspeli da inhibiraju produkciju IFN- γ i IL-17 u *in vivo* restimuliranim CD4⁺ T limfocitima u kičmenoj moždini pacova kod pacova sa EAE, dok je efekat KukE ispoljen samo u slučaju IFN- γ . Na kraju, sama primena ELK *in vivo* dovela je do smanjene produkcije ovih citokina u DLČ. Naime, primena ELK zajedno sa emulzijom za imunizaciju na DA pacovima je smanjila ekspanziju encefalitogenih ćelija u DLČ što je potvrđeno *ex vivo* merenjem ukupne populacije DLČ i merenjem procenta aktiviranih CD4⁺ limfocita (CD134⁺CD4⁺) u ukupnoj populaciji CD4⁺ T limfocita. Pored toga, izlaganje ovako dobijenih ćelija peptidu MOG₃₅₋₅₅ u cilju restimulacije antigen specifičnog odgovora i provere funkcionalnosti ovih ćelija pokazalo je da encefalitogene ćelije dobijene na ovaj način poseduju značajno manji relativan nivo (iRNK) *Ifng* i *Il17*, dok je na proteinskom nivou potvrđeno samo smanjenje produkcije citokina IFN- γ . Relativan nivo (iRNK) *Tgfb* i *Il10* ostao je nepromenjen nakon tretmana sa ELK. Ovi rezultati pokazuju efikasnost ELK u ograničavanju T ćelijskog odgovora *in vivo*.

Sposobnost ELK i njegovih aktivnih komponenti da inhibiraju produkciju IFN- γ i IL-17, odnosno funkcije Th1 i Th17 ćelija može imati izuzetna značaj za njihovo antiencefalitogeno delovanje. Naime, pozitivna koleracija između povećanja produkcije IFN- γ i IL-17 i demijelinizacije CNS u MS i modelu je EAE je potvrđena u mnogim studijama (Arellano i sar., 2015). Pokazano je da IFN- γ reguliše infiltraciju makrofaga i neutrofila u CNS (Lee i sar., 2012). Pored toga, IFN- γ aktivira mikrogliju što dodatno doprinosi neuroinflamaciji.

Međutim, pored patogene uloge, potvrđena je i regulatorna uloga IFN- γ u inflamaciji CNS (Krakowski i Owens, 1996) (Ferber i sar., 1996b). Takođe, IL-17 ispoljava svoje patogeno dejstvo na CNS tako što narušava integritet krvno-moždane barijere i omogućava infiltraciju imunskih ćelija u parenhim CNS (Kebir i sar., 2007b) (Huppert i sar., 2010). Sa druge strane, ELK, K κ B i K κ E ne inhibiraju produkciju IL-10, za koji je pokazana neuroprotektivna funkcija u MS i EAE. Glavna uloga ovog citokina je u supresiji inflamacijskog odgovora i ograničavanju produkcije proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-12, i TNF) (von Boehmer, 2005). Pored toga, IL-10 inhibira prezentaciju antigena od strane APC tako što smanjuje ekspresiju molekula MHC II i ko-stimulatornih molekula CD80 i CD86 na ovim ćelijama (Kwilasz i sar., 2015). Istraživanja uticaja prirodnih proizvoda iz biljaka na Th1 i Th17 ćelijski odgovor su pokazala da luteolin i apigenin inhibiraju proliferaciju antigen-specifičnih T ćelija i produkciju IFN- γ u mišjim i humanim autoreaktivnim T ćelijama *in vitro* (Verbeek i sar., 2005) (Verbeek i sar., 2004). Miševi tretirani apigeninom su pokazali ublaženu kliničku sliku EAE u progresivnom i relapsno-remitentnom modelu EAE (Ginwala i sar., 2016). Ova jedinjenja su detektovana i u ELK. Sposobnost ELK, K κ B i K κ E da ograniče produkciju citokina IFN- γ i IL-17 i očuvaju produkciju IL-10 *in vitro* i *in vivo* jasno govori o njihovom antiencefalitogenom potencijalu i mogućnosti da održe antinflamacijsko okruženje u limfnim tkivima i CNS.

Ovi rezultati su dalje podržani uočenim smanjenjem aktivacije NF- κ B signalnog puta i aktivacijom p38 signalnog puta u encefalitogenim CD4⁺ T limfocitima pod uticajem ELK. Uočeni efekat ELK na CD4⁺ T limfocite je takođe pokazan i u eksperimentima sa K κ E koji koji je inhibirao signalni put STAT3, NF- κ B i nivo miR-146, dok je sa druge strane uticao na aktiviranje signalnog puta p38 MAPK i blago povećanje nivoa miR-155

i (iRNK) *Cyp1a* u CD4⁺ T limfocitima. Signalni put NF-κB reguliše diferencijaciju CD4⁺ T limfocita, posebno Th17 ćelija (Dong, 2008). Specifično isključivanje IκB kinaze (IKK)β neophodne za aktivaciju signalnog puta NF-κB u T limfocitima pokazalo je da su takvi miševi jako rezistentni na indukciju EAE i da poseduju smanjen broj Th17 ćelija (Greve i sar., 2007). Pored direktnog uticaja na T ćelije, NF-κB ostvaruje indirektni uticaj na Th17 tako što reguliše produkciju proinflamacijskih citokina IL-6 i IL-23 u DC i makrofagima (Sun i sar., 2013). Isto tako, NF-κB je bitan i za funkcionisanje Th1 ćelija, što je pokazano u studiji gde su miševi deficijenti za c-Rel, subjedinicu NF-κB, pokazali defekt u Th1 imunskom odgovoru i produkciji citokina IFN-γ (Hilliard i sar., 2002).

Različiti polifenoli deluju na signalni put Nf-κB. Tako je pokazano da apigenin inhibira translokaciju NF-κB u nukleus ćelije i da inhibira fosforilaciju IκBα nakon reaktivacije CD4⁺ T limfocita periferne krvi, kao i u Jurkat T ćelijama (Xu i sar., 2008). Kukurbitacini tako ostvaruju dejstvo na signalni put Nf-κB i p38. Naime, različite studije su već pokazale da KukE inhibira signalni put NF-κB u ćelijskoj liniji makrofaga RAW 264.7 (Qiao i sar., 2013), Jurkat T ćelijskoj liniji (Wang i sar., 2015b), mikrogliji (Park i sar., 2015) i u sinovijalnim ćelijama (Jia i sar., 2015). Sa druge strane, pokazano je da KukE inhibira signalni put p38 u Jurkat T ćelijama (Wang i sar., 2015b). Takođe, KukB, čiji glikozidi su dominantno prisutni u ELK pokazao je stimulatorni efekat na signalni put p38 u gliomima i ćelijskim linijama leukemije (Yin i sar., 2008). Dalje, pokazano je da KukD povećava nivo fosforilisane forme p38 u ćelijskoj liniji K562 (Liu i sar., 2010), a KukI u ćelijskim linijama leukemije (Ishdorj i sar., 2011). Iako se signalni put p38 generalno smatra aktivirajućim za signalni put NF-κB, postoje eksperimenti koji su pokazali da su ova dva puta međusobno negativno regulisana. Tako je pokazano da je aktivacija signalnog puta NF-κB inhibirana kao posledica p38 signalnog puta pokrenutog Na-salicilatom, sorbitolom, vodonik peroksidom, arsenitom i vitaminom C (Bowie i O'Neill, 2000) (Schwenger i sar., 1998). Pretpostavljeni mehanizam ovakve signalne kaskade je da kinaza p38 inhibira transformišućim faktorom rasta β aktiviranu protein kinazu 1 (TAK1), što posledično ograničava signalni put NF-κB (Cheung i sar., 2003). Na ovaj način se mogu objasniti potencijalni molekularni mehanizmi delovanja ELK i kukurbitacina na CD4⁺ T limfocite koji pokazuju da je inhibicija signalnog puta NF-κB posledica aktivacije signalnog puta p38.

Pored inhibicije signalnog puta NF- κ B, KueE je inhibirao i signalni put STAT3 u CD4⁺ T limfocitima. Naime, STAT3 signalni put je esencijalan za nastanak i diferencijaciju Th17 ćelija (Nurieva i sar., 2007) (Ivanov i sar., 2006). Miševi koji su deficijentni za *Stat3* u CD4⁺ T limfocitima pokazali su rezistentnost ka indukciji EAE (Xuebin i sar., 2008). U studijama koje su se već bavile ispitivanjem uticaja KueE na ove signalne puteve pokazano je da KueE inhibira signalni put STAT3 u ćelijama kancera pankreasa (Sun i sar., 2010), endotelijalnim ćelijama (Dong i sar., 2010), kancerskim ćelijama bešike (Huang i sar., 2012), dojke (Lan i sar., 2013) i mikroglije (Park i sar., 2015).

Povišen relativni nivo (iRNK) *Cyp1a* u CD4⁺ T limfocitima, nakon tretmana sa KueE, ukazuje na još jedan mogući molekularni mehanizam dejstva ovog jedinjenja, a to je posredstvom AhR. CYP1a je među prvim enzimima koji se ekspimiraju nakon aktivacije AhR (Furman i sar., 2009). Regulatorni protein AhR aktiviraju različiti mali molekuli iz hrane, metabolizma, zatim zagađivači i produkti mikroorganizama. Ovaj protein se ekspimiru u ćelijama imunskog sistema i obezbeđuje integrativnu vezu između spoljašnje sredine i imunskog sistema. Posebno je zastupljen u imunskim ćelijama lokalizovanim u crevima (Gutiérrez-Vázquez i Quintana, 2018). AhR je prvo prepoznat kao regulatorni protein koji se aktivira na prisistvo ksenobiotika dioksina kao što je TCDD (2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksin) (Poland i Knutson, 1982). Pored toga AhR aktiviraju i različiti sekundarni metaboliti biljaka. Tako je pokazano da se AhR aktivira od strane glukobrasicina, jedinjenja koja sadrže indol grupu i koja su široko zastupljena u rodu *Brassica* kojem pripadaju karfiol, brokoli i kupus. Nakon konzumiranja ovih biljaka, glukobrasicini se metabolišu od strane enzima MO u indol-3-carbinol (I3C) i indol-3-acetonitril (I3ACN) (Loub i sar., 1975). I3C i I3ACN se dalje neenzimskim reakcijama transformišu u agoniste AhR, 3,3'-diindolilmetan (DIM), 2-(indol-3-metil)-3,3'-diindolilmetan i indolo[3,4-b]carbazol (ICZ) (Bjeldanes i sar., 1991) (Chen i sar., 1996) (Degner i sar., 2009). Rouse i sar. su pokazali da pretretman miševa sa I3C i DIM kompletno sprečava kliničke simptome EAE i infiltraciju imunskih ćelija u CNS. Molekulski mehanizmi u osnovi ovih rezultata su pokazali da AhR suprimiraju Th17 ćelije i indukuju Treg (Rouse i sar., 2013). Pored toga pokazano je da su naringenin i apigenin takođe agonisti AhR (Wang i sar., 2012a), a ova jedinjenja su detektovana i u ELK.

Iako je u ovoj doktorskoj tezi pokazano da je relativan nivo (iRNK) *Cyp11a* povišen nakon tretmana CD4⁺ T limfocita sa KueE, ova promena može biti posledica i nekih drugih uticaja koji su nezavisni od signalnog puta AhR, pa su dalja ispitivanja potrebna da bi se ispitala tvrdnja o direktnom uticaju KueE na ovaj signalni put.

Različite studije su pokazale da su miR-146 i miR-155 usko povezane sa patogeneom MS i EAE (Mccoy, 2017). Tako je pokazano da miR-155 promoviše Th17 imunski odgovor i reaktivaciju encefalitogenih ćelija (O'Connell i sar., 2010) (Jevtić i sar., 2015) u EAE, dok je povišen nivo miR-146 pronađen u mononuklearnim ćelijama periferne krvi obolelih od MS (Fenoglio i sar., 2011). Iako KueE nije uticao na relativan nivo miR-155, nivo miR-146 je bio smanjen u CD4⁺ T limfocitima nakon tretmana sa KueE.

U rezultatima koji su ispitivali uticaj ELK, KueB i KueE na ćelije urođene imunosti, makrofage i DC, takođe je pokazan njihov supresivni kapacitet. Pokazano je da ELK i KueE ostvaruju dejstvo na efektorske funkcije makrofaga, inhibirajući njihovu sposobnost produkcije NO i ROS. NO nastaje kao proizvod enzimske reakcije iNOS u CNS i značajno doprinosi patogenezi MS i EAE (Cross i sar., 1997) (Mitrovic i sar., 1995) (Smith i Lassmann, 2002) mada su poznati i pozitivni efekti NO u CNS kao što je indukcija apoptoze autoreaktivnih T ćelija (Okuda i sar., 1997) (Zetl i sar., 1997). Štetni efekti NO su posebno izraženi nakon interakcije sa O₂⁻ pri čemu nastaje peroksinitrit, koji izaziva peroksidaciju lipida i oštećenje oligodendrocita (Cross i sar., 1997). Oštećenja aksona u MS su povezana sa prisustvom makrofaga i mikroglije koji proizvode reaktivne vrste kiseonika i azota u blizini aksona (Lassmann, 2010). Zbog toga je inhibicija produkcije ROS i NO u makrofagima dodatni anti-encefalitogeni uticaj ELK i KueE. KueB je takođe uspeo da inhibira produkciju NO u makrofagima, ali ne i ROS. Dalje, pokazano je da ELK, KueB i KueE inhibiraju proces fagocitoze u makrofagima. Kako je poznato da je KueE inhibitor depolimerizacije aktina (Sørensen i sar., 2012), pretpostavljeni mehanizam može biti upravo nemogućnost reorganizacije aktinskih filamenata tokom procesa fagocitoze što dovodi do inhibicije samog procesa.

Ispitivanja ekspresije površinskih molekula uključenih u prezentaciju antigena od strane makrofaga i DC pokazala su da ELK u značajnoj meri inhibira ekspresiju molekula MHC II i CD86 na površini makrofaga i ekspresiju CD86 na površini DC.

Sa druge strane, KukB je uspeo da inhibira ekspresiju molekula MHC II na površini makrofaga, dok KukE nije uticao na ekspresiju ovih molekula na površini ćelija. Da bi se detaljnije ispitaio uticaj ELK na prezentaciju antigena od strane APC, urađeni su eksperimenti ko-kultivacije DC pretretiranih sa ELK i CD4⁺ T limfocita u prisustvu antigena (MOG₃₅₋₅₅). Smanjenje produkcije citokina IL-17 u supernatantima ko-kultura u kojima su DC bile pretretirane ELK jasno govori o antiencefalitogenom potencijalu ELK da ograniči Th17 ćelijski odgovor. Pored toga, DC tretirane ELK su pokazale smanjen nivo fagocitoze i ekspresiju molekula CD86 na svojoj površini što dodatno podržava objašnjenje da ELK sprečava prezentaciju antigena od strane DC i na taj način ograničava inicijaciju i propagaciju antigen-specifičnog encefalitogenog imunskog odgovora.

Dalje, ispitivanje uticaja ELK, KukB i KukE na produkciju glavnih proinflamacijskih citokina makrofaga (IL-1 β , IL-6 i TNF) je pokazalo njihov delimično inhibitorni efekat. IL-1 β je proinflamacijski citokin čiji su primarni izvor monociti iz krvi, tkivni makrofagi i DC (Dinarello, 2009). IL-1 β promovise proces inflamacije, indukujući ekspresiju gena i sintezu COX-2, fosfolipaze tipa 2 i iNOS, zatim produkciju prostaglandina-E2 (PGE2), aktivaciju faktora koagulacije i produkciju NO (Dinarello, 2009). Takođe bitna uloga ovog citokina je u sposobnosti da poveća ekspresiju adhezivnih molekula (hemokina, selektina) na površini endotelijalnih ćelija (Wang i sar., 1995). Time se pospešuje infiltracija ćelija imunskog sistema iz cirkulacije u ekstravaskularni prostor i indukuje proces inflamacije na mestu infekcije. U rezultatima ove teze pokazano je da je jedino KukB ostvario inhibitorni uticaj na produkciju ovog citokina od strane LPS stimulisanih makrofaga. Dalje, KukB i KukE su smanjili produkciju citokina IL-6 od strane makrofaga. IL-6 se takođe smatra proinflamacijskim citokinom, ali je ta osobina slabije izražena nego kod IL-1 β i TNF, s obzirom da pokazuje i izvesna antiinflamacijska dejstva (Kishimoto, 2010). Ovaj citokin je esencijalan za diferencijaciju Th17 ćelija (Yamashita i sar., 2011) pa je inhibicija njegove produkcije od strane makrofaga pod uticajem KukB i KukE jasan pokazatelj njihove antiencefalitogene aktivnosti. TNF predstavlja još jedan proinflamacijski citokin koga primarno produkuju makrofagi (Parameswaran i Patial, 2010). Pored makrofaga ovaj citokin produkuju i T limfociti (von Flidner i sar., 1992).

Makrofagi proizvode velike količine TNF u imunskom odgovoru na različite bakterijske infekcije. Ovaj citokin je prvenstveno uključen u procese inflamacije, gde lokalno utiče na ekspresiju i produkciju hemokina i citokina, promovišući adheziju, ekstravazaciju, privlačenje i aktivaciju limfocita na mestu infekcije (Parameswaran i Patial, 2010). U ispitivanjima imunomodulacijskih efekata ELK na makrofage pokazano je da ELK inhibira produkciju ovog citokina, ali da nema uticaja na produkciju IL-1 β i IL-6. Imunosupresivna dejstva KukB su već pokazana u studiji na peritonealnim makrofagima miševa gde je utvrđeno da KukB inhibira produkciju citokina IL-1 β i IL-6, kao i ekspresiju površinskog molekula MHC II, dok ekspresija CD86 ostaje nepromenjena (Kim i sar., 2015b), što je potvrđeno i u ovoj doktorskoj disertaciji. U istoj studiji je pokazano da KukB uspešno inhibira produkciju NO i ROS. Isto tako, pokazano je da Kue smanjuje produkciju NO u ćelijskoj liniji makrofaga RAW 264.7 (Abdelwahab i sar., 2011b). Za flavonoid naringenin, koji je sastavni deo ispitivanog ELK, pokazano je da efikasno inhibira iNOS u RAW 274.6 makrofagima i BV2 ćelijama mikroglije (Chao i sar., 2010). Sveukupno rezultati dobijeni u *in vitro* ispitivanjima na makrofagima jasno govore o supresivnom efektu koje ELK, KukB i Kue ostvaruju na efektorske funkcije makrofaga. Pored toga, ELK doprinosi i smanjenoj aktivnosti DĆ i redukciji Th17 ćelijskog odgovora pokrenutog od strane DĆ.

Analize toksičnosti ELK, KukB i Kue na modelu zebrice pokazale su odsustvo toksičnog efekta na razvoj embriona zebrice u koncentracijama koje su ostvarile imunoregulatorno dejstvo *in vitro*. Blagi poremećaji razvoja embriona zebrice uočeni su jedino u koncentracijama koje su bile 10 puta veće od primenjenih u EAE eksperimentima. Ovakav pristup ispitivanju toksičnosti nekog jedinjenja je vrlo koristan, jer na brz, efikasan i pouzdan način daje uvid u toksičnost nekog jedinjenja i omogućava procenu toksičnosti jedinjenja ukoliko se razmišlja npr. o *in vivo* primeni istog. Samim tim, ovi rezultati ukazuju da bi primena ELK i kukurbitacina bila bezbedna u *in vivo* modelu EAE.

Na kraju, primena ELK u emulziji za imunizaciju *in vivo* inhibirala je kliničke znake EAE kod DA pacova u početnoj fazi bolesti, međutim efekti su izostali u kasnijim fazama.

Razumljivo je pretpostaviti da bi prolongirana aplikacija ELK ili neki drugi vid administracije npr. peroralna ili intraperitonealna, mogla da ostvari povoljne efekte u razvoju EAE.

Imajući u vidu sveukupni doprinos Th1, Th17 ćelija, makrofaga i DC patogenezi EAE i MS sa razlogom se može reći da su ELK, KukB i KukE ostvarili povoljne efekte na autoimunost CNS. Ovi rezultati ukazuju i na to da su kukurbitacini kao glavni konstituenti ELK odgovorni i za anti-encefalitogene osobine ELK. Ipak, da bi se ostvareni efekti ELK sa sigurnošću pripisali kukurbitacinima, neophodno je utvrditi i biološke efekte drugih kukurbitacina prisutnih u ELK, sa posebnim osvrtom na KukC kao najzastupljenije jedinjenje u ELK. Konačno, ovi rezultati jasno ukazuju da ELK ima potentno anti-encefalitogeno dejstvo koje je vredno daljeg ispitivanja.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata može se izvesti nekoliko zaključaka iz ove doktorske disertacije:

1. Pripremljeni ekstrakti korena, lista i stabla krastavca su ostvarili imomodulacijske efekte *in vitro* na ćelije drenirajućih limfnih čvorova i CD4⁺ limfocite s tim što je ekstrakt lista krastavca (ELK) ostvario najizraženije antiencefalitogeno dejstvo.
2. ELK je inhibirao Th1 i Th17 autoimunski odgovor *in vitro* i *in vivo* kao i efektorske funkcije makrofaga i antigen-prezentujuću aktivnost dendritskih ćelija
3. Primena ELK *in vivo* je ublažila klinički tok EAE u početnim fazama bolesti.
4. Fitohemijska analiza ELK metodom masene spektrometrije utvrdila je prisustvo 37 različitih jedinjenja u ekstraktu, među kojima su klasa jedinjenja tetracikličnih terpena kukurbitacina daleko najzastupljenija, a posebno jedinjenja Kukurbitacin C 2-O heksozid i Kukurbitacin C.
5. Jedinjenja KukB i Kuke su ostvarila slične efekte kao i ELK na CD4⁺ limfocite i makrofage, inhibirajući encefalitogeni potencijal ovih ćelija *in vitro*.
6. Analiza toksičnosti ELK, KukB i Kuke na modelu zebrice pokazala je da koncentracije koje ostvaruju biološku aktivnost *in vitro* ne utiču na toksičnost u ovom model sistemu.

Na osnovu svih rezultata može se izneti opšti zaključak o imunomodulacijskom potencijalu različitih ekstrakata krastavca, posebno ekstrakta lista krastavca, čije antiencefalitogeno dejstvo je pokazano na T limfocitima, makrofagima i dendritskim ćelijama u modelu EAE, s posebnim osvrtom na kukurbitacine, najzastupljenije konstituente ekstrakta, čiji imunosupresivni kapacitet je takođe potvrđen u ovoj studiji.

7. Literatura

Abdelwahab, S.I., Hassan, L.E.A., Sirat, H.M., Yagi, S.M.A., Koko, W.S., Mohan, S., Taha, M.M.E., Ahmad, S., Chuen, C.S., Narrima, P., et al. (2011a). Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 82, 1190–1197.

Abdelwahab, S.I., Hassan, L.E.A., Sirat, H.M., Yagi, S.M.A., Koko, W.S., Mohan, S., Taha, M.M.E., Ahmad, S., Chuen, C.S., Narrima, P., et al. (2011b). Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 82, 1190–1197.

Abrahamsson, S. V, Angelini, D.F., Dubinsky, A.N., Morel, E., Oh, U., Jones, J.L., Carassiti, D., Reynolds, R., Salvetti, M., Calabresi, P.A., et al. (2013). Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* 136, 2888–2903.

Abromson-Leeman, S., Bronson, R.T., and Dorf, M.E. (2009). Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN γ but have a spectrum of IL-17 profiles. *J. Neuroimmunol.* 215, 10–24.

Abu-Reidah, I.M., Arráez-Román, D., Quirantes-Piné, R., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2012). HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Res. Int.* 46, 108–117.

Aeri, V., Kaushik, U., and Mir, S. (2015). Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacogn. Rev.* 9, 12.

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

Arellano, G., Ottum, P.A., Reyes, L.I., Burgos, P.I., and Naves, R. (2015). Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 6.

Attard, E., and Martinoli, M.G. (2015). Cucurbitacin E , An Experimental Lead Triterpenoid with Anticancer , Immunomodulatory and Novel Effects Against Degenerative Diseases . A Mini - Review. *Curr. Top. Med. Chem.* *15*, 1708–1713.

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

Banjanac, T., Dragičević, M., Šiler, B., Gašić, U., Bohanec, B., Nestorović Živković, J., Trifunović, S., and Mišić, D. (2017). Chemodiversity of two closely related tetraploid *Centaurium* species and their hexaploid hybrid: Metabolomic search for high-resolution taxonomic classifiers. *Phytochemistry* *140*, 27–44.

Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E.F., Flügel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., et al. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* *462*, 94–98.

Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* *110*, 493–497.

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

Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J.P.A., and Tzoulaki, I. (2015). Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet. Neurol.* *14*, 263–273.

Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *11*, 195–199.

- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z. Al, Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541.
- Bernard, S.A., and Olayinka, O.A. (2010). Search for a novel antioxidant, anti-inflammatory/analgesic or anti-proliferative drug: Cucurbitacins hold the ace. *J. Med. Plants Res. December Spec. Rev.* 4, 2821–2826.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 200, 79–87.
- Bielekova, B. (2018). Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* a034470.
- Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., and Carton, H. (1988). Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *J. Immunol.* 140, 1506–1510.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., and Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9543–9547.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., and Sebt, S.M. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* 63, 1270–1279.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6, 338–344.
- Bogie, J.F.J., Stinissen, P., and Hendriks, J.J.A. (2014). Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 128, 191–213.

- Boven, L.A., Van Meurs, M., Van Zwam, M., Wierenga-Wolf, A., Hintzen, R.Q., Boot, R.G., Aerts, J.M., Amor, S., Nieuwenhuis, E.E., and Laman, J.D. (2006). Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* *129*, 517–526.
- Bowie, A.G., and O'Neill, L.A. (2000). Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* *165*, 7180–7188.
- Brodin, P., Jojic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C.J.L., Furman, D., Shen-Orr, S., Dekker, C.L., Swan, G.E., Butte, A.J., et al. (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* *160*, 37–47.
- Brown, D.A., and Sawchenko, P.E. (2007). Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Comp. Neurol.* *502*, 236–260.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., and Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* *132*, 3329–3341.
- Bulloch, K., Miller, M.M., Gal-Toth, J., Milner, T.A., Gottfried-Blackmore, A., Waters, E.M., Kaunzner, U.W., Liu, K., Lindquist, R., Nussenzweig, M.C., et al. (2008). CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *508*, 687–710.
- Chao, C.-L., Weng, C.-S., Chang, N.-C., Lin, J.-S., Kao, S.-T., and Ho, F.-M. (2010). Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutr. Res.* *30*, 858–864.
- Chen, I., Safe, S., and Bjeldanes, L. (1996). Indole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists in T47D human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *51*, 1069–1076.

- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., and Qiu, S.X. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* *22*, 386–399.
- Cheung, P.C.F., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., and Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38. *EMBO J.* *22*, 5793–5805.
- Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.-W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., et al. (2011). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 751–756.
- Citterio, A., La Mantia, L., Ciucci, G., Candelise, L., Brusaferrri, F., Midgard, R., and Filippini, G. (2000). Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001331.
- Cohen, J.A., Coles, A.J., Arnold, D.L., Confavreux, C., Fox, E.J., Hartung, H.-P., Havrdova, E., Selmaj, K.W., Weiner, H.L., Fisher, E., et al. (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)* *380*, 1819–1828.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* *372*, 1502–1517.
- Cross, A.H., Manning, P.T., Stern, M.K., and Misko, T.P. (1997). Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. *J. Neuroimmunol.* *80*, 121–130.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 46–56.

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.E., De Courten, M., Matsoukas, J., and Apostolopoulos, V. (2017). Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. *Brain Sci.* *7*, 1–27.

Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Selmin, O., and Romagnolo, D.F. (2009). Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J. Nutr.* *139*, 26–32.

Dendrou, C.A., Plagnol, V., Fung, E., Yang, J.H.M., Downes, K., Cooper, J.D., Nutland, S., Coleman, G., Himsworth, M., Hardy, M., et al. (2009). Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat. Genet.* *41*, 1011–1015.

Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 545–558.

De Matos Nunesa J., Bertodo L.O.O., Da Rosab M.G., Von Posera L., Recha S.B. (2014). Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South African Journal of Botany.* *94*, 182-189.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 519–550.

Disanto, G., Morahan, J.M., Barnett, M.H., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S. V. (2012). The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* *78*, 823–832.

Dixit, Y., and Kar, A. (2010). Protective role of three vegetable peels in alloxan induced diabetes mellitus in male mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* *65*, 284–289.

Domingues, H.S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2010). Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* *5*, e15531.

Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C.M., and Hafler, D.A. (2011). Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.* *17*, 673–675.

- Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 337–348.
- Dong, Y., Lu, B., Zhang, X., Zhang, J., Lai, L., Li, D., Wu, Y., Song, Y., Luo, J., Pang, X., et al. (2010). Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis* *31*, 2097–2104.
- Engelhardt, B., Carare, R.O., Bechmann, I., Flügel, A., Laman, J.D., and Weller, R.O. (2016). Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* *132*, 317–338.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* *132*, 9–14.
- Fenoglio, C., Cantoni, C., De Riz, M., Ridolfi, E., Cortini, F., Serpente, M., Villa, C., Comi, C., Monaco, F., Mellesi, L., et al. (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* *504*, 9–12.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996a). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* *156*, 5–7.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996b). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* *156*, 5–7.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentão, P., and Tomás-Barberán, F.A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* *1161*, 214–223.

Ferrerres, F., Andrade, P.B., Valentão, P., and Gil-Izquierdo, A. (2008). Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* *1182*, 56–64.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.

von Fliedner, V., Miescher, S., Gérain, J., Gallati, H., Barras, C., Heumann, D., and Cerottini, J.C. (1992). Production of tumor necrosis factor-alpha by naive or memory T lymphocytes activated via CD28. *Cell. Immunol.* *139*, 198–207.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.

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

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

Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Marti, A., Caggiula, M., Mirabella, M., Tonali, P.A., and Batocchi, A.P. (2008). IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* *44*, 22–25.

Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Caggiula, M., Marti, A., Sancricca, C., Angelucci, F., Mirabella, M., Tonali, P.A., et al. (2009). Regulatory T cells fail to suppress CD4⁺T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology* *127*, 418–428.

Furman, D.P., Oshchepkova, E.A., Oshchepkov, D.Y., Shamanina, M.Y., and Mordvinov, V.A. (2009). Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor. *Comput. Biol. Chem.* 33, 465–468.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967–971.

Ginwala, R., McTish, E., Raman, C., Singh, N., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., Sagar, D., Jain, P., and Khan, Z.K. (2016). Apigenin, a Natural Flavonoid, Attenuates EAE Severity Through the Modulation of Dendritic Cell and Other Immune Cell Functions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 11, 36–47.

Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971.

Gookin, J.L., Allen, J., Chiang, S., Duckett, L., and Armstrong, M.U. (2005). Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 73, 3929–3936.

Gregersen, J.W., Kranc, K.R., Ke, X., Svendsen, P., Madsen, L.S., Thomsen, A.R., Cardon, L.R., Bell, J.I., and Fugger, L. (2006). Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 443, 574–577.

Gregory, S.G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J.R., Hart, J., Prokop, A., Caillier, S.J., Ban, M., Goris, A., Barcellos, L.F., et al. (2007). Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 39, 1083–1091.

Greve, B., Weissert, R., Hamdi, N., Bettelli, E., Sobel, R.A., Coyle, A., Kuchroo, V.K., Rajewsky, K., and Schmidt-Supprian, M. (2007). I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179, 179–185.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Gry, J., and Andersson, H.C. (2006). Cucurbitacins in plant food.

Guo, A., He, D., Xu, H.-B., Geng, C.-A., and Zhao, J. (2015). Promotion of regulatory T cell induction by immunomodulatory herbal medicine licorice and its two constituents. *Sci. Rep.* 5, 14046.

Gutiérrez-Vázquez, C., and Quintana, F.J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33.

Haak, S., Croxford, A.L., Kreymborg, K., Heppner, F.L., Pouly, S., Becher, B., and Waisman, A. (2008). IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 61–69.

Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., et al. (2005). Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 35, 3343–3352.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237–246.

Hafler, D.A., Slavik, J.M., Anderson, D.E., O'Connor, K.C., De Jager, P., and Baecher-Allan, C. (2005). Multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 204, 208–231.

Harinantenaina, L., Tanaka, M., Takaoka, S., Oda, M., Mogami, O., Uchida, M., and Asakawa, Y. (2006). Momordica charantia constituents and antidiabetic screening of the isolated major compounds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 54, 1017–1021.

- Harkioliaki, M., Holmes, S.L., Svendsen, P., Gregersen, J.W., Jensen, L.T., McMahon, R., Friese, M.A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J.S., et al. (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348–357.
- Hartmann, F.J., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., Gran, B., Piehl, F., Olsson, T., Codarri, L., et al. (2014). Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat. Commun.* 5, 5056.
- Hartung, H.-P., Gonsette, R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., and Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS) (2002). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet (London, England)* 360, 2018–2025.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., and Weiner, H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 19, 578–587.
- Havrdova, E., Zivadinov, R., Krasensky, J., Dwyer, M., Novakova, I., Dolezal, O., Ticha, V., Dusek, L., Houzvickova, E., Cox, J., et al. (2009). Randomized study of interferon beta-1a, low-dose azathioprine, and low-dose corticosteroids in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 15, 965–976.
- Havrdová, E., Belova, A., Goloborodko, A., Tisserant, A., Wright, A., Wallstroem, E., Garren, H., Maguire, R.P., and Johns, D.R. (2016). Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J. Neurol.* 263, 1287–1295.
- Hedström, A.K., Åkerstedt, T., Hillert, J., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2011). Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 70, 733–741.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.

Hilliard, B.A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S.-E., Liou, H.-C., Hunter, C., and Chen, Y.H. (2002). Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* *110*, 843–850.

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* *12*, 255–263.

Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* *237*, 123–130.

Hoy, S.M. (2015). Peginterferon Beta-1a: A Review of Its Use in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* *29*, 171–179.

Hu, R., Huffaker, T.B., Kagele, D.A., Runtsch, M.C., Bake, E., Chaudhuri, A.A., Round, J.L., and O’Connell, R.M. (2013). MicroRNA-155 Confers Encephalogenic Potential to Th17 Cells by Promoting Effector Gene Expression. *J. Immunol.* *190*, 5972–5980.

Hu, Y., Ota, N., Peng, I., Refino, C.J., Danilenko, D.M., Caplazi, P., and Ouyang, W. (2010). IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *184*, 4307–4316.

Huang, D. (2015). Challenges in randomized controlled trials and emerging multiple sclerosis therapeutics. *Neurosci. Bull.* *31*, 745–754.

Huang, W.-W., Yang, J.-S., Lin, M.-W., Chen, P.-Y., Chiou, S.-M., Chueh, F.-S., Lan, Y.-H., Pai, S.-J., Tsuzuki, M., Ho, W.-J., et al. (2012). Cucurbitacin E Induces G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* *2012*, 952762.

- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A., et al. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* *24*, 1023–1034.
- Huseby, E.S., Huseby, P.G., Shah, S., Smith, R., and Stadinski, B.D. (2012). Pathogenic CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Experimental Models. *Front. Immunol.* *3*, 64.
- Ifergan, I., Kebir, H., Bernard, M., Wosik, K., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Arbour, N., and Prat, A. (2008). The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* *131*, 785–799.
- Inglese, M., and Petracca, M. (2015). Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophr. Res.* *161*, 94–101.
- Ishdorj, G., Johnston, J.B., and Gibson, S.B. (2011). Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B leukemic cells. *BMC Cancer* *11*, 268.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* *5*, 514.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* *183*, 7169–7177.
- Jayaprakasam, B., Seeram, N.P., and Nair, M.G. (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett.* *189*, 11–16.
- Jevtić, B., Timotijević, G., Stanisavljević, S., Momčilović, M., Mostarica Stojković, M., and Miljković, D. (2015). Micro RNA-155 participates in re-activation of encephalitogenic T cells. *Biomed. Pharmacother.* *74*, 206–210.

- Ji, Q., Perchellet, A., and Goverman, J.M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nat. Immunol.* *11*, 628–634.
- Ji, Q., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 254–261.
- Jia, Q., Cheng, W., Yue, Y., Hu, Y., Zhang, J., Pan, X., Xu, Z., and Zhang, P. (2015). Cucurbitacin E inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine production in human synoviocyte MH7A cells via suppression of PI3K/Akt/NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* *29*, 884–890.
- Johnson, M.C., Pierson, E.R., Spieker, A.J., Nielsen, A.S., Posso, S., Kita, M., Buckner, J.H., and Goverman, J.M. (2016). Distinct T cell signatures define subsets of patients with multiple sclerosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* *3*, e278.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* *482*, 395–399.
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., and Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* *37*, 803–811.
- Kapadia, M., and Sakic, B. (2011). Autoimmune and inflammatory mechanisms of CNS damage. *Prog. Neurobiol.* *95*, 301–333.
- Kappos, L., Freedman, M.S., Polman, C.H., Edan, G., Hartung, H.-P., Miller, D.H., Montalbán, X., Barkhof, F., Radü, E.-W., Bauer, L., et al. (2007). Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet (London, England)* *370*, 389–397.

Kearney, H., Altmann, D.R., Samson, R.S., Yiannakas, M.C., Wheeler-Kingshott, C.A.M., Ciccarelli, O., and Miller, D.H. (2015). Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. *Neurology* 84, 367–373.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007a). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007b). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175.

Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 390–402.

Kim, M., Park, S.Y., Jin, M.L., Park, G., and Son, H.-J. (2015a). Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37, 473–480.

Kim, M., Park, S.Y., Jin, M.L., Park, G., and Son, H.-J. (2015b). Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37, 473–480.

Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 22, 347–352.

Kivisäkk, P., Imitola, J., Rasmussen, S., Elyaman, W., Zhu, B., Ransohoff, R.M., and Khoury, S.J. (2009). Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 65, 457–469.

- Knochelmann, H.M., Dwyer, C.J., Bailey, S.R., Amaya, S.M., Elston, D.M., Mazzamccrann, J.M., and Paulos, C.M. (2018). When worlds collide : Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity Naïve. *Cell. Mol. Immunol.* 1–12.
- Koch, M.W., Mostert, J.P., de Vries, J.J., De Keyser, J., Kappos, L., Polman, C. H., Freedman, M. S., Edan, G., Hartung, H.-P., Miller, D. H., et al. (2007). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 68, 1163–1164.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 169, 4712–4716.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Bäckström, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., et al. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13, 423–431.
- Krakovski, M., and Owens, T. (1996). Interferon- γ confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 26, 1641–1646.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12, 231–238.
- Krishnamoorthy, G., Holz, A., and Wekerle, H. (2007). Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. *J. Mol. Med.* 85, 1161–1173.
- Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A. V, and Segal, B.M. (2008). IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.* 205, 1535–1541.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.

- Kurschus, F.C., Croxford, A.L., Heinen, A.P., Wörtge, S., Ielo, D., and Waisman, A. (2010). Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3336–3346.
- Kutzelnigg, A., and Lassmann, H. (2014). *Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases* (Elsevier B.V.).
- Kwilasz, A.J., Grace, P.M., Serbedzija, P., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2015). The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology* *96*, 55–69.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., and Tonegawa, S. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* *78*, 399–408.
- Lan, T., Wang, L., Xu, Q., Liu, W., Jin, H., Mao, W., Wang, X., and Wang, X. (2013). Growth inhibitory effect of Cucurbitacin E on breast cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 1799–1805.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005a). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233–240.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005b). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233–240.
- Lassmann, H. (2010). Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Exp. Neurol.* *225*, 2–8.
- Lee, W., and Lee, G.R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.* *50*, e456.
- Lee, E., Chanamara, S., Pleasure, D., and Soulika, A.M. (2012). IFN-gamma signaling in the central nervous system controls the course of experimental autoimmune encephalomyelitis independently of the localization and composition of inflammatory foci. *J. Neuroinflammation* *9*, 510.

- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., and Weinshenker, B.G. (2004). A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* *364*, 2106–2112.
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., and Hinson, S.R. (2005). IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* *202*, 473–477.
- Li, X., and Zheng, Y. (2015). Regulatory T cell identity: Formation and maintenance. *Trends Immunol.* *36*, 344–353.
- Link, H., Sun, J.B., Wang, Z., Xu, Z., Löve, A., Fredrikson, S., and Olsson, T. (1992). Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *38*, 63–73.
- Liu, K., Xing, H., Zhang, S., Liu, S. ming, and Fung, M. chiu (2010). Cucurbitacin D induces fetal hemoglobin synthesis in K562 cells and human hematopoietic progenitors through activation of p38 pathway and stabilization of the γ -globin mRNA. *Blood Cells, Mol. Dis.* *45*, 269–275.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., and Issazadeh-Navikas, S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat. Med.* *12*, 518–525.
- Loub, W.D., Wattenberg, L.W., and Davis, D.W. (1975). Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of cruciferous plants. *J. Natl. Cancer Inst.* *54*, 985–988.
- Lundström, W., Highfill, S., Walsh, S.T.R., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., Alfredsson, L., Olsson, T., Hillert, J., and Mackall, C.L. (2013). Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1761-70.
- Manach, C. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* *Am. J. Clin. Nutr.* *79*, 727–747.

- Mars, L.T., Saikali, P., Liblau, R.S., and Arbour, N. (2011). Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 151–161.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* *6*, 13.
- Martins, T.B., Rose, J.W., Jaskowski, T.D., Wilson, A.R., Husebye, D., Seraj, H.S., and Hill, H.R. (2011). Analysis of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Serum Concentrations in Patients With Multiple Sclerosis by Using a Multiplexed Immunoassay. *Am. J. Clin. Pathol.* *136*, 696–704.
- Mccoy, C.E. (2017). Regulation of Inflammatory Signaling in Health and Disease. *1024*, 111–131.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* *8*, 1390–1397.
- McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H., and Miller, S.D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat. Med.* *11*, 335–339.
- Michell-Robinson, M.A., Touil, H., Healy, L.M., Owen, D.R., Durafourt, B.A., Bar-Or, A., Antel, J.P., and Moore, C.S. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* *138*, 1138–1159.
- Miller, D.H., Weinshenker, B.G., Filippi, M., Banwell, B.L., Cohen, J.A., Freedman, M.S., Galetta, S.L., Hutchinson, M., Johnson, R.T., Kappos, L., et al. (2008). Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult. Scler.* *14*, 1157–1174.
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., and Kim, B.S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* *3*, 1133–1136.

- Miron, V.E., Boyd, A., Zhao, J.-W., Yuen, T.J., Ruckh, J.M., Shadrach, J.L., van Wijngaarden, P., Wagers, A.J., Williams, A., Franklin, R.J.M., et al. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* *16*, 1211–1218.
- Mishra, M.K., and Yong, V.W. (2016). Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* *12*, 539–551.
- Mišić, D., Siler, B., Gašić, U., Avramov, S., Zivković, S., Nestorović Živković, J., Milutinović, M., and Tešić, Z. (2015). Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: a possible application in chemotaxonomic studies. *Phytochem. Anal.* *26*, 72–85.
- Mitrovic, B., Ignarro, L.J., Vinters, H. V, Akers, M.A., Schmid, I., Uittenbogaart, C., and Merrill, J.E. (1995). Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* *65*, 531–539.
- Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.P., and Zettl, U.K. (2010). Animal models of multiple sclerosis-Potentials and limitations. *Prog. Neurobiol.* *92*, 386–404.
- Miyake, M., Sasaki, K., Ide, K., Matsukura, Y., Shijima, K., and Fujiwara, D. (2006). Highly oligomeric procyanidins ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis via suppression of Th1 immunity. *J. Immunol.* *176*, 5797–5804.
- Morrow, S.A., Metz, L.M., and Kremenchutzky, M. (2009). High dose oral steroids commonly used to treat relapses in Canadian MS clinics. *Can. J. Neurol. Sci.* *36*, 213–215.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Mukherjee, P.K., Nema, N.K., Maity, N., and Sarkar, B.K. (2013). Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia* *84*, 227–236.
- Münz, C., Lünemann, J.D., Getts, M.T., and Miller, S.D. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 246–258.

- Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.
- Nathalie, C., Wai Ping, L., Maxime, D.L., Barbara, W., Judith, D., Griet, N., Patrick, C., Cristina, R.T., Eva, M.-C., and Zwi, B. (2016). Towards the clinical use of tolerogenic dendritic cells in multiple sclerosis by applying the immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Front. Aging Neurosci.* 8.
- Nema, N.K., Maity, N., Sarkar, B., and Mukherjee, P.K. (2011). Cucumis sativus fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 247–252.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483.
- O’Connell, R.M., Kahn, D., Gibson, W.S.J., Round, J.L., Scholz, R.L., Chaudhuri, A.A., Kahn, M.E., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2010). MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33, 607–619.
- Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., and Yanagihara, T. (1997). Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 73, 107–116.
- Olivares-Villagómez, D., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 188, 1883–1894.
- Olson, J.K., Ercolini, A.M., and Miller, S.D. (2005). A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 296, 39–53.
- Palmer, A.M. (2010). Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11, 1313–1323.

- Panaro, M.A., Brandonisio, O., Acquafredda, A., Sisto, M., and Mitolo, V. (2003). Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 3, 210–221.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., and Johnson, K.P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097–1102.
- Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 87–103.
- Park, C.S., Lim, H., Han, K.J., Baek, S.H., Sohn, H.O., Lee, D.W., Kim, Y.-G., Yun, H.-Y., Baek, K.J., and Kwon, N.S. (2004). Inhibition of nitric oxide generation by 23,24-dihydrocucurbitacin D in mouse peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 705–710.
- Park, S.Y., Kim, Y.H., and Park, G. (2015). Cucurbitacins attenuate microglial activation and protect from neuroinflammatory injury through Nrf2/ARE activation and STAT/NF- κ B inhibition. *Neurosci. Lett.* 609, 129–136.
- Paszkiwicz, M., Budzyńska, A., Różalska, B., and Sadowska, B. (2012). [The immunomodulatory role of plant polyphenols]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 66, 637–646.
- Pereira, O.R., Peres, A.M., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., and Cardoso, S.M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *FRIN* 54, 1773–1780.
- Peters, A., Lee, Y., and Kuchroo, V.K. (2011). The many faces of Th17 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 702–706.
- Pikoulas, T.E., and Fuller, M.A. (2012). Dalfampridine: A Medication to Improve Walking in Patients with Multiple Sclerosis. *Ann. Pharmacother.* 46, 1010–1015.

- Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517–554.
- Prodinger, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J.D., Greter, M., Immig, K., Heppner, F., Becher, B., et al. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol.* 121, 445–458.
- Qiao, J., Xu, L., He, J., Ouyang, D., and He, X. (2013). Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Inflamm. Res.* 62, 461–469.
- Quan, N., Whiteside, M., and Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83, 281–293.
- Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581.
- Rice, C.A., Rymal, K.S., Chambliss, O.L., and Johnson, F.A. (1981). Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three *Cucumis sativus* cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 29, 194–196.
- Rice, G.P.A., Hartung, H.-P., and Calabresi, P.A. (2005). Anti-4 integrin therapy for multiple sclerosis: Mechanisms and rationale. *Neurology* 64, 1336–1342.
- Rivers, T.M., and Schwentker, F.F. (1935). Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J. Exp. Med.* 61, 689–702.
- Rodriguez, M. (2007). Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 17, 219–229.
- Rouse, M., Singh, N.P., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (2013). Indoles mitigate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of reciprocal differentiation of regulatory T cells and Th17 cells. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1305–1321.

- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I. (2005). Natural products isolation. (Humana Press).
- Sasaki, K., Bean, A., Shah, S., Schutten, E., Huseby, P.G., Peters, B., Shen, Z.T., Vanguri, V., Liggitt, D., and Huseby, E.S. (2014). Relapsing-remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* *192*, 3029–3042.
- Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nel, H.J., Loh, K.L., Wijeyewickrema, L.C., Eckle, S.B.G., van Heemst, J., Pike, R.N., et al. (2013). A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* *210*, 2569–2582.
- Schwenger, P., Alpert, D., Skolnik, E.Y., and Vilcek, J. (1998). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B α phosphorylation and degradation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 78–84.
- Scolding, N.J., Pasquini, M., Reingold, S.C., and Cohen, J.A. (2017). Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Brain* *140*, 2776–2796.
- Sethna, M.P., and Lampson, L.A. (1991). Immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-gamma. *J. Neuroimmunol.* *34*, 121–132.
- Shizhong, C., 付庆荣, 张藏曼, 王弘, 陈世忠, Cao, G., Fu, Q., Zhang, C., Wang, H., and Chen, S. (2016). Rapid characterization of 96 chemical constituents in *Citri Reticulatae Folium* (leaves of “Fuju”) using HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Chinese Pharm. Sci.* *25*, 91–110.
- Sie, C., and Korn, T. (2017). Dendritic cells in central nervous system autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* *39*, 99–111.

- Simmons, R.D., and Willenborg, D.O. (1990). Direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. *J. Neurol. Sci.* *100*, 37–42.
- Simmons, S.B., Pierson, E.R., Lee, S.Y., and Goverman, J.M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol.* *34*, 410–422.
- Smith, K.J., and Lassmann, H. (2002). The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* *1*, 232–241.
- Sonar, S.A., and Lal, G. (2017). Differentiation and transmigration of CD4 T cells in neuroinflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* *8*, 1–9.
- Sörensen, P.M., Jacob, R.E., Fritzsche, M., Engen, J.R., Briehar, W.M., Charras, G., and Eggert, U.S. (2012). The Natural Product Cucurbitacin E Inhibits Depolymerization of Actin Filaments. *ACS Chem. Biol.* *7*, 1502–1508.
- Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 683–747.
- Sotiroudis, g., Melliou, E., Sotiroudis, T.G., and Chinou, I. (2010). Chemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of three greek cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars. *J. Food Biochem.* *34*, 61–78.
- Stadelmann, C., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Brück, W., Hohlfeld, R., and Lassmann, H. (2002). BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* *125*, 75–85.
- Stadhouders, R., Lubberts, E., and Hendriks, R.W. (2018). A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J. Autoimmun.* *87*, 1–15.
- Statz, D., and Coon, F.B. (1976). Preparation of plant extracts for antitumor screening. *Cancer Treat. Rep.* *60*, 999–1005.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* *13*, 139–145.

Stockinger, B., and Omenetti, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 535–544.

Stojanovic, I., Dimitrijevic, M., Vives-Pi, M., Mansilla, M.J., Pujol-Autonell, I., Rodríguez-Fernandez, S., Palova-Jelínková, L., Funda, D.P., Gruden-Movsesijan, A., Sofronic-Milosavljevic, L., et al. (2017). Cell-based Tolerogenic Therapy, Experience from Animal Models of Multiple Sclerosis, Type 1 Diabetes and Rheumatoid Arthritis. *Curr. Pharm. Des.* *23*, 2623–2643.

Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., and Goverman, J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* *14*, 337–342.

Sudheesh, S., and Vijayalakshmi, N.. (1999). Lipid-lowering action of pectin from *Cucumis sativus*. *Food Chem.* *67*, 281–286.

Sun, C., Zhang, M., Shan, X., Zhou, X., Yang, J., Wang, Y., Li-Ling, J., and Deng, Y. (2010). Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *136*, 603–610.

Sun, S.C., Chang, J.H., and Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* *34*, 282–289.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655–669.

Tan, M.-J., Ye, J.-M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C.-Q., Tang, C.-P., Chen, T., Weiss, H.-C., Gesing, E.-R., Rowland, A., et al. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem. Biol.* *15*, 263–273.

Taşan, M., Musso, G., Hao, T., Vidal, M., MacRae, C.A., and Roth, F.P. (2015). Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally coherent subnetworks. *Nat. Methods* *12*, 154–159.

Teteloshvili, N., Smigielska-Czepiel, K., Kroesen, B.-J., Brouwer, E., Kluiver, J., Boots, A.M.H., and van den Berg, A. (2015). T-cell Activation Induces Dynamic Changes in miRNA Expression Patterns in CD4 and CD8 T-cell Subsets. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)* 4, 117–122.

Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.-C., Yeh, N., Nguyen, E.T., Sehra, S., and Kaplan, M.H. (2008). Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29, 679–690.

Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172, 146–155.

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., and Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.* 16, 543–551.

Verbeek, R., Plomp, A.C., van Tol, E.A., and van Noort, J.M. (2004). The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem. Pharmacol.* 68, 621–629.

Verbeek, R., Van Tol, E.A.F., and Van Noort, J.M. (2005). Oral flavonoids delay recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *Biochem. Pharmacol.* 70, 220–228.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199, 971–979.

Virgin, H.W. (2014). The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 157, 142–150.

Vitkovic, L., Konsman, J.P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., and Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Mol. Psychiatry* 5, 604–615.

- Wang, H.-K., Yeh, C.-H., Iwamoto, T., Satsu, H., Shimizu, M., and Totsuka, M. (2012a). Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.* *60*, 2171–2178.
- Wang, J., Ren, Z., Xu, Y., Xiao, S., Meydani, S.N., and Wu, D. (2012b). Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4⁺ T-cell subsets. *Am. J. Pathol.* *180*, 221–234.
- Wang, L., Li, C., Lin, Q., Zhang, X., Pan, H., Xu, L., Shi, Z., Ouyang, D., and He, X. (2015a). Cucurbitacin E suppresses cytokine expression in human Jurkat T cells through down-regulating the NF- κ B signaling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *47*, 459–465.
- Wang, L., Li, C., Lin, Q., Zhang, X., Pan, H., Xu, L., Shi, Z., Ouyang, D., and He, X. (2015b). Cucurbitacin E suppresses cytokine expression in human Jurkat T cells through down-regulating the NF- κ B signaling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *47*, 459–465.
- Wang, X., Feuerstein, G.Z., Gu, J.L., Lysko, P.G., and Yue, T.L. (1995). Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *115*, 89–98.
- Weber, M.S., Prod'homme, T., Patarroyo, J.C., Molnarfi, N., Karnezis, T., Lehmann-Horn, K., Danilenko, D.M., Eastham-Anderson, J., Slavin, A.J., Linington, C., et al. (2010). B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann. Neurol.* *68*, 369–383.
- Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* *50*, 57–60.
- Wekerle, H., Berer, K., and Krishnamoorthy, G. (2013). Remote control-triggering of brain autoimmune disease in the gut. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 683–689.
- Wensky, A.K., Furtado, G.C., Marcondes, M.C.G., Chen, S., Manfra, D., Lira, S.A., Zagzag, D., and Lafaille, J.J. (2005). IFN-gamma determines distinct clinical outcomes in autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *174*, 1416–1423.

Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition.

Woodroffe, M.N., Bellamy, A.S., Feldmann, M., Davison, A.N., and Cuzner, M.L. (1986). Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J. Neurol. Sci.* *74*, 135–152.

Xu, L., Zhang, L., Bertucci, A.M., Pope, R.M., and Datta, S.K. (2008). Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF- κ B activation pathway. *Immunol. Lett.* *121*, 74–83.

Xu, Q., Choksi, S., Qu, J., Jang, J., Choe, M., Banfi, B., Engelhardt, J.F., and Liu, Z.-G. (2016). NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. *J. Biol. Chem.* *291*, 20030–20041.

Xu, X., Tang, L., Shan, H.F., Wang, Z.Q., and Shan, W.G. (2013). Study on Extraction of Cucurbitacin B from the Pedicel of *Cucumis melo* L. by Acid Hydrolysis. *Adv. Mater. Res.* *704*, 61–65.

Xuebin, L., Yun, S.L., Cheng-Rong, Y., and Charles E.E (2008). Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J Immunol.* *180*, 6070–6076.

Yamashita, T., Iwakura, T., Matsui, K., Kawaguchi, H., Obana, M., Hayama, A., Maeda, M., Izumi, Y., Komuro, I., Ohsugi, Y., et al. (2011). IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc. Res.* *91*, 640–648.

Yang, Y., Weiner, J., Liu, Y., Smith, A.J., Huss, D.J., Winger, R., Peng, H., Cravens, P.D., Rucke, M.K., and Lovett-Rucke, A.E. (2009). T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1549–1564.

Yasir, M., Sultana, B., Nigam, P.S., and Owusu-Apenten, R. (2016). Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC–ESI MS/MS identification of phenolic components. *Food Chem.* *199*, 307–313.

Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227.

Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu, D., Huynh, T., Wang, X., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2008). Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *Int. J. Cancer* 123, 1364–1375.

Yin, J., Valin, K.L., Dixon, M.L., and Leavenworth, J.W. (2017). The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J. Immunol. Res.* 2017.

Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., and Chen, L. (2015). Type 1 regulatory T cells: A new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 566–571.

Zettl, U.K., Mix, E., Zielasek, J., Stangel, M., Hartung, H.P., and Gold, R. (1997). Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro. *Cell. Immunol.* 178, 1–8.

Zhong, Y., Xue, X., Liu, Z., Ma, Y., Zeng, K., Han, L., Qi, J., Ro, D.-K., Bak, S., Huang, S., et al. (2017). Developmentally Regulated Glucosylation of Bitter Triterpenoid in Cucumber by the UDP-Glucosyltransferase UGT73AM3. *Mol. Plant* 10, 1000–1003.

Ziemssen, T., and Schrempf, W. (2007). Glatiramer Acetate: Mechanisms of Action in Multiple Sclerosis. In *International Review of Neurobiology*, pp. 537–570.

BIOGRAFIJA AUTORA

Bojan Jevtić je rođen 24. maja 1988. godine u Valjevu gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2007/2008. godine na studijskoj grupi biohemija. Osnovne akademske studije je završio 2012. godine sa posečnom ocenom 9.19. Završni rad pod nazivom „Uticaj sakvinavira i sakvinavira-NO na produkciju azot monoksida i odabranih citokina u makrofagima pacova soja Dark Agouti“, uradio je u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Master akademske studije na smeru biohemija Hemijskog fakulteta završio je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.60. Diplomski rad master akademskih studija pod nazivom „Ispitivanje uloge miR-155 u reaktivaciji encefalitogenih T limfocita pacova“ uradio je u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod neposrednim rukovodstvom dr Miljane Momčilović. Doktorske akademske studije na smeru Molekularna biologija eukariota Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2014/2015. godine. Eksperimentalni deo svoje doktorske disertacije uradio je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod neposrednim rukovodstvom dr Gordane Timotijević i u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića. 2014. godine zaposlen je na Odeljenju za imunologiju kao istraživač pripravnik, a od 2015. godine kao istraživač saradnik na projektu „Ćelijski i molekularni mehanizmi oporavka pacova od eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog biološkog društva, Društva za neuronauke Srbije, a putem ovih i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Internacionalne unije imunoloških društava (International Union of Immunological Societies, IUIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Dobitnik je nagrade “Goran Ljubijankić” za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije odbranjen u 2013. godini. Iste godine je postao dobitnik Specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh u toku studija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Tokom osnovnih i master akademskih studija bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije i grada Valjeva.

Bojan Jevtić je učestvovao u organizaciji i realizaciji projekta promocije imunologije u Srbiji, u sklopu proslave svetskog dana imunologije (29.04.2016.), na poziv IUIS, a na temu: „Imunoterapija“. Kampanja je nagrađena od strane IUIS kao kampanja sa najboljom temom. Bio je učesnik je dve letnje škole, za Imunologiju u Bečićima 2015. godine i NERKA letnje škole za neuroinflamaciju u Kotoru 2016. godine.

Bojan Jevtić je do danas učestvovao kao autor/koautor na 12 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, ima 5 saopštenja na međunarodnim i 2 na domaćim naučnim skupovima.