

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Iva D. Božić

**ANTIINFLAMATORNA I  
ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA  
BENFOTIAMINA U AKTIVIRANOJ LINIJI  
MIKROGLIJSKIH ĆELIJA MIŠA: ULOGA  
PROINFLAMATORNIH SIGNALNIH  
PUTEVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Iva D. Božić

**ANTIINFLAMMATORY AND  
ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF  
BENFOTIAMINE IN ACTIVATED  
MICROGLIAL MOUSE CELL LINE: ROLE  
OF PROINFLAMMATORY SIGNALING  
PATHWAYS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:**

### **Mentori:**

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

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

### **Članovi komisije:**

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

Dr Danijela Savić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Dr Danijela Laketa, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2016. godine

## ZAHVALNICA

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

*Hvala prof dr Mirjani Stojiljković na ukazanom poverenju, velikoj podršci koju mi je pružala za vreme rada i svim korisnim savetima i sugestijama tokom godina. Hvala joj što mi je pružila priliku da radim u njenoj laboratoriji.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Ireni Lavrnji, na trudu i vremenu koje je uložila u ovu tezu, na sveobuhvatnoj pomoći, podršci i savetima. Hvala joj što je uvek bila tu da sa mnom podeli svoje znanje i iskustvo, da me nauči kako da se bolje organizujem, i hvala na prijateljstvu.*

*Prof dr Nadeždi Nedeljković veliko hvala na ukazanom poverenju, pomoći i sugestijama koje su oblikovale ovaj rad, tokom eksperimenata i pisanja.*

*Dr Sanji Peković veliko hvala na pomoći, podršci, strpljenju i korisnim sugestijama tokom pisanja ove teze.*

*Dr Danijeli Savić hvala što je rukovodila delom ove teze i naučila me radu u ćelijskoj kulturi, na korisnim savetima tokom izrade i pisanja ove teze, i na prijateljskoj pomoći.*

*Dr Danijeli Laketi hvala na pomoći, prijateljstvu i konstruktivnim smernicama u radu i pisanju.*

*Posebno želim da se zahvalim mojim kolegicama Ani, Mariji, Ivani, Sanji i Mariji što su bile spremne da pomognu kad god je to bilo potrebno, kao i na prijateljskoj i vedroj atmosferi u laboratoriji.*

*Hvala Dr Ivani Stevanović i Dr Ivanu Spasojeviću na pomoći u eksperimentima koji su se ticali oksidativnog stresa, na konstruktivnim sugestijama i diskusiji.*

*Dr Ivanu Milenkoviću najsrdačnije hvala na pruženoj prilici da učim i radim u njegovoj laboratoriji u Lajpcigu, i na svesrdnoj pomoći i podršci.*

*Hvala devojkama iz laboratorije 32 na savetima, pozajmicama i druženju. Hvala Smilji na prijateljstvu.*

*Mojim roditeljima, bratu i Nikoli hvala na svemu. Posebno hvala Nikoli na pomoći u sređivanju ovog rukopisa, bezgraničnoj podršci i razumevanju.*



# **Antiinflamatorna i antioksidativna svojstva benfotiamina u aktiviranoj liniji mikrogljijskih ćelija miša: uloga proinflammatoryh signalnih puteva**

## **REZIME**

Inflamacija je zajedničko obeležje različitih patologija centralnog nervnog sistema (CNS), od traumatskih povreda i ishemije, preko neurodegenerativnih oboljenja, do psihijatrijskih poremećaja. Mikrogljijske ćelije su rezidentne imunske ćelije CNS-a koje predstavljaju glavne pokretače i učesnike u inflamaciji. Mikroglija se aktivira u odgovoru na promene u homeostazi CNS-a pri čemu menja svoje morfološke i funkcionalne karakteristike. U aktiviranoj mikrogliji dolazi do reorganizacije citoskeleta što omogućava uvećanje ćelijskog tela, fagocitozu patogena ili ćelijskog otpada, kao i migraciju do mesta infekcije ili povrede. Takođe, aktivirana mikroglija produkuje brojne proinflammatory medijatore, kao što su proinflammatory citokini, hemokini, proteaze, reaktivne kiseonične i azotne vrste. Iako ovi molekuli imaju važnu ulogu u odbrani CNS-a od patogena i drugih štetnih stimulusa, oni tokom hronične aktivacije mikroglije dovode do snažnog inflamatornog odgovora, oštećuju i zdrave ćelije i dovode do neurodegeneracije. Stoga je smanjenje prekomerne mikrogljijske aktivacije jedna od glavnih strategija u terapiji oboljenja CNS-a koja se odlikuju inflamacijom.

Benfotiamin (*S*-benzoiltiamin *O*-monofosfat) je analog vitamina B1 sa većom biološkom raspoloživošću i dobrim farmakološkim profilom. Benfotiamin pokazuje povoljne efekte u lečenju neuropatija, nefropatija i retinopatija izazvanih dijabetesom. Pored toga, pokazana su antiinflamatorna i antioksidativna svojstva benfotiamina, ali njegov efekat na aktiviranu mikrogliju do sada nije poznat. Stoga, cilj ove disertacije bio je da se ispita potencijal benfotiamina da smanji aktivaciju mikroglije u *in vitro* modelu neuroinflammatorye. Eksperimenti su rađeni na BV-2 mikrogljijskoj ćelijskoj liniji koja je bila stimulirana lipopolisaharidom (LPS), što predstavlja dobro okarakterisan *in vitro* model aktivacije mikroglije.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da benfotiamin sprečava morfološke promene izazvane stimulacijom BV-2 ćelija LPS-om. Benfotiamin efikasno smanjuje

površinu ćelija i sprečava reorganizaciju citoskeleta indukovanu stimulacijom LPS-om. Takođe, benfotiamin smanjenjem produkcije proinflammatoryh medijatora ostvaruje antiinflammatoryno dejstvo u aktiviranoj mikrogliji. Benfotiamin smanjuje oslobađanje azot-monoksida, snižavajući gensku i proteinsku ekspresiju inducibilne azot oksid sintaze u aktiviranoj BV-2 mikrogliji. Benfotiamin takođe smanjuje gensku i proteinsku ekspresiju ciklooksigenaze-2 i proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, dok sa druge strane povećava oslobađanje antiinflammatorynog citokina IL-10. Povrh toga, benfotiamin smanjuje ekspresiju imunoregulatornog receptora CD40 čija aktivacija dovodi do aktivacije proinflammatoryh signalnih puteva. Osim antiinflammatoryh, benfotiamin pokazuje i antioksidativna svojstva. Benfotiamin smanjuje koncentraciju superoksid-anjona i malondialdehida, indikatora povišenog oksidativnog stresa, čiji nivo raste posle stimulacije BV-2 ćelija LPS-om. Pored direktnog antioksidativnog dejstva, benfotiamin deluje i posredno, povećavajući antioksidativnu odbranu aktiviranih BV-2 ćelija. Benfotiamin povećava gensku i proteinsku ekspresiju antioksidativnih enzima mangan superoksid dismutaze i katalaze, kao i aktivnost bakar cink superoksid dismutaze, katalaze i glutathion reduktaze. Pored toga, benfotiamin povećava ukupnu koncentraciju glutathiona, glavnog neenzimskog antioksidansa u aktiviranim BV-2 ćelijama. Ispitivanjem signalnih mehanizama u osnovi aktivacije mikroglije zaključeno je da benfotiamin ove efekte ostvaruje smanjujući aktivaciju ERK, JNK i PI3K/Akt signalne kaskade, kao i sprečavanjem translokacije NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora iz citoplazme u jedro. Važno je istaći da benfotiamin svoje dejstvo ostvaruje ne menjajući vijabilnost BV-2 ćelija.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji može da se zaključi da benfotiamin pokazuje antiinflammatoryna i antioksidativna svojstva u aktiviranim BV-2 mikroglijskim ćelijama i da je stoga dobar kandidat za terapiju oboljenja CNS-a koja se karakterišu inflamacijom i preteranom aktivacijom mikroglije.

**KLJUČNE REČI:** mikroglija, inflamacija, oksidativni stres, benfotiamin, ćelijska kultura

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurobiologija

**UDK BROJ:** 577.25:[611.813+616-002]:615.27(043.3)

# **Antiinflammatory and antioxidative properties of benfotiamine in activated microglial mouse cell line: role of proinflammatory signaling pathways**

## **ABSTRACT**

Inflammation is a hallmark of many central nervous system (CNS) diseases, including traumatic injuries, ischemia, neurodegenerative and psychiatric diseases. Microglia are resident immune cells of the CNS and main initiators and participants in inflammation. They are activated in response to any change in CNS homeostasis. In this process they change their morphological and functional characteristics. Activated microglia is characterized by cytoskeleton reorganization which enables enlargement of cell body, phagocytosis of pathogens or cell debris, and migration to site of infection or injury. Also, activated microglia release a diverse set of proinflammatory mediators, such as proinflammatory cytokines, chemokines, proteases, reactive oxygen and nitrogen species. Although these molecules have an important role in the defense against pathogens and other harmful stimuli, in chronic microglial activation they trigger strong inflammatory response and lead to damage of healthy cells and subsequent neurodegeneration. Consequently, suppression of microglial overactivation is one of the main strategies in therapy of CNS diseases characterized by inflammation.

Benfotiamine (*S*-benzoylthiamine O-monophosphate) is an analogue of vitamin B1 with higher bioavailability and good pharmacological profile. Benfotiamine exerts beneficial effects in treatment of diabetic complications such as neuropathy, nephropathy and retinopathy. In addition, recent studies have shown that benfotiamine has antiinflammatory and antioxidative properties, but its effect on activated microglia has not been elucidated. Therefore, the aim of this thesis was to examine the potential of benfotiamine to suppress microglial activation *in vitro*. The experiments were conducted using BV-2 microglial cell line activated with lipopolysaccharide (LPS), which represents a well characterized model of microglial activation.

Results obtained in this study show that benfotiamine prevents morphological alterations evoked by stimulation of BV-2 cells with LPS. Benfotiamine efficiently

reduces cell surface area and prevents cytoskeleton reorganization induced by LPS stimulation. Also, benfotiamine exerts antiinflammatory properties in activated microglia by inhibiting production of proinflammatory mediators. Benfotiamine suppresses the release of nitric oxide, by inhibiting expression of nitric oxide synthase at the gene and protein level in activated BV-2 microglia. Additionally, benfotiamine decreases gene and protein expression of cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6, whereas it increases the release of antiinflammatory cytokine IL-10. Moreover, benfotiamine suppresses the expression of immunoregulatory receptor CD40 whose activation leads to activation of proinflammatory signaling pathways. Aside from exerting antiinflammatory properties, benfotiamine also shows antioxidative effects. Benfotiamine decreases levels of oxidative stress indicators, superoxide anion and malondialdehyde, which are upregulated after LPS stimulation. In addition to direct antioxidative effects, benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 cells. Benfotiamine increases gene and protein expression of antioxidative enzymes manganese superoxide dismutase and catalase, while enhancing activity of copper zinc superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. Furthermore, benfotiamine upregulates the content of total glutathione, main non enzymatic antioxidant in activated microglial cells. Examination of signaling mechanisms that underlie microglial activation led to a conclusion that benfotiamine exerts its effects by decreasing activation of ERK, JNK and PI3K/Akt signaling cascades, in conjunction with inhibiting translocation of NF- $\kappa$ B transcription factor from the cytoplasm to the nucleus. Importantly, benfotiamine exerts these effects without affecting viability of BV-2 cells.

In conclusion, benfotiamine shows antiinflammatory and antioxidative properties in activated BV-2 microglial cells and therefore is a good therapeutic candidate for CNS diseases that are characterized by inflammation and overactivation of microglia.

**KEY WORDS:** microglia, inflammation, oxidative stress, benfotiamine, cell culture

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Neurobiology

**UDC NUMBER:** 577.25:[611.813+616-002]:615.27(043.3)

## SKRAĆENICE

•O<sub>2</sub><sup>-</sup> - super-oksid anjon

AB - Alchajmerova bolest

ALS - amiotrofična lateralna skleroza

AP-1 – protein aktivator

ARG1 - arginaza 1

ATF2 - aktivacioni transkripcioni factor 2

ATP - adenzin trifosfat

Aβ - amiloid-β

CAT – katalaza

CNS - centralni nervni sistem

CO - ugljen-monoksid

COX – ciklooksigenaza

Cu,ZnSOD - bakar cink superoksid dizmutaza

CX<sub>3</sub>CL1 - CX<sub>3</sub>C hemokin ligand 1

DAMP (*engl.* danger-associated molecular patterns) - molekularni motivi oštećenja tkiva

EAE - eksperimentalni autoimunske encefalomijelitis

eNOS - endotelna azot-monoksid sintaza

ERK (*engl.* extracellular signal-regulated kinase) - kinaza čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

gp130 - glikoprotein 130

GPx - glutation peroksidaza

GR - glutation reduktaza

GSH – redukovani glutation

GSSG – glutation disulfid

HIV - humani virus imunodeficijencije

HO-1 - hem oksigenaza-1

IDE (*engl.* insulin-degrading enzyme) - enzim koji degradira insulin

IFN-γ - interferon gama

IKK - kinazni kompleks inhibitorne subjednice κB

**IL-1** - interleukin-1  
**IL-10** - interleukin-10  
**IL-10R** – receptor za interleukin-10  
**IL-4** - interleukin-4  
**IL-6** - interleukin-6  
**IL-6R** – receptor za interleukin-6  
**iNOS** - inducibilna azot-monoksid sintaza  
**IκB** - inhibitorna subjedinica κB  
**JAK** – janus kinaze  
**JNK** (*engl.* c-Jun N-terminal Kinase) - c-Jun N-terminalna kinaza  
**KMB** - krvno-moždana barijera  
**LPS** – lipopolisaharid  
**MAPK** (*engl.* mitogen-activated protein kinases) - mitogenom aktivirane protein kinaze  
**MAPKK** - mitogenom aktivirane protein kinaze kinaza  
**MAPKKK** - mitogenom aktivirane protein kinaze kinaza kinaza  
**MCP-1** (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1) - protein hemoatraktant monocita 1  
**MDA** – malondialdehid  
**MMP** - matriksna metaloproteinaza  
**MnSOD** - mangan superoksid dizmutaza  
**MS** - multipla skleroza  
**NADPH** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
**NF-κB** (*engl.* nuclear factor-κB) - jedarni faktor-κB  
**nNOS** - neuronalna azot-monoksid sintaza  
**NO** – azot-monoksid  
**NOS** - azot-monoksid sintaza  
**NOX** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze  
**NRF2** - nuklearni respiratorni faktor 2  
**ONOO<sup>-</sup>** - peroksinitrit ONOO<sup>-</sup>  
**p38 MAPK** (*engl.* p38 mitogen-activated protein kinase) - protein kinaza aktivirana p38 mitogenom  
**PAMP** (*engl.* pathogen-associated molecular patterns) - molekulski motivi patogena  
**PB** - Parkinsonova bolešt

**PFA** - paraformaldehid  
**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandin E<sub>2</sub>  
**PI3K** - fosfatidilinozitol 3-kinaza  
**PIP<sub>3</sub>** - fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat  
**PKB/Akt** - protein kinaza B  
**PRR** (*engl.* pattern recognition receptors) - receptori molekulskih motiva  
**RNS** (*engl.* reactive nitrogen species) – reaktivne azotne vrste  
**ROS** (*engl.* reactive oxygen species) - reaktivne kiseonične vrste  
**sIL-6R** – solubilna forma receptora za interleukin-6  
**SOD** - superoksid dismutaza  
**STAT** (*engl.* signal transducer and activator of transcription proteins) - proteini prenosnici signala i aktivatori transkripcionih proteina  
**TGF-β** (*engl.* transforming growth factor-β) - faktor transformacije rasta beta  
**TLR** (*engl.* Toll-like receptors) - receptori slični Toll-u  
**TNFR** – receptor faktora nekroze tumora-α  
**TNF-α** - faktor nekroze tumora-α  
**TPM** - traumatska povreda mozga

# Sadržaj

I	UVOD .....	1
	1. Neuroinflamacija .....	1
	2. Mikroglia – poreklo i uloga u fiziološkim uslovima .....	2
	3. Aktivacija mikroglije .....	4
	4. Uloga mikroglije u neurodegeneraciji .....	9
	4.1. Citokini .....	10
	4.1.1. Faktor nekroze tumora- $\alpha$ .....	11
	4.1.2. Interleukin-6 .....	13
	4.1.3. Interleukin-10 .....	14
	4.2. Azot-monoksid.....	15
	4.3. Ciklooksigenaza 2 .....	17
	4.4. Oksidativni stres.....	18
	5. Signalni putevi u aktivaciji mikroglije .....	23
	5.1. MAPK signalne kaskade.....	23
	5.1.1. ERK signalna kaskada.....	23
	5.1.2. JNK signalna kaskada.....	24
	5.1.3. Signalna kaskada p38 MAPK.....	25
	5.2. PI3K/Akt signalni put .....	26
	5.3. NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor.....	27
	6. Stimulacija LPS-om kao model aktivacije mikroglijskih ćelija u kulturi.....	29
	7. Terapijski potencijal benfotiamina .....	30
II	CILJEVI .....	34
III	MATERIJAL I METODE .....	35
	1. Materijal.....	35
	2. Metode .....	41
	2.1. Kultura mikroglijskih ćelija .....	41
	2.1.1. Tripsinizacija i određivanje broja ćelija .....	41
	2.1.2. Sejanje ćelija i tretmani .....	42
	2.2. Analiza vijabilnosti i morfologije RTCA aparatom.....	43
	2.3. MTT test vijabilnosti.....	44
	2.4. Kristal violet esej .....	44
	2.5. Protočna citofluorimetrija .....	45
	2.5.1. Analiza ćelijske smrti .....	45
	2.5.2. Detekcija ekspresije CD40 kostimulatornog proteina .....	46
	2.6. Analiza morfologije BV-2 ćelija.....	46
	2.7. Imunocitohemijsko obeležavanje.....	47
	2.8. Određivanje koncentracije nitrita.....	48
	2.9. Izolacija RNK .....	49
	2.10. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije .....	50



2.11. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	50
2.12. Enzimski imunološki esej .....	52
2.13. Priprema ćelijskog lizata.....	53
2.14. Priprema citosolne i jedarne frakcije proteina .....	53
2.15. Određivanje koncentracije proteina .....	54
2.16. Elektroforetsko razdvajanje proteina .....	54
2.17. Prenos proteina na poliviniliden-fluoridnu membranu i imunoblot analiza .....	55
2.18. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite ....	56
2.18.1. Merenje koncentracije superoksid anjona .....	56
2.18.2. Analiza sadržaja malondialdehida .....	56
2.18.3. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona.....	57
2.18.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	57
2.18.5. Merenje aktivnosti katalaze .....	58
2.18.6. Analiza aktivnosti glutacion peroksidaze.....	58
2.18.7. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze.....	58
2.19. Merenje unutarćelijske koncentracije ATP-a.....	59
2.20. Statistička obrada podataka.....	59
<b>IV REZULTATI.....</b>	<b>60</b>
1. Efekat benfotiamina na preživljavanje i morfologiju BV-2 mikroglijskih ćelija u kulturi .....	60
1.1. Benfotiamin ne utiče na vijabilnost BV-2 ćelija.....	60
1.2. Benfotiamin menja morfologiju BV-2 mikroglijskih ćelija stimuliranih LPS-om .....	61
1.3. Ispitivanje ćelijske smrti u kulturi BV-2 mikroglijskih ćelija .....	66
2. Efekat benfotiamina na sintezu i oslobađanje LPS-om indukovanih proinflamatornih i antiinflamatornih faktora u BV-2 mikroglijskim ćelijama ....	68
2.1. Benfotiamin suprimira ekspresiju receptora CD40.....	68
2.2. Benfotiamin smanjuje produkciju NO .....	70
2.3. Benfotiamin inhibira ekspresiju COX-2 .....	72
2.4. Benfotiamin moduliše sintezu i oslobađanje citokina .....	74
3. Ispitivanje efekta benfotiamina na antioksidativni sistem LPS-om stimuliranih BV-2 mikroglijskih ćelija .....	77
3.1. Benfotiamin smanjuje produkciju reaktivnih vrsta .....	77
3.2. Benfotiamin moduliše ekspresiju enzima antioksidativne zaštite .....	78
3.3. Benfotiamin povećava aktivnost antioksidativnih enzima i sadržaj glutaciona.....	82
3.4. Benfotiamin povećava sadržaj ATP-a u BV-2 ćelijama.....	84
4. Ispitivanje signalnih puteva delovanja benfotiamina u BV-2 ćelijama .....	85
4.1. Benfotiamin moduliše LPS-indukovanu aktivaciju MAPK i Akt signalnih puteva.....	86
4.2. Antiinflamatorni efekat benfotiamina je posredovan ERK, JNK i Akt signalnim putevima .....	88

4.3. Benfotiamin smanjuje translokaciju NF- $\kappa$ B u jedro u aktiviranim BV-2 ćelijama .....	90
V DISKUSIJA .....	93
VI ZAKLJUČCI.....	117
VII LITERATURA.....	119
VIII DODATAK.....	149

# **I UVOD**

## 1. Neuroinflamacija

Inflamacija je zaštitni mehanizam višćelijskih organizama koji im omogućava da se bore protiv različitih štetnih uticaja, uključujući patogene i povrede. Inflamacija je ujedno i odgovor na pretnje u samom organizmu, kao što su nagomilavanje nepravilno modifikovanih proteina, prisustvo oštećenih ćelija ili greške u funkcionisanju imunskog sistema. Imunski sistem igra glavnu ulogu u inflamatornom odgovoru, koristeći niz različitih tipova ćelija, signalnih molekula i mehanizama delovanja. Iako inflamatorni odgovor ima za cilj eliminaciju štetnih stimulusa i oporavak organizma, u određenim uslovima to nije moguće i dolazi do hronične borbe koja održava inflamatorno stanje tokom dugog vremenskog perioda (Wyss-Corey i Mucke, 2002).

Neuroinflamacija, inflamacija centralnog nervnog sistema (CNS), obeležje je brojnih patoloških stanja kao što su infekcije, moždani udar i neurodegenerativna oboljenja. Čak i kada ne predstavlja prvi događaj u razvoju bolesti, inflamacija igra ključnu ulogu u neurodegeneraciji, s obzirom da začarani krug inflamacije dovodi do produkcije neurotoksičnih faktora koji pogoršavaju patološko stanje (Glass i sar., 2010). CNS je dugo smatran imunološki privilegovanim tkivom u organizmu, u kome do inflamacije dolazi samo u slučaju direktne infekcije patogenima ili nakon narušavanja integriteta krvno-moždane barijere (KMB). Međutim, danas je poznato da rezidentne ćelije CNS-a mogu pokrenuti inflamaciju. Najvažniji akteri u inflamatornom odgovoru CNS-a su mikroglijske ćelije, specijalizovane imunokompetentne ćelije. Ove ćelije odgovaraju na svaki poremećaj homeostaze CNS-a aktivacijom, procesom tokom kojeg se ove ćelije morfološki i funkcionalno menjaju u cilju eliminisanja nastale pretnje (Hanisch i Kettenmann, 2007). Druge ćelije CNS-a, astrociti, neuroni i endotelne ćelije, mogu da modulišu imunski odgovor, ali ga uglavnom ne pokreću. Aktivacija mikroglije je centralni događaj u neuroinflamaciji. U ovom procesu najčešće dolazi i do promena u propustljivosti KMB, što omogućuje ulazak perifernih imunskih ćelija u CNS, koje zajedno sa mikroglijom produkuju proinflamatorne citokine, hemokine, reaktivne kiseonične (*engl.* reactive oxygen species, ROS) i azotne vrste (*engl.* reactive nitrogen species, RNS). Svi navedeni molekuli dovode do oštećenja i smrti neurona, kako tokom akutne, a još i više tokom hronične aktivacije mikroglije (Gonzalez i sar., 2014). Tako

je zabeležena korelacija između stepena aktivacije mikroglije i progresije neurodegenerativnih oboljenja (Ouchi i sar., 2005; Pavese i sar., 2006). Zbog ključne uloge u različitim patologijama CNS-a mikroglija je poslednjih godina predmet brojnih istraživanja. U žiži su osnovni mehanizmi aktivacije mikroglije, s obzirom na to da je u pitanju veoma složen proces sa velikim brojem učesnika. Takođe se ispituje sposobnost brojnih prirodno postojećih i nosivih sintetičkih jedinjenja u smislu sposobnosti modulacije mikroglijske reakcije, jer bi odgovarajući terapeutik bio koristan za različite patologije CNS-a (Block i sar., 2007).

## **2. Mikroglija – poreklo i uloga u fiziološkim uslovima**

Pío del Río-Hortega je prvi put opisao mikrogliju kao poseban tip ćelija u CNS-u 1932. godine. Mikroglijske ćelije čine približno 5-12% populacije svih ćelija u mozgu. Iako su prisutne u svim regionima CNS-a, njihova zastupljenost pokazuje regionalne specifičnosti (Lawson i sar., 1990; Mittelbronn i sar., 2001).

Za razliku od neurona, astrocita i oligodendrocita koji su neuroektodermalnog porekla, mikroglija je mezodermalnog/mezenhinskog porekla. S obzirom na to da se mikroglijske ćelije često posmatraju kao specijalizovani makrofagi u CNS-u, dugo je bilo prihvaćeno mišljenje da su poreklom od monocita koji iz krvi ulaze u CNS tokom gestacionog perioda i postnatalno. Međutim, danas se zna da je progenitor ovih ćelija eritromijeloidni prekursor koji je prisutan samo tokom embrionalnog razvića (Gomez Perdiguero i sar., 2013). Ove ćelije poreklom iz žumančetine kesice rano naseljavaju mozak miša i brzo proliferišu tokom embrionalnog razvića. Stimulišući faktor kolonije 1 (*engl.* colony stimulating factor 1), interleukin-34 i faktor transformacije rasta-beta (*engl.* transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) važni su regulatori diferencijacije mikroglije tokom embrionalnog razvića (Katsumoto i sar., 2014). U normalnim uslovima formirana populacija mikroglije je stabilna i samostalno se obnavlja. Za razliku od rezidentnih makrofaga u drugim tkivima, mikroglija se u mozgu odraslih jedinki obnavlja nezavisno od monocita iz krvi (Ajami i sar., 2007; Neumann i Wekerle, 2013). Umirujuće mikroglijske ćelije u CNS-u zamenjuju druge ćelije mikroglije koje potiču iz lokalne populacije. Međutim, uspostavljena ravnoteža biva narušena u patološkim stanjima. Tokom aktivacije mikroglije dolazi do intenzivne

proliferacije rezidentnih ćelija, što je proces označen kao mikrogliaza. Ulazak monocita iz krvi u CNS se odvija u određenim inflamatornim patologijama, kao što je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), animalni model multiple skleroze (Neumann i Wekerekle, 2013). Ipak, monociti ne doprinose populaciji mikroglialskih ćelija i od njih se razlikuju po transkripcionim faktorima i faktorima diferencijacije tokom embrionalnog razvića, kao i po morfologiji i molekulima koje ekspimiraju (Katsumoto i sar., 2014; Greter i sar., 2015).

Kada migriraju u CNS tokom embrionalnog razvića, mikroglialske ćelije se iz ameboidnog oblika transformišu u ćelije sa malim telom i brojnim tankim nastavcima koji se pružaju u različitim pravcima. Ovakva ramifikovana morfologija je dugo bila označena kao „mirujuća“ forma mikroglije. Međutim, utvrđeno je da mikroglia nikada ne miruje i da stalno nadzire svoju okolinu pomoću dugačkih nastavaka koji su u konstantnom pokretu (Nimmerjahn i sar., 2005; Davalos i sar., 2005). Svaka ćelija ima svoj domen delovanja i pomoću nastavaka ostvaruje kontakt sa okolnim neuronima, astrocitima i krvnim sudovima. Nasuprot tome, kontakt između nastavaka susednih mikroglialskih ćelija dovodi do njihovog brzog povlačenja. Izražena pokretljivost svedoči o funkciji mikroglije kao svojevrsnog „kućepazitelja“ u CNS-u, omogućavajući kontrolu mikrosredine i uklanjanje metaboličkih proizvoda (Nimmerjahn i sar., 2005).

Predloženo je nekoliko mehanizama za koje se smatra da su u osnovi održavanja mikroglije u stanju nadzora. Pretpostavlja se da kontakt između neurona i mikroglije sprečava njenu aktivaciju. Takođe, neuroni oslobađaju brojne faktore pomoću kojih signaliziraju mikrogliji da je sve u redu i da aktivacija nije potrebna. U tom smislu ključna je signalizacija posredstvom fraktalkina - CX<sub>3</sub>C hemokin liganda 1 (CX<sub>3</sub>CL1) i CX<sub>3</sub>CR1 receptora na mikrogliji (Saijo i Glass, 2011). Odsustvo ovog receptora ili njegova smanjena ekspresija dovodi do smanjene neurogeneze i poremećaja u učenju i ponašanju (Katsumoto i sar., 2014), kao i do izraženog gubitka neurona kod animalnih modela povrede mozga, Parkinsonove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze (ALS) (Cardona i sar., 2006). Signalizacija posredstvom CD47, CD200 i CD22 koji se nalaze na membrani neurona i odgovarajućih receptora CD172, CD200R i CD45 na mikrogliji inhibira aktivaciju mikroglije (Saijo i Glass, 2011). Pretpostavlja se da TGF-β, antiinflamatorni citokin prisutan u visokim koncentracijama u zdravom CNS-u, takođe

predstavlja inhibitorni signal za aktivaciju mikroglije (Kim i sar., 2004). Osim toga, mikroglija ispoljava brojne receptore za neurotransmitere, neuropeptide i neuromodulatore što joj omogućava da prati i odgovara na aktivnost neurona (Kettenmann i sar., 2013).

Osim nadzorne uloge, mikroglija ima i druge funkcije u zdravom tkivu CNS-a, važna je za normalan razvoj mozga i održavanje homeostaze. Ove ćelije učestvuju u regulaciji ćelijske smrti tako što fagocituju apoptotične neurone, regulišu neurogenezu i eliminišu sinapse (Katsumoto i sar., 2014). Eksperimenti *in vitro* pokazali su da mikroglija oslobađa brojne neurotrofične faktore, kao što je faktor rasta sličan insulinu (*engl.* insulin-like growth factor 1), neurotrofni faktor poreklom iz mozga (*engl.* brain-derived neurotrophic factor), TGF- $\beta$  i nervni faktor rasta (*engl.* nerve growth factor) (Saijo i Glass, 2011). S obzirom na to da oslobađa faktore koji podstiču neurogenezu, pretpostavlja se da mikroglija ima važnu ulogu u migraciji i diferencijaciji neuronalnih progenitorskih ćelija (Katsumoto i sar., 2014). Takođe, mikroglija učestvuje u eliminaciji nepotrebnih sinapsi tokom razvića. Osim u razvoju, ona ovu funkciju obavlja i kod odraslih organizama, fagocitujući nefunkcionalne sinapse (Kettenmann i sar., 2013, Wake i sar., 2013).

### **3. Aktivacija mikroglije**

Zahvaljujući dugačkim nastavcima koji su u stalnom pokretu i brojnim receptorima na ćelijskoj membrani, mikroglija može da registruje i najmanje promene u homeostazi CNS-a, odgovarajući na širok opseg strukturno različitih molekula. Aktivaciju mikroglije može da izazove prisustvo faktora koji se normalno ne nalaze u parenhimu CNS-a, kao što su patogeni, unutarćelijske komponente, kao i molekuli koji se javljaju u patološkom obliku (agregati proteina). Stoga se mikroglija aktivira tokom infekcije, ishemije, povrede i u neurodegenerativnim bolestima, (Hanisch i Kettenmann, 2007; Kreutzberg, 1996), a skorašnja istraživanja svedoče i o patološkoj aktivaciji mikroglije čak i u poremećajima raspoloženja i pažnje (Frick i sar., 2013).

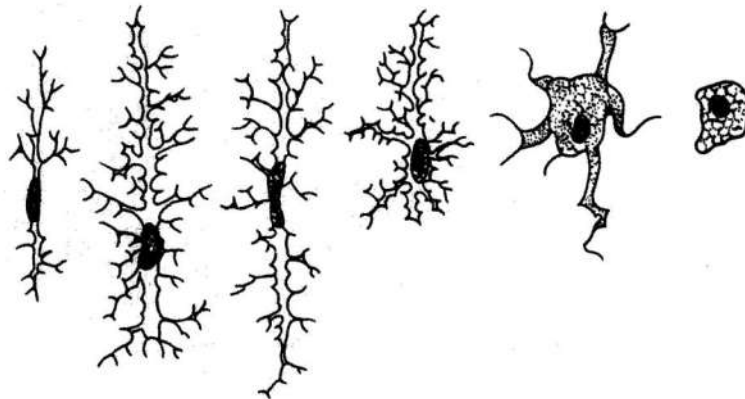
Mikroglija detektuje prisustvo patogena posredstvom membranskih receptora koji prepoznaju specifične molekulske motive. Molekulski motivi patogena (*engl.* pathogen-

associated molecular patterns, PAMP) su mali molekuli ili delovi molekula, najčešće ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i peptidi karakteristični za viruse i bakterije, ali ne i za ćelije domaćina. Receptori namenjeni prepoznavanju PAMP konstitutivno su eksprimirani na membrani mikroglijskih ćelija, a njihova ekspresija se uvećava nakon aktivacije (Aloisi, 2001). Osim receptora za PAMP, na membrani mikroglijskih ćelija postoji bogata kolekcija receptora koji su namenjeni prepoznavanju molekulskih motiva koji se javljaju nakon oštećenja tkiva (molekulski motivi oštećenja tkiva - *engl.* danger-associated molecular patterns, DAMP). Receptori namenjeni prepoznavanju svih patoloških molekulskih motiva zbirno se nazivaju receptori molekulskih motiva (*engl.* pattern recognition receptors, PRR) ili receptori primitivnih molekulskih motiva (*eng.* primitive pattern recognition receptors), jer su odgovorni za urođenu imunost, koja prethodi razvijanju adaptivne imunosti. Receptori PRR porodice se u zavisnosti od lokalizacije dele na membranske i endocitske PRR. U membranske PRR ubrajaju se receptori slični Tollu (*engl.* Toll-like receptors, TLR) i C-tip lektinski receptori, dok su endocitski PRR receptori slični NOD-u (*engl.* nucleotide-binding oligomerization domain), receptori koje karakteriše domen sa RNK helikaznom aktivnošću i dva domena koja regrutuju kaspaze, označeni kao receptori slični RIG-u 1, kao i pojedini članovi TLR porodice. TLR porodica receptora ima važnu ulogu u odgovoru na patogene i njeni članovi su široko eksprimirani u mikrogliji. Za aktivaciju mikroglije posebno je značajan TLR4 receptor za koji se vezuju lipopolisaharid bakterijskog zida gram negativnih bakterija (LPS), amiloid beta (A $\beta$ ) i drugi molekuli koji potom pokreću unutarćelijske signalne kaskade koje dovode do aktivacije mikroglije (Kettenmann i sar., 2011; Hanisch i Kettenmann, 2007). Osim prisustva određenih molekula, signal za aktivaciju mikroglije je i odsustvo liganada koje konstitutivno eksprimiraju neuroni (Hanisch, 2013).

Aktivaciju mikroglije prate izrazite morfološke promene (Slika 1). Nakon aktivacije, ove ćelije povlače svoje brojne nastavke i prelaze u ameboidnu formu. U fiziološkim uslovima telo mikroglije ne menja mesto, jer mikroglija ispoljava takozvanu domensku organizaciju u kojoj je svaka ćelija nadgleda jednu fiksiranu zapreminu nervnog tkiva, pri čemu se domeni susednih mikroglijskih ćelija ne preklapaju. Međutim, kada se u domenu mikroglijske ćelije pojavi jedan ili više patoloških



molekulskih motiva, ćelija posredstvom PRR receptora vezuje signal, postaje pokretljiva i kreće se hemotaksički ka mestu oštećenja ili izvora infekcije (Nimmerjahn i sar., 2005). Na tom mestu dolazi do proliferacije, čime je omogućena efikasnija odbrana i brža restauracija tkiva. Ovaj fenomen brzog uvećanja broja mikroglijskih ćelija naziva se mikroglioza. Mikroglioza je praćena ekspresijom i preraspodelom membranskih molekula zaduženih za interakciju sa drugim ćelijama i komponentama vanćelijskog matriksa. Menja se aktivnost unutarćelijskih enzima i dolazi do aktivacije nekoliko transkripcionih faktora koji zatim utiču na sintezu i oslobađanje proinflammatoryh i imunoregulatornih molekula. U zavisnosti od prirode i obima oštećenja u CNS-u, mikroglia može i da fagocituje patogene i oštećene ćelije. Oslobađanjem hemokina mikroglia privlači druge imunske ćelije u CNS, aktivirajući adaptivni imunski odgovor, usled svoje sposobnosti da prezentuje antigene T ćelijama koje se zatim bore protiv prisutnih patogenih (Kettenmann i sar., 2011).



**Slika 1. Morfološke promene tokom aktivacije mikroglije. Mikroglia povlači nastavke i transformiše se u ameboidnu, pokretljivu i fagocitirajuću ćeliju. Preuzeto iz Kreutzberg i sar., 1996.**

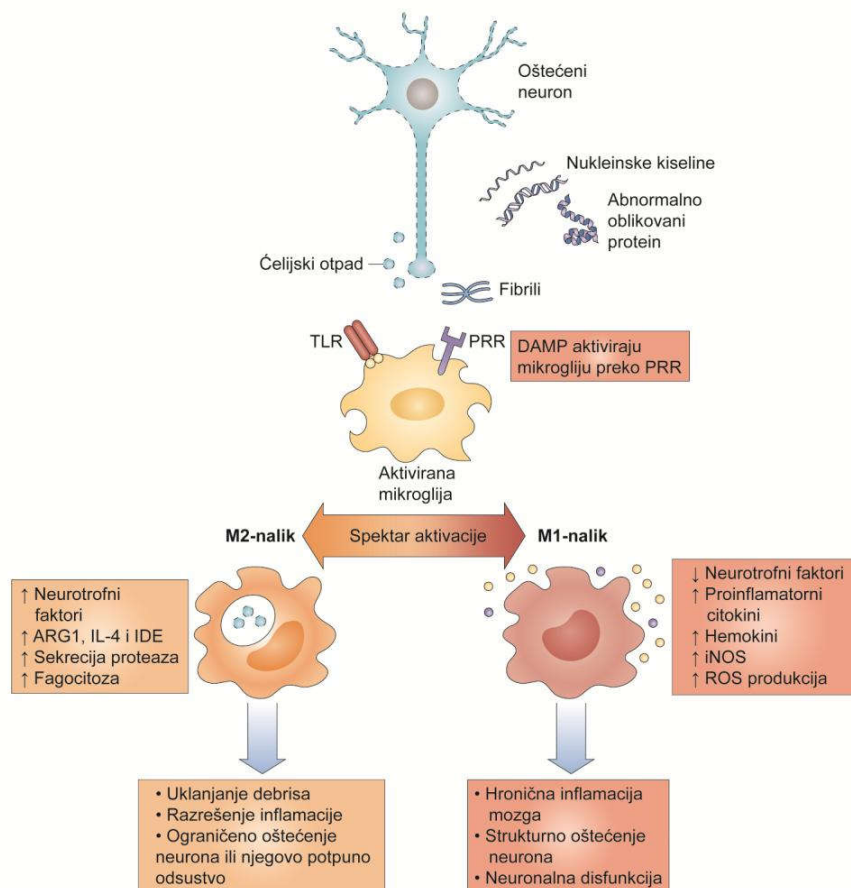
Poznato je da aktivirani makrofagi pokazuju dva fenotipa sa različitim ulogama u inflamatornom odgovoru. U klasičan odgovor makrofaga uključeni su citokini povezani sa odgovorom  $T_H1$  ćelija, kao što su interferon gama ( $IFN-\gamma$ ) i faktor nekroze tumora alfa ( $TNF-\alpha$ ), kao i drugi proinflammatory citokini. Fenotip makrofaga povezan sa ovom aktivacijom označen je kao M1 i dovodi do jačeg inflamatornog odgovora. Alternativni put karakteriše produkcija citokina povezanih sa odgovorom  $T_H2$  ćelija, kao što su  $TGF-\beta$  i interleukin-10 (IL-10), a nastali antiinflamatorni fenotip je poznat kao M2.

Ishod inflamatornog odgovora zavisi od prisustva M1 ili M2 fenotipa (Franco i Fernandez-Suarez, 2015).

Postoji izvesna analogija između aktivacije makrofaga i mikroglije. U odgovoru na infekciju, povredu, ili prisustvo LPS-a, mikroglija se aktivira i stiče karakteristike M1 fenotipa, kao što su ameboidni oblik, pokretljivost, produkcija proinflamatornih citokina, sposobnost fagocitoze i ekspresija molekularnih markera CD86 i inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS). Sa druge strane, u odgovoru na antiinflamatorne citokine, interleukin-4 (IL-4) i IL-10, mikroglija zadobija karakteristike M2 fenotipa, koji odlikuje malo ćelijsko telo, tanki dugački nastavci, prisustvo molekularnih markera CD206 i arginaze-1. Aktivacija M1 mikroglije povoljna je jer omogućuje eliminaciju patogena i ćelijskog otpada. Posle jakog proinflamatornog odgovora koji karakteriše M1 aktivaciju, mikroglija može preći u M2 fenotip koji vodi suzbijanju inflamacije i povoljnom ishodu. Sa druge strane, M1 mikroglija može ući u nekontrolisanu aktivaciju što dovodi do hroničnog oslobađanja neurotoksičnih faktora. Dugotrajna produkcija inflamatornih medijatora, kao što su TNF- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), azot-monoksid (NO), različiti hemokini i proteolitički enzimi, dovodi do oštećenja i smrti neurona čime se formira začarani krug inflamacije i neurodegeneracije. Takođe, tokom aktivacije M1 fenotipa dolazi do povećane aktivnosti familije enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza (NOX) koji produkuju superoksid-anjon radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), koji potom dovodi do stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i drugih reaktivnih vrsta, koje, takođe, oštećuju zdrave neurone (Gonzalez i sar., 2014). Iako kategorizacija fenotipa na M1 i M2 objašnjava mikroglijsku aktivaciju, danas je poznato da su odgovori mikroglije daleko heterogeniji i kompleksniji. Jedna ćelija može u istom trenutku da proizvodi i proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore, kao i da prima signale za polarizaciju i u jednom i u drugom smeru. Stoga, M1 i M2 predstavljaju ekstremne fenotipe širokog spektra aktivacije mikroglije (Slika 2; Cherry i sar., 2014; Gertig i Hanisch, 2014; Eggen i sar., 2013).

Prelazak mikroglije iz aktiviranog proinflamatornog stanja u fenotip kojim se odlikuje mikroglija u fiziološkim uslovima zavisi od brojnih faktora, kao što su TGF- $\beta$  i IL-10. Pretpostavlja se da u ovom procesu pored citokina učestvuju i drugi parakrini, autokrini i endokrini signalni molekuli (Block i sar., 2007). Signalizacija preko

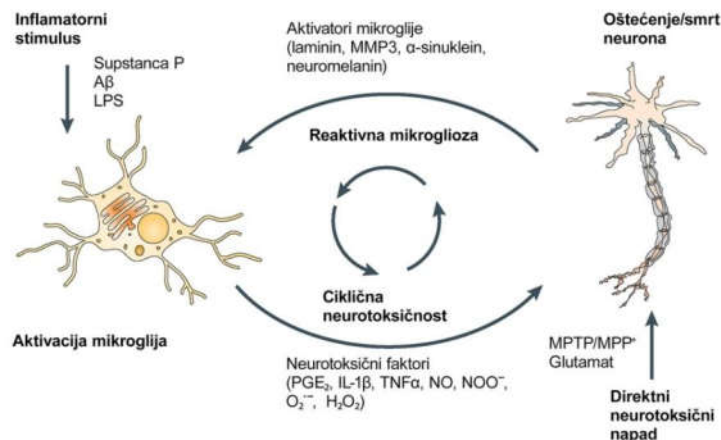
različitih nuklearnih receptora, kao što su Nurr1 i estrogenski receptor  $\beta$ , može dovesti do smanjenja aktivacije mikroglije (Saijo i sar., 2013). Premda po morfologiji mogu ličiti na mirujuće ćelije, mikroglija posle aktivacije zadržava dugotrajne funkcijske promene što omogućava efikasniji odgovor na sledeće promene u homeostazi CNS-a, ali i povećava verovatnoću nastanka neurodegenerativnih oboljenja (Kettenmann i sar., 2011).



**Slika 2. Aktivacija mikroglije.** Različiti inflamatorni signalni molekuli se vezuju za receptore na mikrogliji (TLR, PRR) i dovode do aktivacije mikroglije. U zavisnosti od prirode i jačine stimulusa, mikroglia se transformiše u fenotip nalik na M1 ili M2. „M2-nalik“ fenotip se odlikuje povećanom fagocitozom i produkcijom neurotrofnih faktora, proteaza, IL-4, arginaze 1 (ARG1) i enzima koji razgrađuje insulin (*engl.* insulin-degrading enzyme, IDE). Sa druge strane, „M1-nalik“ fenotip smanjuje produkciju neurotrofnih faktora, a povećava oslobađanje proinflamatornih stimulusa. Preuzeto iz Heneka i sar., 2014.

#### 4. Uloga mikroglije u neurodegeneraciji

Neurodegeneracija, odnosno progresivni gubitak strukture i funkcije neurona, u osnovi je brojnih patologija CNS-a, kao što su multipla skleroza (MS), Alchajmerova bolest (AB), Parkinsonova bolest (PB), amiotrofična lateralna skleroza (ALS), ishemija, moždani udar i razne druge. Kao što je već navedeno, preterana aktivacija mikroglije je obeležje svih ovih oboljenja i smatra se da značajno doprionosi propadanju neurona i to posredstvom dva mehanizma (Slika 3). U prvom slučaju, mikroglija može da započne oštećenje neurona usled prisustva određenih proinflamatornih stimulusa koji dovode do njene aktivacije i proizvodnje neurotoksičnih proinflamatornih molekula. U drugom slučaju, mikroglija registruje već postojeće oštećenje neurona koje pak dovodi do njene preterane aktivacije i oštećenja susednih neurona, što formira začarani krug inflamacije i dovodi do masovne neurodegeneracije. Proinflamatorni medijatori koje mikroglija produkuje su zajednički za oba mehanizma i uključuju proinflamatorne citokine, NO, ROS, eikozanoide, glutamat, histamin, hemokine i druge čija će uloga u neurodegeneraciji biti detaljnije objašnjena u narednim poglavljima (Block i sar., 2007.; Heneka i sar., 2014.). Signalni molekuli koji dovode do aktivacije mikroglije se razlikuju u različitim patološkim stanjima CNS-a. Tako se AB karakteriše nagomilavanjem A $\beta$ , proteina koji je glavna komponenta amiloidnih plaka. A $\beta$  se vezuje za TLR4 receptor na mikrogliji i dovodi do njene aktivacije. U PB, oštećeni dopaminski neuroni oslobađaju molekule kao što su matriksna metaloproteinaza 3 (MMP3),  $\alpha$ -sinuklein i neuromelanin, koji dovode do aktivacije mikroglije. S druge strane, u MS-u dolazi do narušavanja KMB i infiltracije T limfocita koji aktiviraju i bivaju aktivirani mikroglijom (Strachan-Whaley i sar., 2014).



**Slika 3. Mikroglija u neurodegeneraciji.** Reaktivna mikroglijoza dovodi do oštećenja i smrti neurona putem dva mehanizma. Preuzeto iz Block i sar., 2007.

#### 4.1. Citokini

Citokini predstavljaju funkcijski povezanu grupu malih polipeptida koji autokrinno ili parakrinno modulišu različite ćelijske aktivnosti, uključujući rast, diferencijaciju i preživljavanje. U fiziološkim uslovima citokini imaju važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, neurogenezi i pamćenju (Morris i sar., 2013). U odgovoru na povredu ili infekciju, dolazi do povećane genske ekspresije citokina, što dovodi do njihovog povećanog oslobađanja u veoma kratkom vremenskom periodu. Uloga citokina je da u akutnim patološkim stanjima spreče dalju degeneraciju tkiva, iniciranjem, propagacijom i regulacijom inflamatornog odgovora, međutim ovi peptidi mogu da postanu izuzetno štetni ako inflamacija pređe u hronično stanje (Benveniste, 1992). Citokini se grubo mogu podeliti na proinflamatorne i antiinflamatorne, mada jedan citokin može obavljati i jednu i drugu ulogu u zavisnosti od stanja u kome se tkivo nalazi. Citokini mogu ostvariti različit efekat na različitim ćelijama i uticati na sintezu i funkciju drugih citokina što omogućava veoma kompleksnu regulaciju imunskih i inflamatornih odgovora. Povećana koncentracija proinflamatornih citokina primećena je i u likvoru PB pacijenata (Blum-Degen i sar., 1995; Mogi i sar., 1994), kao i u serumu, likvoru i koži ALS pacijenata (Ono i sar., 2001; Sekizawa i sar., 1998). Prihvaćeno je stanovište da proinflamatorni citokini doprinose razvoju MS-a, iako su zabeleženi različiti nivoi pojedinih citokina u likvoru pacijenata (Kothur i sar., 2015). S obzirom na njihov značaj

u neurodegenerativnim oboljenjima, posebna pažnja u istraživanjima se posvećuje proinflamatornim citokinima TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , kao i antiinflamatornom IL-10. Mikroglijske ćelije u CNS-u u najvećoj meri oslobađaju citokine, mada ih produkuju i astrociti, oligodendrociti, neuroni, endotelne i druge ćelije (Smith i sar., 2012).

#### 4.1.1. Faktor nekroze tumora- $\alpha$

TNF- $\alpha$  je prvobitno identifikovan kao faktor u serumu miševa koji dovodi do nekroze tumora, po čemu je i dobio ime (Carswell i sar., 1975). Danas je TNF- $\alpha$  poznat kao proinflamatorni citokin sa važnom ulogom u urođenom imunskom odgovoru. U homeostatskim uslovima TNF- $\alpha$  reguliše sinaptičku plastičnost (Beattie i sar., 2002), učenje i memoriju (Baune i sar., 2008), spavanje (Krueger, 2008), uzimanje hrane i vode (Plata-Salaman, 2001) i druge procese. U patološkim uslovima TNF- $\alpha$  koga produkuju mikroglija i astrociti učestvuje u neuroinflamatornom odgovoru. Povećana koncentracija TNF- $\alpha$  je zabeležena u različitim patologijama CNS-a, uključujući MS, AB, PB, encefalopatije izazvane humanim virusom imunodeficijencije (HIV), meningitis, moždani udar i traumatsku povredu mozga (TPM) (Probert, 2015).

TNF- $\alpha$  se sintetiše kao transmembranski protein, a svoje dejstvo ostvaruje u membranskoj i solubilnoj formi, vezujući se za jedan od dva receptora – receptor 1 (TNFR1) i receptor 2 za TNF- $\alpha$  (TNFR2). TNFR1 u citoplazmatskom segmentu sadrži domen za koji se vezuju adaptorski proteini koji aktiviraju kaspaze 8 i 10, a ovi enzimi potom pokreću apoptozu. Pored toga, signalizacija putem TNFR1 aktivira i jedarni faktor-kB (*engl.* nuclear factor-kB, NF- $\kappa$ B), kinazu čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinase, ERK), c-Jun N-terminalnu kinazu (*engl.* c-Jun N-terminal Kinase, JNK), protein kinazu aktiviranu p38 mitogenom (*engl.* p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK), kiselu i neutralnu sfingomijelinazu. Ovi signalni putevi regulišu ekspresiju brojnih gena, od kojih neki ostvaruju i antiapoptotski efekat, pa se pretpostavlja da TNF- $\alpha$  može imati i proapoptotsku i antiapoptotsku ulogu, u zavisnosti od ćelijskog konteksta (Olmos i Llado, 2014). Važno je da se napomene da aktivacija navedenih signalnih puteva dovodi do ekspresije brojnih citokina, hemokina i drugih proinflamatornih molekula koji

pojačavaju inflamaciju. Aktivacija TNFR2 je potpuna samo kada se za nju veže membranska forma TNF- $\alpha$ , što navodi na zaključak da TNFR2 ima ulogu u međucelijskoj signalizaciji. Signalni putevi koji se aktiviraju posredstvom TNFR2 nisu do kraja proučeni, ali je poznato da dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B i protein kinaze B (PKB/Akt) (Fischer i sar., 2015).

Tokom inflamacije u mikrogliji dolazi do aktivacije više različitih signalnih puteva, kao što su NF- $\kappa$ B, ERK, JNK i p38. Stoga je teško definisati koji od njih je zadužen za sintezu TNF- $\alpha$ , a postoje indicacije da su uključeni svi navedeni signalni putevi (Bozic i sar., 2015a; Shi i sar., 2015). U inflamaciji, aktivirana mikroglija oslobađa TNF- $\alpha$  u visokim koncentracijama što izaziva više različitih štetnih efekata. Oslobođeni TNF- $\alpha$  vezuje se za receptore na mikrogliji i aktivacijom proinflamatornih signalnih puteva dovodi do svoje dalje sinteze. Takođe, TNF- $\alpha$  stimuliše astrocite i mikrogliju da produkuju glutamat čime se povećava njegova koncentracija u vanćelijskom prostoru što dovodi do oštećenja neurona putem povećanja unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup> i proizvodnje ROS. Oštećeni neuroni šalju signale za aktivaciju mikroglije, što dovodi do daljeg oslobađanja TNF- $\alpha$  čime se formira pozitivna petlja koja podstiče inflamaciju i smrt neurona. TNF- $\alpha$  omogućava komunikaciju mikroglije sa astrocitima i neuronima, povezujući tako inflamaciju i ekscitotoksičnost. Smatra se da je ovaj mehanizam dejstva TNF- $\alpha$  prisutan kod većine patologija CNS-a u kojima je zabeležen povećan nivo TNF- $\alpha$  (Olmos i Llado, 2014). Nivo TNF- $\alpha$  se povećava sa razvojem bolesti kod MS pacijenata (Merrill i Benvensite, 1996), a porast TNF- $\alpha$  je zabeležen i u EAE-u (Issazadeh i sar., 1996). Takođe, u kulturi oligodendrocitnih ćelija pokazano je direktno citotoksično dejstvo ovog citokina (Selmaj i Raine, 1988). Međutim inhibitori TNF- $\alpha$  pogoršavaju razvoj MS-a, što pokazuje da TNF- $\alpha$  osim proinflamatornog efekata ima i važne druge uloge u CNS-u i da potpuna inhibicija njegove signalizacije nije preporučena (van Oosten i sar., 1996). Povećani nivoi TNF- $\alpha$  zabeleženi su u likvoru i u tkivu striatuma PB pacijenata (Mogi i sar., 1994), kao i u serumu AB pacijenata (Fillit i sar., 1991; Alvarez i sar., 2007).

#### 4.1.2. Interleukin-6

IL-6 je otkriven kao faktor koji stimulise sazrevanje B ćelija u ćelije koje proizvode antitela (Hirano i sar., 1985). U proteklih trideset godina otkrivene su brojne funkcije ovog citokina u organizmu. Iako se prevashodno posmatra kao proinflamatorni citokin, IL-6 u CNS-u ima i druge fiziološke uloge. IL-6 utiče na preživljavanje, diferencijaciju, proliferaciju i regeneraciju neurona, kao i na oslobađanje neurotransmitera, aktivnost neurona i sudbinu neuronalnih progenitorskih i stem ćelija. U CNS-u IL-6 proizvode mikroglijske i endotelske ćelije, astrociti i neuroni, dok su u uslovima neuroinflamacije najveći proizvođači mikroglija i astrociti. Shodno tome, povećana koncentracija IL-6 pronađena je u različitim bolestima CNS-a koje se odlikuju inflamatornom komponentom. Povećana koncentracija IL-6 zabeležena je u likvoru TPM pacijenata (Kossmann i sar., 1995), pacijenata obolelih od sistemskog eritemskog lupusa (Hirohata i Miyamoto, 1990), HIV-a i različitih drugih infekcija (Laurenzi i sar., 1990). Nekoliko studija pokazuje povećanje IL-6 u likvoru (Maimone i sar., 1991; Malmestrom i sar., 2006) i serumu MS pacijenata (Frei i sar., 1991; Navikas i sar., 1996), kao i u EAE animalnom modelu (Okuda i sar., 1999), mada uloga IL-6 u razvoju MS-a nije do kraja razjašnjena, jer su zabeležene i studije u kojima je pokazano da se koncentracija IL-6 ne menja značajno kod obolelih (Padberg i sar., 1999; Vladić i sar., 2002). Normalno starenje povezano je sa povećanom ekspresijom IL-6, kao i sa povećanim mikroglijskim oslobađanjem IL-6 u miševa, kako u kontrolnim uslovima, tako i nakon stimulacije LPS-om (Sierra i sar., 2007). Kod AB pacijenata IL-6 se oslobađa u većoj meri u okolini amiloidnih plaka, a povećan nivo IL-6 zabeležen je i u likvoru AB i PB pacijenata (Blum-Degen i sar., 1995; Hull i sar., 1996).

IL-6 svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za receptor (IL-6R) koji može biti u membranskoj ili solubilnoj formi (sIL-6R). Budući da IL-6R nije široko eksprimiran, sIL-6R omogućava veći domet ovog citokina, naročito u CNS-u (Jones i sar., 2001). Nakon vezivanja IL-6 za receptor, regrutuje se dimerizovani glikoprotein 130 (gp130), koji može da aktivira nekoliko signalnih puteva. Jedan od mogućih ishoda je aktivacija JAK-STAT signalnog puta, koji rezultira transkripcijom ciljnih gena (Smith i sar., 2012). IL-6 aktivira STAT1 i STAT3, mada je pokazano da STAT1 igra minimalnu ulogu u IL-6 signalizaciji (Sanz i sar., 2008). STAT1 reguliše signalizaciju posredovanu



interferonima (Arulampalam i sar., 2011; Lin i Lin, 2010), dok STAT3 aktivira gene uključene u ćelijski ciklus, proliferaciju i preživljavanje (Aggarwal i sar., 2006; Hirano i sar., 2000). IL-6 pokreće mitogenom aktivirane protein kinaze (*engl.* mitogen-activated protein kinases, MAPK), uključene u preživljavanje i odgovor na stres, kao i fosfatidilinozitol 3-kinazni (PI3K)/Akt signalni put koji je nedovoljno okarakterisan u kontekstu efekata koje IL-6 proizvodi (Spooren i sar., 2011).

Pored proinflamatorne uloge, IL-6 može imati i neuroprotektivna i antiinflamatorna svojstva (Eskes i sar., 2002). Uloga IL-6 u CNS-u je složena i zavisi od brojnih faktora, između ostalog interakcije sa drugim citokinima, stanja u kome se tkivo nalazi, prisustva IL-6R i sIL-6R, faze neuroinflamacije, koncentracije IL-6 i regiona CNS-a gde se oslobađa (Spooren i sar., 2011).

#### **4.1.3. Interleukin-10**

IL-10 je citokin sa brojnim antiinflamatornim ulogama u inflamaciji i imunoregulaciji. Otkriven je 1989. godine kao faktor koji inhibira sintezu citokina (*engl.* cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF), kao što su IL-2, IL-3, TNF, IFN- $\gamma$  i stimulišući faktor kolonije granulocita-makrofaga (Fiorentino i sar., 1989). Pokazano je takođe, da IL-10 inhibira produkciju i drugih proinflamatornih citokina kao što su IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i IL-12, i da stimuliše oslobađanje antiinflamatornih medijatora – antagonista za IL-1 receptor i solubilnog receptora za TNF- $\alpha$ . Takođe, IL-10 inhibira prezentaciju antigena na monocitima/makrofagima, smanjujući ekspresiju molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti II klase (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) i kostimulatornih i adhezionih molekula (Sabat i sar., 2010). Na periferiji IL-10 proizvode ćelije uključene u urođeni i adaptivni imunski odgovor, dok su u CNS-u glavni proizvođači mikroglija, astrociti i neuroni (Kwilasz i sar., 2014).

Neki od receptora čija aktivacija pokreće sintezu IL-10 su TLR4, CD209 i dektin-1 (Kwilasz i sar., 2014). Nekoliko signalnih puteva pokreće transkripciju IL-10 gena, kao što su MAPK (ERK i p38) i NF- $\kappa$ B, koji dovode i do povećane produkcije proinflamatornih citokina (Saraiva i O'Garra, 2010). IL-10 ostvaruje efekte vezujući se za heterotetramerni receptor sastavljen od dve IL-10R1 i dve IL-10R2 subjedinice, koji

aktivira JAK1 i tirozin kinaze 2, koje fosforilišu IL-10R i omogućuju vezivanje STAT3. Ovaj protein zatim prelazi u jedro gde aktivira transkripciju ciljnih gena koji sprečavaju aktivaciju NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih puteva i tako onemogućuju produkciju proinflamatornih citokina. Neki od proteina koji se aktiviraju su A20-vezujući inhibitor NF- $\kappa$ B aktivacije, fosfataza 1 sa dualnom specifičnošću koja inaktivira MAPK i NF- $\kappa$ B, supresori citokinske signalizacije 1 i 3 (*engl.* suppressor of cytokine signaling, SOCS) koji dovode do degradacije p65 subjedinice NF- $\kappa$ B, kao i MAPK fosfataze (Kwilasz i sar., 2014). Takođe je pokazano da IL-10 preko aktivacije p38 indukuje ekspresiju hem oksigenaze-1 (HO-1), enzima uključenog u metabolizam hema čija aktivnost rezultuje sintezom biliverdina, slobodnog gvožđa i ugljen-monoksida (CO). Inhibicija sinteze HO-1 suzbija antiinflamatorni efekat IL-10, a pretpostavlja se da je upravo CO važan za ostvarivanje tog dejstva IL-10 (Lee i Chau, 2002).

Neuroprotektivno delovanje IL-10 demonstrirano je u životinjskim modelima bolesti za neuropatski bol (Sloane i sar., 2009), PB (Arimoto i sar., 2007), MS (Sloane i sar., 2009) i AB (Kiyota i sar., 2012). Antiinflamatorno dejstvo IL-10 često se dovodi u vezu sa smanjenom aktivacijom mikroglije, što je osim u animalnim modelima pokazano i u kulturi mikroglialskih ćelija, gde IL-10 smanjuje inflamatorni odgovor mikroglije na tretman LPS-om (Kremlev i Palmer, 2005).

#### **4.2. Azot-monoksid**

NO je signalni molekul koji ispoljava brojne fiziološke efekte u organizmu. S obzirom na to da je NO mali i nepolarni molekul, on lako prolazi kroz ćelijsku membranu i ostvaruje brz i neposredan efekat u ciljnim ćelijama. U CNS-u NO ima višestruke uloge: učestvuje u sinaptičkoj transmisiji, dugotrajnoj potencijaciji i depresiji, regulisanoj ćelijskoj smrti i preživljavanju neurona, dok u visokim koncentracijama može biti neurotoksičan (Doherty, 2011).

Azot-monoksid sintaze (NOS) katalizuju reakciju sinteze NO i L-citrulina iz L-arginina (Knowles i Moncada, 1994). U CNS-u su identifikovane tri izoforme NOS: neuronalna NOS (nNOS) se nalazi u neuronima, astrocitima i endotelskim ćelijama krvnih sudova, inducibilna NOS (iNOS) se eksprimira u mikrogliji i astrocitima u

odgovoru na inflamatorne stimulse i endotelna NOS (eNOS), lokalizovana u endotelnim ćelijama i motoneuronima, važna za vazodilataciju. Neuronala NOS i endotelna NOS konstitutivno se eksprimiraju i njihova aktivnost zavisi od koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , dok je treća forma inducibilna, i njena aktivnost ne zavisi od  $\text{Ca}^{2+}$  (Yuste i sar., 2015). Ekspresija iNOS povećava se pod uticajem brojnih faktora. Primera radi, glijske ćelije povećavaju ekspresiju iNOS-a u odgovoru na LPS i druge bakterijske i virusne produkte, proinflamatorne citokine (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), međućelijski kontakt, neurodegenerativne toksine (A $\beta$ , oksidacioni produkti 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 – tetrahidropiridina), ishemijski šok i povredu (Saha i Pahan, 2006). U ekspresiju iNOS-a uključeni su brojni transkripcioni faktori, od kojih najvažniju ulogu igra NF- $\kappa$ B (Pautz i sar., 2010). Nakon aktivacije NF- $\kappa$ B se translocira u jedro gde se vezuje za promotor gena za iNOS i dovodi do transkripcije (Davis i sar., 2005).

Tokom neuroinflamacije, aktivacija iNOS-a u glijskim ćelijama dovodi do prekomerne produkcije NO, koji u visokim koncentracijama dovodi do smrti neurona (Figuroa i sar., 2006; Murphy, 2000; Pautz i sar., 2010). Azot monoksid je veoma reaktivan molekul koji direktno oštećuje proteine i druge ćelijske elemente. Pored toga, NO reaguje sa  $\bullet\text{O}_2^-$  i formira peroksinitrit (ONOO $^-$ ), jako oksidujuće sredstvo i ujedno veoma opasan molekul u živim sistemima. Destruktivan efekat RNS na ćelijske komponente naziva se nitrozativni stres (Doherty i sar., 2011). Azot monoksid u visokim koncentracijama može da pokrene i apoptozu i nekrozu neurona. S obzirom na to da oštećuje mitohondrije i onemogućava glikolizu nitrozilacijom gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), NO dovodi do potrošnje unutarćelijskog ATP-a i time do nekroze. Azot monoksid može da pokrene apoptozu aktivacijom proapoptotskih proteina, aktivacijom MAPK ili pokretanjem odgovora endoplazmatičnog retikuluma na stres (Brown i Borutaite, 2002). Takođe, NO koji oslobađaju glijske ćelije difunduje do presinaptičkih završetaka i blokira preuzimanje glutamata što dovodi do aktivacije N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i pojačanog ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u neurone. S obzirom na to da aktivnost brojnih enzima zavisi od unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , ovaj sled događaja izaziva poremećaj u metabolizmu i smrt neurona (Yuste i sar., 2015).

Budući da različiti stimulusi mogu da pokrenu aktivaciju mikroglije i prekomernu NO produkciju, a imajući u vidu da NO izaziva raznolike štetne efekte, ne čudi što je

nitrozativni stres uključen u patogenezu brojnih neurodegenerativnih bolesti, uključujući MS (AlFadhli i sar., 2013), PB (Broom i sar., 2011), AB (Nunomura i sar., 2001) i ALS (Boll i sar., 2003).

### **4.3. Ciklooksigenaza 2**

COX je enzim koji katalizuje konverziju arahidonske kiseline u prostanoide, familiju lipidnih metabolita koja uključuje prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Prostaglandini imaju važnu ulogu u inflamatornoj kaskadi i regulaciji citokina. Kada se oslobode u velikim koncentracijama doprinose razvoju moždanog edema, citotoksičnosti i oštećenju neurona. Jedan od glavnih prostaglandina koga proizvode mikroglijske ćelije je prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) koji stimuliše produkciju IL-6 u astrocitima. Osim prostaglandina, tokom aktivacije COX-a dolazi i do formiranja slobodnih radikala koji dalje pogoršavaju inflamaciju (Farooqui i sar., 2007).

COX ima dva katalitička mesta sa oksigenaznom i peroksidaznom aktivnošću. Pored konstitutivne izoforme (COX-1), koja je eksprimirana u skoro svim ćelijskim tipovima, u određenim ćelijama se pod dejstvom faktora rasta, citokina i drugih proinflamatornih molekula eksprimira i inducibilna forma (COX-2) koja igra važnu ulogu u inflamaciji (Minghetti, 2004). COX-1 je široko eksprimirana u mozgu i zadužen za homeostatsku produkciju prostaglandina. COX-2 je u fiziološkim uslovima prisutna u neuronima i glijskim ćelijama u nivou korteksa, hipokampusu, hipotalamusu i amigdala i pretpostavlja se da takođe učestvuje u održavanju homeostaze (Phillis i sar., 2006). Međutim, povećana ekspresija COX-2 i prostaglandina primećena je u mikroglijskim ćelijama u inflamaciji. Ovo je pokazano posle intravenske aplikacije LPS-a pacovima (Elmqvist i sar., 1997), kao i posle tretmana LPS-om mikroglijskih ćelija u kulturi (Minghetti i Levi, 1995). Ekspresija COX-2 je regulisana na transkripcionom i post-transkripcionom nivou (Minghetti i sar., 2004). Brojni transkripcioni faktori aktiviraju COX-2 promotor, od kojih je u mikroglijskim ćelijama najvažniji NF-κB (Appleby i sar., 1994; Yamamoto i sar., 1995). Smatra se da je ekspresija iNOS i COX-2 blisko povezana, budući da isti transkripcioni faktori aktiviraju transkripciju gena za oba enzima. Pored toga, NO i peroksinitrit aktiviraju COX-2 i povećavaju produkciju prostaglandina, delujući na post-transkripcionom ili

translacionom nivou, kako bi povećali ekspresiju COX-2 proteina. Povećana koncentracija NO aktivira ERK i p38 signalne puteve koji takođe dovode do transkripcije COX-2 (Mollace i sar., 2005). Pored toga, pokazano je da je NO neophodan za dugotrajnu ekspresiju COX-2 gena (Perkins i Kniss, 1999). Može da se zaključi da je ekspresija i aktivnost iNOS i COX-2 enzima blisko povezana i da je izuzetno značajna njihova uloga u pokretanju i održavanju inflamatornog odgovora.

#### 4.4. Oksidativni stres

Prethodno je navedeno da aktivirana mikroglija proizvodi brojne proinflamatorne molekule koji imaju ulogu u odbrani CNS-a protiv patogena i povreda. Kao i kod drugih imunskih ćelija, važan deo proinflamatornog repertoara predstavljaju ROS i RNS, veoma reaktivne vrste koje oksiduju ćelijske komponente, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. U pitanju su mali lipofilni molekuli koji lako prolaze kroz ćelijsku membranu ili zid patogena, brzo ih oštećuju i uništavaju. Međutim, tokom hronične aktivacije mikroglije ovi molekuli postaju toksični i po okolno tkivo. Neuronima su posebno osetljivi, jer imaju slabu antioksidativnu zaštitu i nizak regenerativni kapacitet, a sa druge strane visoku metaboličku aktivnost i potrošnju kiseonika (Andersen, 2004; Barnham i sar., 2004). Stoga ne čudi da je oksidativni stres obeležje brojnih neurodegenerativnih oboljenja koje karakteriše preterana aktivacija mikroglije, a među njima su MS (Lassmann, 2013; Ortiz i sar., 2013), AB (Chen i Zhong, 2014), PB (Gaki i Papavassiliou, 2014) i ALS (Pollari i sar., 2014).

U reaktivne vrste koje sadrže kiseonik ulaze  $\bullet\text{O}_2^-$ , hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), peroksil ( $\bullet\text{ROO}$ ) i alkoksil ( $\bullet\text{RO}$ ) radikali, kao i drugi oksidansi koji nisu slobodni radikali, ali su veoma reaktivni i lako se u njih transformišu, kao što je  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kallapura i sar., 2014). Povećana ROS produkcija u aktiviranoj mikrogliji počinje sa povećanom aktivacijom familije NOX enzima. Ovi enzimi katalizuju transfer elektrona sa NADPH do molekuskog kiseonika pri čemu nastaje  $\bullet\text{O}_2^-$  koji dovodi do produkcije drugih reaktivnih vrsta. Kod sisara je opisano sedam izoformi NOX, dok mikroglijske ćelije eksprimiraju NOX1, NOX2 i NOX4. NOX2 se eksprimira u fagocitnim ćelijama i ima ulogu u odbrani od patogena. Ovaj enzim se nalazi u vezikulama unutar ćelije, međutim aktivacioni signal dovodi do translokacije u ćelijsku membranu (Nayernia i sar., 2014).

U homeostatskim uslovima je zabeležen nizak nivo NOX2 u mikrogliji, ali i značajna indukcija ekspresije u inflamatornim uslovima (Wu i sar., 2006; Fischer i sar., 2012). Važnu ulogu u oksidativnom stresu igra i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji nastaje redukcijom •O<sub>2</sub><sup>-</sup> koja može biti spontana ili katalizovana superoksid dismutazom (SOD) (Dasuri i sar., 2012).

Nastali •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deluju kao sekundarni glasnici i stimulišu produkciju NO. Primećeno je da tretman mikroglijskih ćelija antioksidansima kao što su N-acetilcistein smanjuje NO produkciju (Pahan i sar., 1998). U nekoliko studija je pokazano da inhibicija, mutacija ili inaktivacija NOX-a dovodi do smanjene aktivacije iNOS-a u aktiviranoj mikrogliji (Min i sar., 2004; Pawate i sar., 2004; Cordle i Landreth, 2005). Kao što je već navedeno, NO i •O<sub>2</sub><sup>-</sup> formiraju ONOO<sup>-</sup>, molekul koji pokazuje daleko toksičnija svojstva (Bal-Price i sar., 2002; Gobbel i sar., 1997). Osim što je jako oksidujuće sredstvo, ONOO<sup>-</sup> može da ošteti proteine u ćelijama i putem nitracije tirozinskih ostataka proteina. Njegovo štetno dejstvo je pokazano na kompleksu I, kompleksu II/III, citohrom oksidazi (kompleks IV), ATP sintazi, akonitazi, SOD, kreatin kinazi i drugim proteinima, što može da dovede do smrti ćelija (Brown, 1999). Posle redukcije ONOO<sup>-</sup> brzo disosuje na azot-dioksid (N<sub>2</sub>O) i hidrosil radikal, takođe jaka oksidaciona sredstva. S obzirom da ometaju respiraciju u mitohondrijama, NO i ONOO<sup>-</sup> povećavaju produkciju •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osim toga, RNS mogu da inhibiraju katalazu i glutation peroksidazu, enzime koji katalizuju razlaganje vodonik peroksida do vode. Na ovaj način se formira pozitivna povratna sprega i raste produkcija svih reaktivnih vrsta (Brown i Borutaite, 2002).

Svi slobodni radikali dovode do peroksidacije lipida u ćelijskim membranama, pri čemu se kao krajnji metaboliti formiraju reaktivni α,β aldehidi, dialdehidi i ketoaldehidi. Ovi aldehidi su relativno stabilni, mogu da difunduju sa mesta gde su nastali i na taj način prošire oksidativna oštećenja. Jedan od važnijih proizvoda lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA). MDA nastaje peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina. Povećana koncentracija MDA u serumu zabeležena je u neurodegenerativnim oboljenjima, a primećena je i u aktivnim lezijama pacijenata obolelih od MS-a i u cerebrospinalnoj tečnosti PB pacijenata (Rojo i sar., 2014).

Osim što direktno oštećuju ćelijske komponente, ROS i RNS utiču i na signalnu transdukciju. Ove reaktivne vrste mogu da modulišu gensku ekspresiju, tako što aktiviraju kinaze ili inhibiraju fosfataze koje su važne za prenos signala (Rojo i sar., 2014). Pored toga, ROS i RNS mogu uticati i na transkripcione faktore. Tokom aktivacije mikroglije najznačajniji je efekat koji ovi molekuli ostvaruju na NF- $\kappa$ B i nuklearni respiratorni faktor 2 (NRF2). Pretpostavlja se da ROS aktiviraju I $\kappa$ B kinaze ili inhibiraju tirozin fosfataze, što dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B. ROS aktiviraju i NRF2 za koji se pretpostavlja da učestvuje u smanjenju aktivacije mikroglije i vraćanju ćelija u redoks homeostazu (Nayernia i sar., 2014).

Ćelije imaju endogene mehanizme odbrane protiv oksidativnog stresa. Enzimi koji detoksifikuju slobodne radikale su, između ostalih, SOD, enzim koji katalizuje redukciju  $\bullet\text{O}_2^-$  do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalaza (CAT) koja katalizuje prevođenje  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}$ , kao i enzimi koji učestvuju u metabolizmu glutationa – glutation reduktaza (GR) i glutation peroksidaza (GPx) (Uttara i sar., 2009).

S obzirom na to da neutrališu  $\bullet\text{O}_2^-$ , porodica SOD enzima predstavlja prvu liniju odbrane ćelija protiv oksidativnog stresa. Različite izoforme ovog enzima su raspoređene u različitim odeljcima u ćeliji: SOD1 (Cu,ZnSOD) nalazi se u citoplazmi, SOD2 (MnSOD) u mitohondrijama, dok je SOD3 lokalizovana u vanćelijskom prostoru (Johnson i Giulivi, 2005). Mutacije u genima za SOD dovode do povećanog oksidativnog stresa u različitim organizmima (Fridovich, 1997). SOD1 i SOD2 dovedene su u vezu sa brojnim neurodegenerativnim oboljenjima. Tako je kod transgenih miševa koji ne ekspimiraju SOD2 pokazano značajno veće prisustvo A $\beta$  plaka (Li i sar., 2004), dok su povećana oligomerizacija A $\beta$  i gubitak memorije pokazani i kod transgenih miševa koji ne ekspimiraju SOD1 (Murakami i sar., 2011). Mutacije u genu za SOD1 identifikovane su i kod familijarnog oblika ALS-a (Rosen i sar., 1993). U mikrogliji, ekspresija SOD2 raste posle tretmana LPS-om i dovodi se u vezu sa povećanom produkcijom NO (Sugaya i sar., 1997). Pokazano je da povećana ekspresija SOD2 i SOD1 u LPS-om stimulisanim kulturama mikroglije štiti ćelije od oksidativnog stresa i predstavlja unutrašnji odbrambeni sistem (Kaneko i sar., 2012). Regulatorni delovi gena za SOD pod kontrolom su nekoliko transkripcionih faktora, od kojih je NF- $\kappa$ B najvažniji za transkripciju SOD1 i SOD2 (Rojo i sar., 2004; Storz i sar.,

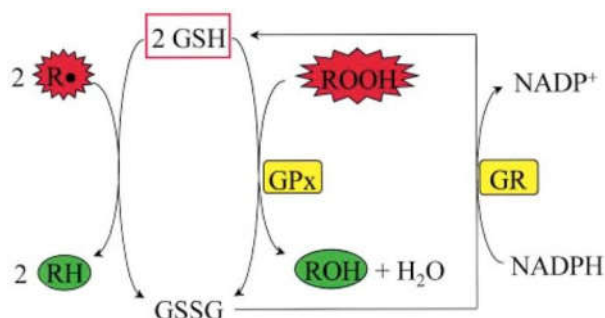
2005; Morgan i Liu, 2011), dok je NRF2 važan za transkripciju SOD3 (Rojo i sar., 2014, Gan i Johnson, 2014). Iako aktivacija NF- $\kappa$ B dovodi do sinteze pretežno proinflamatornih medijatora, zabeleženo je i da indukuje ekspresiju antioksidativnih enzima. Pretpostavlja se da je u pitanju endogeni mehanizam odbrane koji sprečava smrt ćelije (Morgan i Liu, 2011). Sa druge strane, NRF2 je važan regulator redoks homeostaze u ćelijama koji se aktivira u odgovoru na ROS i RNS i pokreće sintezu antioksidanasa (Rojo i sar., 2014).

Vodonik-peroksid nastao aktivnošću SOD biva detoksifikovan u reakciji koju katalizuje CAT, pri čemu nastaje voda. CAT je uglavnom lokalizovana u peroksizomima ćelija (Sena i Chandel, 2012). Pretpostavlja se da CAT nije neophodna za preživljavanje u normalnim uslovima, s obzirom na to da se miševi sa nokautiranim genom za CAT normalno razvijaju. Kod ovih miševa je ipak, primećena smanjena efikasnost mitohondrijske respiracije u uslovima oksidativnog stresa, pa je zaključeno da CAT ima važnu ulogu u oksidativnoj odbrani (Ho i sar., 2004). Takođe, pokazano je da je povećan nivo CAT neuroprotektivan, a narušena funkcija ovog enzima povećava podložnost prema razvijanju oštećenja u animalnim modelima za AB i moždani udar (Clausen i sar., 2012; Baker i sar., 1998). Poznato je da NRF2 aktivira transkripciju CAT (Gan i Johnson, 2014), a postoje indicije da je i NF- $\kappa$ B uključen u regulaciju ekspresije ovog enzima (Zhou i sar., 2001; Schreiber i sar., 2006).

Glutation je glavni neenzimski antioksidans u mozgu sa ključnom ulogom u održavanju redoks homeostaze. Glutation je tripeptid koga sintetišu  $\gamma$ -glutamyl-cistein sintetaza i glutathion sintetaza, uz potrošnju dva molekula ATP-a (Dringen i sar., 2000). Mikroglialne ćelije ispoljavaju više koncentracije glutathiona od astrocita i neurona, što ukazuje na postojanje sopstvenog mehanizma odbrane od ROS i RNS (Hirrlinger i sar., 2000). Postoji nekoliko načina na koji glutathion obavlja svoje funkcije (Slika 4). Glutation neenzimski redukuje  $\cdot\text{O}_2^-$ , NO, ONOO $^-$  i druge reaktivne vrste i donor je elektrona u reakciji redukcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  i drugih peroksida koju katalizuje GPx. U mozgu je GPx daleko zastupljeniji od CAT koja katalizuje istu reakciju, što navodi na zaključak da je ovo glavni put detoksifikacije  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pri čemu nastaje voda. Uz to, redukovani oblik glutathiona (GSH) oksiduje se do glutathion disulfida (GSSG), GSH se obnavlja u reakciji koju katalizuje GR, pri čemu je NADPH davalac elektrona. GSH moduliše



različite funkcije proteina formirajući disulfidne mostove između tiolnih grupa proteina, što ih štiti od oksidacije. On deluje kao kofaktor u reakcijama izomerizacije, predstavlja transportni i skladišni sistem za cistein, a može da funkcioniše i kao neuromodulator (Aoyama i sar., 2008). Glutation se u ćelijama nalazi u citoplazmi, mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i jedru. U fiziološkim uslovima ima daleko više GSH u odnosu na GSSG (100:1), ali ovaj odnos se značajno menja u uslovima oksidativnog stresa ili apoptoze (Circu i Aw, 2010).



**Slika 4. Glutation kao antioksidans.** GSH neenzimski redukuje slobodne radikale (R•), a ujedno je i donor elektrona u redukciji peroksida (ROOH) koju katalizuje GPx. GSH se regeneriše iz oksidovanog GSSG oblika u reakciji koju katalizuje GR, gde je NADPH donor elektrona. Preuzeto iz Dringen i sar., 2000.

Sadržaj glutaciona u mikrogliji smanjuje se posle aktivacije, što je dovedeno u vezu sa povećanom NO produkcijom. Pretpostavlja se da ćelije koriste GSH kao zaštitu od indukovanoeg oksidativnog i nitrozativnog stresa (Chatterjee i sar., 2000; Moss i Bates, 2001). Takođe, pokazano je da smanjeni nivo GSH dovodi do oksidativnog stresa i inflamatornog odgovora (Lee i sar., 2010a), dok je indukcija sinteze GSH povezana sa smanjenim oslobađanjem proinflamatornih faktora (Lee i sar., 2010b; Kim i sar., 2009). Može da se zaključi da je sadržaj glutaciona u bliskoj vezi sa aktivacijom mikroglije, što podrazumeva bitnu ulogu u hroničnoj inflamaciji prisutnoj kod neurodegenerativnih oboljenja.

## **5. Signalni putevi u aktivaciji mikroglije**

Tokom aktivacije mikroglije dolazi do aktivacije nekoliko signalnih kaskada i transkripcionih faktora regulišu transkripciju proinflamatornih molekula i enzima koji dovode do njihove produkcije. Među njima važnu ulogu imaju MAPK i PI3K/Akt signalne kaskade i NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor.

### **5.1. MAPK signalne kaskade**

MAPK signalnu kaskadu čini velika mreža kinaza koje prenose, amplifikuju i integrišu signale koje ćelije primaju iz spoljašnje sredine. Kod sisara MAPK regulišu ćelijsko sazrevanje, diferencijaciju, proliferaciju, a mogu indukovati i inflamaciju i apoptozu. Pogrešna regulacija aktivnosti MAPK je dovedena u vezu sa brojnim patološkim stanjima, uključujući i neurodegenerativna oboljenja. MAPK familiju čine 4 različite kinazne kaskade: ERK, JNK, p38 MAPK i velika MAPK 1 označena i kao ERK5 (Weston i sar., 2002; Zhou i sar., 1995).

MAPK su regulisane putem fosforilacionih kaskada, gde dve ushodne kinaze (MAP kinaze kinaza kinaza (MAPKKK) i MAP kinaze kinaza (MAPKK)) fosforilacijom aktiviraju MAPK koje zatim fosforilišu i aktiviraju svoje supstrate (Pearson i sar., 2001). To dovodi do aktivacije transkripcionih faktora, ko-aktivatora i nukleozomskih proteina u vezi sa transkripcijom odgovarajućih gena. Geni koje aktiviraju MAPK su geni ranog odgovora, za čiju indukciju nije neophodna prethodna translacija i u direktnoj su vezi sa unutarćelijskim signalnim kaskadama, što omogućava njihovu brzu aktivaciju (Hazzalin i Mahadevan, 2002).

#### **5.1.1. ERK signalna kaskada**

Signalna kaskada ERK aktivira se u odgovoru na mitogene i faktore rasta i u vezi je sa ćelijskom proliferacijom i preživljavanjem. Sa druge strane, ERK se aktiviraju i pod uticajem proinflamatornih stimulusa, uključujući LPS i druge PAMP i DAMP molekule. Dakle, ERK signalna kaskada igra važnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru i inflamaciji (Kyriakis i Avruch, 2012).

U mozgu su široko rasprostranjene dve izoforme ERK-a: p44 MAPK (ERK1) i p42 MAPK (ERK2) (Ortiz i sar., 1995). Aktivaciju ERK1/2 započinje Ras - GTP-vezujući protein, koji potom aktivira Raf kinazu koja pripada MAPKKK familiji. Raf kinaza fosforiliše MEK1/2 (MAPKK familija), koje zatim fosforilišu ERK1 i ERK2 (Kyriakis i Avruch, 2001). Aktivirane ERK1 i ERK2 potom fosforilišu različite proteine u citoplazmi i jedru. Glavni transkripcioni faktori koje ERK aktiviraju su Elk1 koji aktivira c-Fos, zatim c-Myc, c-Jun, aktivacioni transkripcioni factor 2 (ATF2) i CREB (Koistinaho i Koistinaho, 2002).

U neurodegenerativnim bolestima, kao što su AB, PB i ALS, dolazi do aktivacije ERK-a u mikrogliji što se dovodi u vezu sa pogoršanjem inflamacije (Koistinaho i Koistinaho, 2002). Takođe je pokazano da stimulacija mikroglije u kulturi LPS-om dovodi do aktivacije ERK kaskade koja potom pokreće oslobađanje NO i TNF- $\alpha$  (Pyo i sar., 1998; Bhat i sar., 1998). Kod pacijenata koji su pretrpeli moždani udar aktivacija ERK-a je zabeležena u mikrogliji, kao i astrocitima, neuronima i endotelnim ćelijama (Slevin i sar., 2000). Takođe, pokazano je da molekuli koji se otpuštaju u vanćelijski prostor posle povrede mozga, CD40 ligand, ATP i trombin, indukuju ERK aktivaciju (Tan i sar., 2000; Hide i sar., 2000; Ryu i sar., 2000).

### **5.1.2. JNK signalna kaskada**

Signalna kaskada JNK uključena je u različite fiziološke i patološke događaje, kao što su rast i diferencijacija ćelija, inflamacija i apoptoza. Konačni ishod aktivacije JNK zavisi od fiziološkog konteksta, tipa ćelija, prirode i trajanja stimulusa i drugih signalnih puteva koji se aktiviraju (Butterfield i sar., 1999). JNK signalnu kaskadu aktiviraju različiti stresni i inflamatorni stimulusi, kao što su oksidativni stres, slobodni radikali, ishemija, nedostatak trofičkih faktora i citokini (Ip i Davis, 1998; Mielke i Herdegen, 2000).

Porodicu JNK čine tri izoforme: JNK1, JNK2 i JNK3. Signalnu kaskadu aktiviraju ushodne kinaze ASK1 (pripada MAPKKK porodici) i MKK4 i MKK7 (pripadaju MAPKK porodici). Kada se aktivira, JNK može da fosforiliše citoskeletne proteine (neurofilamente, tau protein, proteine povezane sa mikrotubulama), što ukazuje

na njegovu ulogu u održavanju integriteta i funkcije citoskeleta. Pokazano je da su ove kinaze bitne za izrastanje neurita, kao i za morfološke promene mikroglije posle aktivacije (Gelderblom i sar., 2004). JNK2 i JNK3 brzo prelaze iz citoplazme i aktiviraju nekoliko transkripcionih faktora, kao što su c-Jun, ATF2 i Elk-1 (Waetzig i Herdegen, 2004).

Aktivacija JNK-a u CNS-u dovedena je u vezu sa različitim patološkim stanjima, kao što je PB (Saporito i sar., 2000; Crocker i sar., 2001), AB (Masuda i sar., 2001; Morishima i sar., 2001), a uočena je i nakon ekscitotoksičnosti indukovane kainatom (Yang i sar., 1997). Smatra se da su štetni efekti aktivacije JNK-a u vezi sa njihovim dejstvom na ciljni protein, jer uglavnom podstiču patološke, a inhibiraju zaštitne procese u ćeliji. Tako aktivirane JNK učestvuju u oslobađanju citohroma c što dovodi do apoptoze, dok sa druge strane inhibiraju antiapoptotsku familiju proteina Bcl-2. Smatra se da aktivacija transkripcionih faktora kao što je c-Jun dovodi do degenerativnih efekata u CNS-u (Waetzig i Herdegen, 2004). Takođe je pokazano je da JNK igraju ulogu u aktivaciji mikroglije. JNK se brzo aktiviraju u mikroglijskim ćelijama stimulisanim LPS-om, TNF- $\alpha$  i trombinom, i učestvuju u uvećanju ćelijskog tela i transkripciji proinflamatornih gena koji dovode do sinteze COX-2, TNF- $\alpha$ , proteina hemoatraktanta monocita 1 (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) i IL-6 (Waetzig i sar., 2005). Stoga, inhibicija JNK signalne kaskade u mikrogliji smanjuje inflamaciju i može sprečiti oštećenje susednih neurona.

### **5.1.3. Signalna kaskada p38 MAPK**

Signalna kaskada p38 MAPK aktivira se u odgovoru na brojne proinflamatorne stimulse kao što su citokini, patogeni i oksidativni stres, ali je takođe uključena u ćelijski ciklus, rast i diferencijaciju (Kyriakis i Avruch, 2012; Koistinaho i Koistinaho, 2002).

Postoje četiri izoforme p38 MAPK, sa oznakama p38 $\alpha$ - $\delta$ . Geni koji kodiraju za izoforme p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  aktivni su u svim ćelijama, p38 $\gamma$  je u najvećoj meri eksprimiran u skeletnim mišićima, a p38 $\delta$  u plućima, testisima, pankreasu i tankom crevu. U inflamatornom odgovoru imunskih ćelija, makrofaga i mikroglije, najvažniju ulogu ima

izoforma p38 $\alpha$  koja prevashodno biva fosforilisana (Koistinaho i Koistinaho, 2002). Aktivacija signalne kaskade p38 MAPK počinje aktivacijom ASK1, kinaze koju aktivira TGF- $\beta$  1 ili TAO kinaza koje pripadaju MAPKKK porodici. Ove kinaze fosforilišu MEK3 i MEK6 (MAPKK porodica) koje potom aktiviraju p38 MAPK (Kaminska, 2005). Kada su aktivirane p38 MAPK mogu da fosforilišu MAPKAP 2 i 3 koje dalje fosforilišu protein toplotnog šoka HSP27. Kada pređu u jedro p38 MAPK aktiviraju ATF2, MEF2A/C (*engl.* myocyte enhancer factor 2A/C) i stresom aktivirani protein 1a (SAP1a), koji učestvuju u formiranju transkripcionog faktora AP-1 (Koistinaho i Koistinaho 2002; Kyriakis i Avruch, 2001). Pokazano je da aktivacija p38 MAPK učestvuje u indukciji ekspresije IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 i iNOS što ukazuje na važnu ulogu u inflamaciji (Lee i sar., 1994; Lee i sar., 2000; Da Silva i sar., 1997; Ridley i sar., 1997).

Kao i ERK i JNK, p38 MAPK signalna kaskada je dovedena u vezu sa inflamacijom koja je u osnovi različitih patologija CNS-a. Aktivacija p38 MAPK u mikrogliji je pokazana kod transgenih miševa koji eksprimiraju humani protein prekursor  $\beta$ -amiloida (Koistinaho i sar., 2002). Slično je pokazano i u kulturi mikrogljijskih ćelija koje su tretirane sa A $\beta$ , što ukazuje da p38 MAPK igra ulogu u patofiziološkim procesima u AB (Pyo i sar., 1998). Tretman mikrogljijskih ćelija LPS-om takođe aktivira p38 MAPK, što je dovedeno u vezu sa produkcijom proinflamatornih medijatora, kao što su TNF- $\alpha$ , PGE-2 i NO (Svensson i sar., 2011; Yoshino i sar., 2011; Matsui i sar., 2010).

## **5.2. PI3K/Akt signalni put**

PI3K/Akt signalni put ima važnu ulogu u ćelijskom preživljavanju, diferencijaciji i proliferaciji. Akt (PKB) je serin/treonin protein kinaza koju kodiraju tri različita gena,  $\alpha$  (PKB $\alpha$ ),  $\beta$  (PKB $\beta$ ) i  $\gamma$  (PKB $\gamma$ ), koji nose informacije za tri različite izoforme, redom Akt1, Akt2 i Akt3. Sve tri izoforme imaju sličnu strukturu koja se sastoji od N-terminalnog plekstrin homolognog (PH) domena, centralnog serin/treonin katalitičkog domena i malog regulatornog domena na C-terminusu (Liu i sar., 2009).

Aktivaciju PI3K započinje signalizacija preko receptora povezanih sa proteinima G i tirozin kinaznih receptora koji prenose širok spektar signala iz vanćelijske sredine. PI3K fosforiliše membranski lipid, fosfatidilinozitol (4,5)-bifosfat (PIP<sub>2</sub>), dajući sekundarni glasnik fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> zatim aktivira Akt što je omogućeno njegovom translokacijom iz citoplazme do ćelijske membrane pri čemu dolazi do konformacione promene i fosforilacije dva kritična aminokiselinska ostatka (Jha i sar., 2015) koji su neophodni za punu aktivaciju (Alessi i sar., 1996). Akt zatim aktivira brojne supstrate važne za regulaciju fizioloških procesa, među kojima su kinaza 3 glikogen sintaze, NF-κB i familija transkripcionih faktora označena kao FOXO (*engl.* forkhead family of transcription factors) (Cross i sar., 1995; Kitagishi i Matsuda, 2013; Jha i sar., 2015). Pokazano je da stimulacija LPS-om dovodi do fosforilacije i aktivacije Akt kinaze i pretpostavlja se da Akt učestvuje u aktivaciji mikroglije putem aktivacije NF-κB (Jayasooriya i sar., 2014, Yu i sar., 2015; Lo i sar., 2015).

### **5.3. NF-κB transkripcioni faktor**

NF-κB transkripcioni faktor je prvi put opisan kao nuklearni faktor koji stimuliše transkripciju κ lakog lanca antitela u B limfocitima, vezujući se za regulatornu sekvencu gena (Sen i Baltimore, 1986). Danas se zna da je NF-κB prisutan u skoro svim ćelijskim tipovima i da reguliše ekspresiju ogromnog broja različitih gena uključenih u ćelijski rast, deobu, diferencijaciju, preživljavanje i apoptozu. Posebno važna uloga ovog transkripcionog faktora je u imunskom odgovoru i inflamaciji (Morgan i Liu, 2011).

Pet članova čini porodicu NF-κB proteina: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50, p52. Ovi proteini formiraju homodimere ili heterodimere, vezuju se za ciljne sekvence i mogu da ostvare pozitivan ili negativan uticaj na transkripciju gena. Svi članovi NF-κB porodice imaju Rel homologni domen na N-terminusu i tako ostvaruju vezu sa DNK. Međutim samo p65, RelB i c-Rel imaju transaktivacione domene na C-terminusu i mogu da iniciraju transkripciju. Proteini p50 i p52 formiraju heterodimere sa subjedinicama koje imaju transaktivacione domene i tako mogu da iniciraju transkripciju. Takođe, p50 i p52 homodimeri mogu negativno da utiču na transkripciju tako što kompetiraju sa drugim dimerima za κB vezujuća mesta (Hayden i Ghosh, 2012).

NF- $\kappa$ B dimeri se nalaze u citoplazmi, u kompleksu sa inhibitornom subjedinicom označenom kao I $\kappa$ B. Kada ćelija primi odgovarajući signal aktivira se I $\kappa$ B kinazni kompleks (IKK) koga čine dve aktivne kinaze IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ , kao i regulatorna subjedinica IKK $\gamma$ . Kinaze fosforilišu I $\kappa$ B proteine što dovodi do njihove degradacije u proteazomu i oslobađanje NF- $\kappa$ B dimera koji prelaze u jedro. NF- $\kappa$ B signalni putevi su grubo podeljeni na kanonski (klasični) i nekanonski (alternativni). Kanonski put aktivacije se uključuje po aktivaciji receptora za citokine, TLR4, receptora za antigene i drugih i dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B dimera koje pretežno čini p65 subjedinica. Alternativni put aktivira manji broj signalnih molekula, kao što su CD40, limfotoksin B i aktivacioni faktor B limfocita, pri čemu dolazi do formiranja p100/RelB kompleksa (Oeckinghaus i sar., 2011).

NF- $\kappa$ B reguliše veliki broj gena u CNS-u. Njegova uloga zavisi od ćelijskog konteksta i stanja u kome se tkivo nalazi. Za razliku od glijskih i drugih ćelija, NF- $\kappa$ B je u jedru neurona konstitutivno aktivan. Pretpostavlja se da je ova bazalna aktivnost u vezi sa sinaptičkom transmisijom. Takođe je primećena inducibilna aktivnost NF- $\kappa$ B u citoplazmi neurona, u presinaptičkim i postsinaptičkim regionima (O'Neill i Kaltschmidt, 1997). Smatra se da NF- $\kappa$ B ima važnu ulogu u translaciji informacija koje neuroni primaju preko sinapsi i da je važan za formiranje memorije, kogniciju i ponašanje (Kaltschmidt i Kaltschmidt, 2009). Sa druge strane, u glijskim ćelijama je zabeležena inducibilna aktivnost NF- $\kappa$ B u vezi sa patološkim stanjima CNS-a. Kao što je već pomenuto, različiti proinflamatorni molekuli, kao što su citokini, slobodni radikali, LPS, A $\beta$  i drugi, mogu da dovedu do aktivacije NF- $\kappa$ B u mikroglijskim ćelijama. NF- $\kappa$ B u ovim ćelijama reguliše veliki broj gena čiji su produkti mahom proinflatorne prirode (proinflatorni citokini, iNOS, COX-2), ali ima i onih koji ostvaruju protektivno dejstvo u CNS-u (SOD2, IL-10). Aktivacija NF- $\kappa$ B u astrocitima takođe indukuje ekspresiju iNOS-a, kao i brojnih citokina i hemokina koji pogoršavaju inflamatorno stanje. Tako aktivacija NF- $\kappa$ B može indirektno da dovede do smrti neurona (Mattson i Camandola, 2001).

NF- $\kappa$ B ima dvojnju ulogu u neurodegenerativnim oboljenjima. Sa jedne strane, NF- $\kappa$ B indukuje ekspresiju anti-apoptotskih gena u neuronima i tako podstiče njihovo preživljavanje, dok sa druge strane doprinosi neurodegeneraciji, jer indukuje sintezu

inflamatornih medijatora u glijskim ćelijama, prevashodno u mikrogliji. Značaj NF- $\kappa$ B aktivacije pokazan je u ishemiji (Schneider i sar., 1999), traumatskoj povredi mozga (Sullivan i sar., 1999), AB (Lukiw i sar., 1998), PB (Hunot i sar., 1997), MS (Bonetti i sar., 1999) i drugim patologijama CNS-a.

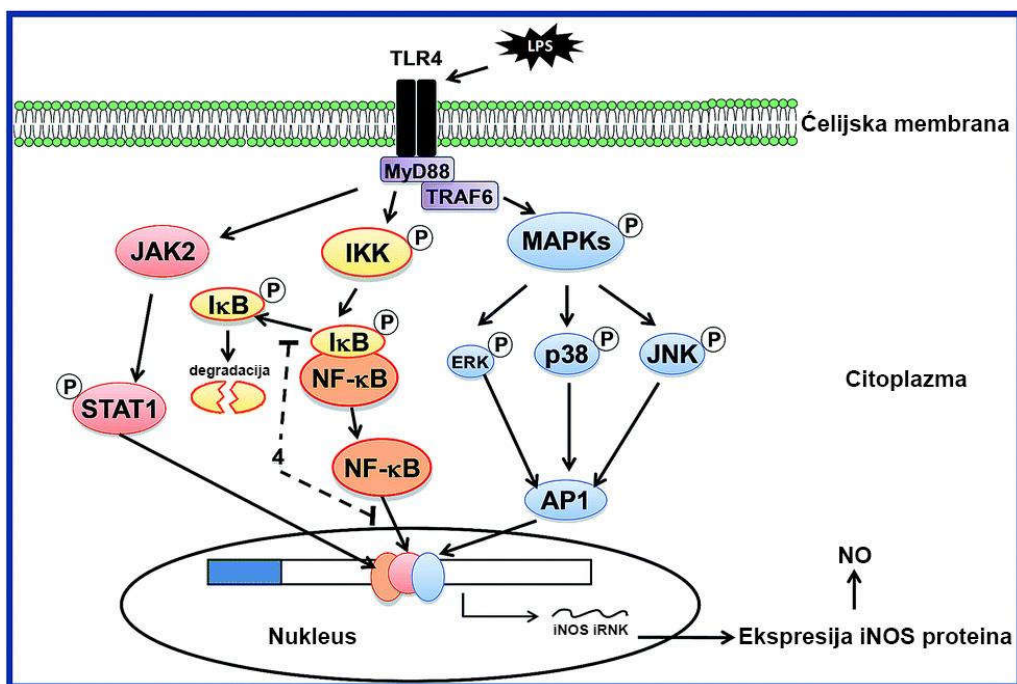
## **6. Stimulacija LPS-om kao model aktivacije mikroglijskih ćelija u kulturi**

Kulture mikroglijskih ćelija predstavljaju veoma koristan model sistem za izučavanje mikroglije, s obzirom na to da se mnogi parametri aktivacije ne mogu odrediti u *in vivo* sistemu. *In vitro* kultura mikroglijskih ćelija doživela je procvat kao eksperimentalni model pošto su Giulian i Baker (Giulian i Baker, 1986) uspostavili metodu koja je omogućila dobijanje mešovutih kultura glijskih ćelija iz moždane kore novorođenih životinja. Iz mešovutih kultura se izdvajaju ćelije mikroglije i dalje gaje i proučavaju. Dobijanje primarne mikroglijske kulture je dugotrajan proces koji zahteva veliki broj eksperimentalnih životinja. Stoga je razvijeno nekoliko imortalizovanih ćelijskih linija mikroglije koje omogućuju istraživačima da rade sa velikim brojem ćelija u kraćem vremenskom periodu. U upotrebi su BV-2 i N9 ćelijske linije imortalizovane retrovirusima, poreklom iz miša, HMO6 ćelijska linija poreklom iz čoveka, kao i spontano imortalizovane HAPI i EOC ćelije. BV-2 ćelijska linija je dobijena imortalizacijom mikroglijskih ćelija izolovanih iz C57BL/6 miševa (Blasi i sar., 1990). S obzirom na to da je funkcionalno veoma slična primarnoj mikrogliji, ova ćelijska linija se često koristi u istraživanjima koja se bave aktivacijom mikroglije u kontekstu neurodegenerativnih oboljenja, ali i pronalaženju efikasnih terapeutika (Henn i sar., 2009).

LPS je jedna od najbolje proučenih imunostimulatornih komponenti ćelijskog zida bakterija, koja uspešno aktivira mikroglijske ćelije. LPS se vezuje za koreceptor CD14 koji omogućava transport do TLR4/MD-2 receptorskog kompleksa čime se pokreće unutarćelijska signalna kaskada (Lu i sar., 2008). LPS izaziva brze odgovore mikroglijskih ćelija, karakteristične za patogenezu neurodegenerativnih oboljenja, dolazi do aktivacije signalnih puteva MAPK i NF- $\kappa$ B i produkcije proinflamatornih citokina i slobodnih radikala. Stoga se stimulacija LPS-om koristi za aktivaciju



mikroglije u *in vitro* uslovima (Block i sar., 2007; Hanisch, 2002; Kloss i sar., 2001). Glavni događaji koji se odvijaju u mikrogliji posle stimulacije LPS-om su prikazani na Slici 5.



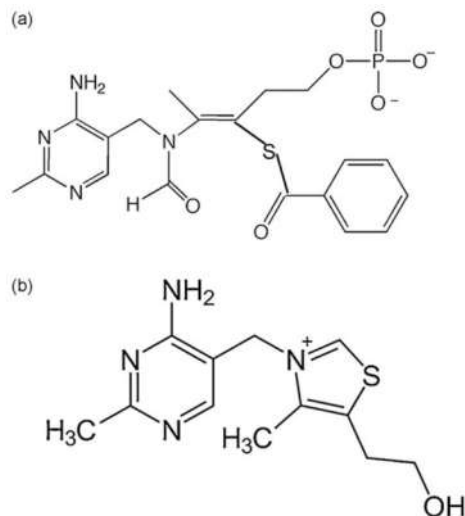
**Slika 5. Signalni putevi aktivirani u mikrogliji posle stimulacije LPS-om.** Pojedini učesnici u signalizaciji nisu predstavljani zbog jednostavnosti. Preuzeto iz Hegazy i sar., 2015.

## 7. Terapijski potencijal benfotiamina

Kao što je prethodno navedeno, preterana i/ili hronična aktivacija mikroglije je jedan od ključnih događaja u patološkim procesima skoro svih neurodegenerativnih stanja. Stoga se stalno traga za jedinjenjima koja imaju potencijal da regulišu mikroglijsku aktivaciju, u cilju smanjenja neuroinflamacije.

Benfotiamin (S-benzoiltiamin O-monofosfat) je sintetički S-acil derivat vitamina B1 (tiamina). Benfotiamin se često opisuje kao lipidni analog tiamina, mada je pokazano da je praktično nerastvoran u organskim rastvaračima (Volvvert i sar., 2008). Za razliku od tiamina, benfotiamin ima otvoreni tiazolski prsten koji mu omogućava da lakše prolazi kroz ćelijsku membranu (Slika 6, Balakumar i sar., 2010). S obzirom na to

da ima veću biološku rapoloživost od tiamina, često se koristi kao njegova zamena u stanjima koje se odlikuju nedostatkom vitamina B1 (Hammes i sar., 2003; Wu i Ren, 2006; Balakumar i sar., 2010). Takođe, sve veći broj studija ukazuje na povoljno dejstvo benfotiamina u patološkim stanjima koja nisu prouzrokovana nedostatkom tiamina (Balakumar i sar., 2008; Schmid i sar., 2008; Yadav i sar., 2009; Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012; Verma i sar., 2010; Harisa, 2013).



**Slika 6. Strukturne formule benfotiamina (a) i tiamina (b).**

Osim što ima važnu ulogu kao prekursor koenzima u metabolizmu šećera i aminokiselina, tiamin ima i druge funkcije u CNS-u (Ba, 2008). Nedostatak tiamina u CNS-u dovodi do promena u funkciji mitohondrija, oštećenja neurona i krvno-moždane barijere, disfunkcije astrocita i inflamacije (Ke i sar., 2003). Nedostatak tiamina je zabeležen kod više različitih oboljenja koje karakteriše gubitak neuronalne funkcije, kao što su Vernike-Korsakovljev sindrom, AB, MS, ALS i PB (Jhalla i Hazell, 2011). Takođe je pokazano da nedostatak tiamina u CNS-u prati aktivacija mikroglije (Wang i Hazell, 2010).

Posle oralne administracije, ekto-alkalne fosfataze u digestivnom traktu defosforilišu benfotiamin do S-benzoiltiamina koji potom prolazi kroz membrane epitelijskih ćelija creva i dolazi do cirkulacije (Balakumar i sar., 2010). Eritrociti preuzimaju deo S-benzoiltiamina i prevode ga u slobodan tiamin. Dalje se S-

benzoiltiamin metaboliše u jetri do tiamina i benzoeve kiseline pomoću tioesteraza. Pretpostavlja se da jetra otpušta višak tiamina u cirkulaciju (Volvvert i sar., 2008). Benfotiamin se lakše apsorbira u telu što pokazuju pet puta veće koncentracija tiamina u plazmi posle oralne primene benfotiamina u odnosu na ekvivalentne doze tiamina (Balakumar i sar., 2010). Osim tiamina, povećane koncentracije tiamin monofosfata i tiamin difosfata su zabeležene u plazmi i jetri (Volvvert i sar., 2008). Istraživanja u kojima je analizirana koncentracija tiamina i njegovih derivata u CNS-u posle oralne administracije benfotiamina pokazuju oprečne rezultate. Volvvert i sar. nisu registrovali povećane koncentracije ovih jedinjenja u mozgu miševa posle akutne i hronične (14 dana duge) primene benfotiamina (Volvvert i sar., 2008). Sa druge strane, Pan i sar. su pokazali povećanu koncentraciju tiamina u mozgu miševa posle hroničnog tretmana benfotiaminom koji je trajao 8 nedelja (Pan i sar., 2010). Takođe, u studiji koja je ispitala efekat tretmana benfotiaminom u periodu od 6 meseci pokazano je drastično povećanje koncentracije tiamin difosfata u mozgu pacova (Netzel i sar., 2000). Iz rezultata ovih studija se može zaključiti da dugotrajan tretman benfotiaminom najverovatnije dovodi do povećane koncentracije tiamina u mozgu.

Pokazano je da benfotiamin pomaže u lečenju neuropatija, nefropatija i retinopatija izazvanih dijabetesom (Hammes i sar., 2003; Stracke i sar., 2001; Stirban i sar., 2006). Benfotiamin blokira tri glavna biohemijska puta uključena u patogenezu hiperglikemije: put heksozamina, stvaranje krajnjih metabolita neenzimske glikozilacije i signalni put koji aktiviraju diacilglicerol i protein kinaza C. Pretpostavlja se da ovaj efekat benfotiamin ostvaruje jer povećava nivo tiamin difosfata u tkivu i time aktivira transketolazu (enzim u metaboličkom putu pentoza fosfata) koja prevodi gliceraldehid 3-fosfat i fruktozu 6-fosfat u pentoza 5-fosfate i druge šećere. Pored toga, benfotiamin smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B izazvanu hiperglikemijom (Hammes i sar., 2003). Takođe je pokazano da benfotiamin smanjuje oksidativna oštećenja korteksa izazvana dijabetesom (Wu i Ren, 2006), ubrzava oporavak dijabetičnog ishemičnog tkiva (Gadau i sar., 2006) i sprečava disfunkciju kontrakcije kardiomiocita kod dijabetičnih miševa (Ceylan-Isik i sar., 2006).

Prethodne studije su pokazale da benfotiamin može imati terapijski efekat kod pojedinih patoloških stanja CNS-a. Pored povoljnog dejstva koje ima u tretmanu

neuropatija izazvanih dijabetesom, benfotiamin može biti koristan i u lečenju alkoholnih neuropatija (Manzardo i sar., 2013), kao i u smanjenju inflamatornog i neuropatskog bola (Sanchez-Ramirez i sar., 2006). Benfotiamin je potencijalni terapeutik za AB, s obzirom na to da smanjuje formiranje amiloidnih plaka u animalnom modelu (Pan i sar., 2010) i inhibira sintezu A $\beta$  indukovanu glukozom u HEK293 ćelijama (Sun i sar., 2012). Osim toga, sve veći broj studija ukazuje na antiinflamatorna i antioksidativna svojstva benfotiamina (Ceylan-Isik i sar., 2006; Wu i Ren, 2006; Balakumar i sar., 2008; Schmid i sar., 2008; Schupp i sar., 2008; Yadav i sar., 2009; Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012; Verma i sar., 2010; Harisa, 2013). Benfotiamin smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B i posledična oksidativna i inflamatorna oštećenja i tako sprečava razvoj LPS-om indukovano uveitisa kod pacova (Yadav i sar., 2009). Istraživanja koja su pokazala da benfotiamin smanjuje aktivaciju makrofaga *in vitro*, inhibirajući aktivaciju NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih puteva, kao i produkciju proinflamatornih medijatora (Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012), ukazala su da bi ciljne ćelije njegovog dejstva u CNS-u mogle biti mikroglijske ćelije. S obzirom na povoljan efekat benfotiamina u različitim patološkim stanjima, njegov terapijski potencijal je i dalje u fokusu istraživanja.

## **II CILJEVI**

Neuroinflamacija je obeležje svih neuroloških poremećaja, od akutnih povreda i infekcija do hroničnih neurodegenerativnih oboljenja. Za većinu ovih oboljenja ne postoji odgovarajuća i efikasna terapija. Kako je aktivirana mikroglia glavni pokretač inflamacije, ona predstavlja jednu od glavnih terapijskih meta u lečenju različitih patoloških stanja CNS-a. Benfotiamin je bezbedan i efikasan analog vitamina B1 koji pokazuje antiinflamatorna i antioksidativna svojstva u različitim *in vivo* i *in vitro* sistemima, međutim, njegov uticaj na aktiviranu mikrogliju nije proučavan do sada. Shodno tome, glavni cilj ove disertacije bio je da se ispita antiinflamatorni i antioksidativni efekat benfotiamina na aktiviranu mikrogliju u *in vitro* sistemu, kao i unutarćelijska kaskada kojom benfotiamin ostvaruje svoje efekte. Efekti benfotiamina ispitivani su na BV-2 mikroglijskim ćelijama stimulisanim LPS-om, što predstavlja jedan od validnih modela mikroglijske aktivacije. Shodno tome, postavljeni su sledeći neposredni ciljevi:

1. Ispitati efekat benfotiamina na vijabilnost nestimuliranih i LPS-om stimuliranih BV-2 mikroglijskih ćelija.
2. Proceniti uticaj benfotiamina na morfologiju nestimuliranih i LPS-om stimuliranih BV-2 mikroglijskih ćelija.
3. Utvrditi antiinflamatorni potencijal benfotiamina analizom proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora aktivirane BV-2 mikroglije.
4. Ispitati antioksidativni potencijal benfotiamina u aktiviranim BV-2 mikroglijskim ćelijama.
5. Analizirati signalne mehanizme u osnovi aktivacije mikroglije i utvrditi efekat benfotiamina na ERK, JNK, p38 i PI3K/Akt signalne kaskade, kao i na aktivaciju NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora.

# **III MATERIJI I METODE**

## 1. Materijal

Korišćeni reagensi nabavljeni su od kompanije Sigma (Nemačka), osim ukoliko nije drugačije navedeno.

**Tabela 1. Rastvori i puferi**

Naziv	Sastav i proizvođač
0,2 M Fosfatni pufer	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, Nemačka) 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Nemačka) pH 7.4
PBS ( <i>engl.</i> phosphate buffer saline)	fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom: 50 ml 0,2 M fosfatnog pufera 8,7 g NaCl (Merck, Nemačka) dopuniti sa Mili-Q H <sub>2</sub> O do 1000 ml
4% paraformaldehid (PFA)	40 g paraformaldehida 500 ml dH <sub>2</sub> O 500 ml 0,2 M fosfatnog pufera 1 M NaOH pH 7.4
Pufer za vezivanje aneksina	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7.4
Grisov reagens	0,1% N-(naftil)-etilenediamin-dihidrohlorid (Fluka, Švajcarska) (A) 1% sulfanilamid u 2% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, Nemačka) (B) Pomešati jednake zapremine A i B
Rastvor moviola	9,6 g moviola (Calbiochem, EMD Millipore, SAD) 24 ml glicerola (Lach Ner, Češka)
Pufer za liziranje	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,1% natrijum dodecilsulfat (SDS) 10% glicerol pH 7.4



Rastvor luminola	Za 100 ml radnog rastvora: 1 ml luminola 0,44 ml p-kumarinske kiseline u DMSO 10 ml 1M Tris-HCl, pH 8.5 88,6 ml Mili-Q H <sub>2</sub> O
Gelovi za elektroforezu	Gel za razdvajanje: 5-10% akrilamid / bisakrilamid (29:1) 1,5 M Tris pH 8.8 10% SDS 10% amonijum persulfat 1% tetrametiletilendiamin  Gel za koncentrisanje: 4% akrilamid / bisakrilamid (29:1) 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8 10% SDS 10% amonijum persulfat 1% tetrametiletilen diamin
Pufer za uzorke (2× Lemli pufer)	Pred upotrebu dodati 3% beta-merkaptetanol (Bio-Rad, SAD)
Pufer za elektroforezu	192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3 0,1% SDS
Pufer za transfer proteina	20% metanol 192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3
TBST pufer	Tris pufer sa dodatkom deterdženta 50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% Tween pH 7.4
Ponceau S boja	Radni rastvor: 1% Ponceau S boja 5% glacijalna sirćetna kiselina

**Tabela 2. Sterilni reagensi za rad u kulturi ćelija**

Naziv	Sastav i proizvođač
10× PBS	Dulbecco-ov PBS bez Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup> (PAA Laboratories, Austrija)
1× PBS	900 ml sterilne vode 100 ml sterilnog 10× PBS bez Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup>
penicilin/streptomycin	smeša antibiotika penicilina i streptomicina, 10000 U/ml (Invitrogen, SAD)
FBS	serum fetusa govečeta ( <i>engl.</i> fetal bovine serum, FBS) (Invitrogen, SAD) inaktiviran zagrevanjem na 44 °C – 53 °C u periodu od 10 min
RPMI 1640 medijum za gajenje ćelija	RPMI 1640 medijum sa 25 mM HEPES-om i 2 mM L-glutaminom (Invitrogen, SAD) 10% FBS 1% penicilin/streptomycin
Radni rastvor tripsina	0,1% tripsin, 0,008% EDTA u PBS-u (Invitrogen, SAD)

**Tabela 3. Fluorescentne boje i fluorescentno obeleženi molekuli**

Naziv	Razblaženje	Proizvođač
Aneksin V	0,003 µg/µl	Santa Cruz
Propidijum jodid	0,015 µg/µl	Santa Cruz
Hoechst	0,025 µg/µl	Invitrogen
Faloidin	1:50	Invitrogen

**Tabela 4. Sterilni rastvori za izolaciju RNK i analizu genske ekspresije**

Naziv	Sastav i proizvođač
DEPC tretirana voda	dodati 1 ml 0,1% dietil-pirokarbonata (DEPC) u 1000 ml dH <sub>2</sub> O, promešati i autoklavirati
Ultra čista destilovana voda bez DNKaze i RNKaze	upH <sub>2</sub> O (Invitrogen, SAD)
Reagensi za izolaciju RNK	TRIzol® (Invitrogen, SAD); hloroform, (Zorka, Srbija); izopropanol (J.T. Baker, SAD); 75% etanol napravljen u DEPC tretiranoj vodi
TBE pufer (1×)	Tris-Borat-EDTA pufer (5×) 54 g Tris-a 27,5 g borne kiseline 20 ml 0,5 M EDTA dopuniti do 1 L sterilnom dejonizovanom vodom pH 8
Gel za razdvajanje RNK	1% agaroz (Bioline, Velika Britanija) u TBE puferu
Etidijum-bromid	Rastvor etidijum-bromida, koncentracija 0,5 µg/ml (Bio-Rad, SAD)
Komplet za DNKazni tretman	10× reakcioni pufer sa MgCl <sub>2</sub> DNKaza I/bez RNKaze 25 mM EDTA (Fermentas, Litvanija)
Komplet za sintezu cDNK	10× pufer za reverznu transkripciju 10× nasumični prajmeri za reverznu transkripciju 25× dNTP Miks (100 mM) MultiScribe™ Reverzna Transkriptaza (Applied Biosystems, SAD)
SYBR Green	<i>engl.</i> PCR Master Mix gene expression assay (Applied Biosystems, UK)

**Tabela 5. Primarna antitela korišćena za imunofluorescencu (IF), vestern blot (engl. western blot, WB) i protočnu citofluorimetriju (FACS)**

Specifičnost	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
iNOS	zec, poliklonsko	1:100 IF 1:500 WB	Abcam
NF-κB/p65	zec, poliklonsko	1:200 IF 1:2000 WB	Santa Cruz
fosfo-p44/42 MAPK (pERK)	zec, monoklonsko	1:2000 WB	Cell Signalling
p44/42 MAPK (ERK)	zec, monoklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
fosfo-SAPK/JNK	zec, monoklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
SAPK/JNK	zec, monoklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
fosfo-p38	zec, monoklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
p38	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
fosfo-Akt	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
Akt	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Cell Signalling
lamin B	koza, poliklonsko	1:1000 WB	Santa Cruz
β-tubulin	koza, poliklonsko	1:2000 WB	Santa Cruz
β-aktin	miš, monoklonsko	1:5000 WB	Sigma
kaspaza 3	zec, poliklonsko	1:1500 WB	Abcam
CD40	hrčak, monoklonsko	1:200 FACS	BD Pharmingen
COX-2	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Santa Cruz
MnSOD	zec, poliklonsko	1:5000 WB	Abcam
katalaza	zec, poliklonsko	1:5000 WB	Abcam
GPx	zec, poliklonsko	1:5000 WB	Abcam
GR	zec, poliklonsko	1:5000 WB	Abcam

**Tabela 6. Sekundarna antitela korišćena za imunofluorescencu (IF) i vestern blot (WB)**

Usmereno	Konjugovano sa	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
protiv zeca	Alexa Fluor 555	magarac	1:250 IF	Invitrogen
protiv zeca	peroksidazom rena (HRP)	magarac	1:5000 WB	Santa Cruz
protiv koze	peroksidazom rena (HRP)	magarac	1:5000 WB	Santa Cruz
protiv miša	peroksidazom rena (HRP)	miš	1:3000 WB	Dako

**Tabela 7. Lista korišćenih prajmera**

Ciljni gen	Sekvenca prajmera	Dužina (bp)	Temperatura vezivanja (°C)
TNF- $\alpha$	f GCCCACGTCGTAGCAAACCAC r GGCTGGCACCAGTGTGGTTGT	117	64
IL-6	f TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC r TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	76	60
IL-10	f GCTCTTACTGACTGGCATGAG r CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	105	60
iNOS	f GGTGTTCTTTGCTTCCATGCTAAT r GTCCCTGGCTAGTGCTTCAGA	106	60
PTGS2	f TTCAACACACTCTATCACTGGC r AGAAGCGTTTGCGGTACTIONCAT	271	64
CAT	f AGCGACCAGATGAAGCAGTG r TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG	181	64
SOD2	f CAGACCTGCCTTACGACTATGG r CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT	113	64
GPx	f AGTCCACCGTGTATGCCTTCT r GAGACGCGACATTCTCAATGA	105	64
GAPDH	f GTTGTCTCCTGCGACTTCA r TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	182	60
ACTB	f GGGCTATGCTCTCCCTCAC r GATGTCACGCACGATTTC	136	63

**Tabela 8. Primarna i sekundarna antitela korišćena za enzimski imunološki esej (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)**

Specifičnost	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
TNF- $\alpha$ (primarno)	hrčak, monoklonsko	1:1000	eBioscience
TNF- $\alpha$ (sekundarno)	zec, poliklonsko	1:1000	eBioscience
IL-6 (primarno)	zec, poliklonsko	1:100	PeptoTech
IL-6 (sekundarno)	zec, poliklonsko	1:200	PeptoTech
IL-10 (primarno)	zec, poliklonsko	1:100	PeptoTech
IL-10 (sekundarno)	zec, poliklonsko	1:200	PeptoTech

## 2. Metode

### 2.1. Kultura mikrogljijskih ćelija

Imortalizovane ćelijske linije se često koriste u istraživanjima mikrogljijske, jer je za dobijanje dovoljnog broja mikrogljijskih ćelija u primarnoj kulturi potreban veliki broj eksperimentalnih životinja. U ovoj disertaciji eksperimenti su rađeni na BV-2 mikrogljijskoj ćelijskoj liniji. Ova linija je razvijena u laboratoriji Dr Blasi (Blasi i sar., 1990), infekcijom primarne kulture mikrogljijskih ćelija C57BL/6 miševa sa J2 retrovirusom koji sadrži *v-raf* i *v-myc* onkogene. BV-2 mikrogljijske ćelije dele morfološke, fenotipske i funkcionalne karakteristike sa primarnom mikrogljijskom (Blasi i sar., 1990, Henn i sar., 2009). Ova ćelijska linija dobijena je od dr Albe Mineli sa Univerziteta u Perudi u Italiji.

BV-2 ćelije gajene su u sterilnim flaskovima u RPMI 1640 medijumu za ćelije (Tabela 2), u inkubatoru sa vlažnom atmosferom i 5% CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37 °C. Medijum je menjan na svaka 2 dana, a konfluentnost je proveravana pod mikroskopom. Po dostizanju 70%-80% konfluentnosti ćelije su presađivane u novi flask ili u odgovarajuće posude za eksperiment. Ovaj procenat konfluentnosti je odabran jer su ćelije u logaritamskoj fazi rasta tokom koje eksponencijalno proliferišu.

#### 2.1.1. Tripsinizacija i određivanje broja ćelija

Mikrogljijske ćelije adheriraju na podlogu, pa je neophodna upotreba proteolitičkih enzima koji raskidaju veze koje ćelije formiraju sa podlogom i međusobno. U ove svrhe se najčešće koristi tripsin, a proces se naziva tripsinizacija. Medijum je prosipan iz flaskova u kojima su ćelije gajene, a zatim su flaskovi isprani PBS-om da bi se odstranile mrtve ćelije i zaostali medijum. Ovaj korak je posebno bitan zbog odstranjivanja FBS-a koji je sastavni deo medijuma, a ujedno i inhibitor tripsina. Posle ispiranja, u flask je sipano 3 ml radnog rastvora tripsina (Tabela 2) koji u sebi sadrži i EDTA. Posle 5 minuta inkubacije na 37 °C (temperatura na kojoj je najveća aktivnost tripsina) pod mikroskopom je proveravano da li su se ćelije odlepile, a potom je dodato 10 ml svežeg medijuma sa 10% FBS, čime je delovanje tripsina prekinuto. Suspenzija ćelija je prebačena iz flaskova u tube zapremine 50 ml i centrifugirana 5 minuta na 1000 ×

g. Pošto je supernatant odliven, talog ćelija je resuspendovan u 5 ml svežeg medijuma i određen je ukupan broj ćelija.

Alikvot suspenzije ćelija je pomešan sa 0,4% rastvorom tripan plavog u odnosu 1:1 i sipan u Neubauer komoricu za brojanje ćelija. Tripan plavo je boja koja prodire u mrtve ćelije sa narušenim integritetom membrane, dok kroz membranu živih ćelija ne može da prođe. Stoga se prilikom brojanja može napraviti gruba procena vijabilnosti ćelija. Svaka Neubauer komorica ima 2 regiona sa po 9 ugraviranih kvadrata koji zauzimaju zapreminu od 0,1  $\mu$ l. Broj ćelija po mililitru je izračunat po sledećoj formuli: broj ćelija/broj kvadrata  $\times 10^4 \times$  faktor razblaženja. Jedan deo ćelija je potom korišćen u daljim eksperimentima dok je drugi deo zasejan u novi flask sa svežim medijumom.

### 2.1.2. Sejanje ćelija i tretmani

Za određivanje vijabilnosti pomoću 3-(4,5'-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) i kristal violet testa, ćelije su sejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića pri gustini od  $1 \times 10^4$  ćelija po bunaru, u 200  $\mu$ l medijuma za gajenje. Analiza vijabilnosti i morfologije BV-2 ćelija rađena je i pomoću biosenzora koji prati stanje ćelija u realnom vremenu (xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Single Plate instrument, RTCA SP, ACEA Biosciences, San Dijego, SAD), za koji su ćelije posejane u specijalnu mikrotitar ploču sa 96 bunarića sa zlatnim elektrodama, isto pri gustini od  $1 \times 10^4$  ćelija po bunaru, u 200  $\mu$ l medijuma. Za merenje koncentracije nitrita i koncentracije citokina enzimskim imunotestom ELISA, posejano je  $5 \times 10^4$  ćelija u 500  $\mu$ l po bunaru u ploče sa 24 otvora. U sterilne ploče sa 6 otvora zasejano je po  $3 \times 10^5$  ćelija u 2 ml za analizu protočnom citofluorimetrijom, izolaciju RNK, izolaciju proteina za vestern blot, analizu parametara oksidativnog stresa i merenje unutarćelijske koncentracije ATP-a. Za imunocitohemijska i morfološka bojenja sejano je  $8 \times 10^4$  ćelija na okrugla stakla prečnika 25 mm. Posle sejanja sledila je inkubacija preko noći kako bi ćelije adherirale za podlogu, nakon čega su tretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om. LPS je prečišćen iz zida bakterije *Escherichia coli* serotipa 026:B6.

U zavisnosti od tretmana uspostavljene su sledeće grupe:

- kontrolna, netretirana grupa
- grupe tretirane benfotiaminom u koncentracijama 50, 100 i 250  $\mu\text{M}$
- grupa stimulisana LPS-om u koncentraciji 1  $\mu\text{g/ml}$
- grupe pretretirane benfotiaminom u koncentracijama 50, 100 i 250  $\mu\text{M}$ , u periodu od 30 min, a potom stimulisane LPS-om u koncentraciji 1  $\mu\text{g/ml}$

Za analizu signalnih puteva uključenih u delovanje benfotiamina ćelije su tretirane inhibitorima za ERK1/2 (U0126, Cell signaling, SAD, konačna koncentracija 50  $\mu\text{M}$ ), JNK (SP600125, Biaffin GmbH & Co KG, Nemačka, konačna koncentracija 20  $\mu\text{M}$ ) i Akt (LY294002 Cell signaling, SAD, konačna koncentracija 20  $\mu\text{M}$ ) u periodu od 30 min, a zatim tretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om kao što je navedeno.

Tretman je trajao u rasponu od 5 minuta do 24 sata, u zavisnosti od parametara koji su posmatrani.

## **2.2. Analiza vijabilnosti i morfologije RTCA aparatom**

RTCA instrument predstavlja tip biosenzora koji prati funkcijsko stanje ćelija u realnom vremenu. Ovaj sistem omogućuje neinvazivnu analizu ćelijskog statusa pomoću zlatnih mikroelektroda na dnu posebne mikrotitar ploče sa 96 bunarića, E-ploče. Mikroelektrode registruju promene u impedansi koja zavisi od prisustva ćelija na dnu bunarića i izražava se kao ćelijski indeks. Ćelijski indeks je direktno proporcionalan broju ćelija, njihovoj morfologiji i adheziji. Ćelijski indeks se uvećava sa povećanjem površine bunarića koju zauzimaju ćelije koje proliferišu, adheriraju za podlogu ili uvećavaju sopstvenu veličinu (Limame i sar., 2012). Ovom metodom moguće je proceniti kako se menja vijabilnost i morfologija ćelija tokom tretmana, u realnom vremenu.

BV-2 mikroglijske ćelije su posejane u E-ploču, inkubirane preko noći, tretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om u trajanju od 24 h. Ćelijski indeks je zabeležen na svakih 5 min u toku trajanja eksperimenta i konstruisana je kriva promene ćelijskog



indeksa tokom vremena za svaku grupu ćelija. Od svake vrednosti za ćelijski indeks je oduzeta vrednost indeksa medijuma za gajenje bez prisutnih ćelija. U rezultatima ćelijski indeks je predstavljen kao normalizovan ćelijski indeks, sračunat kada se ćelijski indeks u datom trenutku podeli sa ćelijskim indeksom u trenutku LPS stimulacije.

### **2.3. MTT test vijabilnosti**

Za određivanje vijabilnosti ćelija često se koristi MTT test koji se zasniva na kapacitetu živih ćelija da redukuju MTT. Naime, mitohondrijalni enzimi živih i metabolički aktivnih ćelija obavljaju redukciju žutog MTT-a do ljubičastih kristala formazana. Po završetku 24 h tretmana ćelije su inkubirane sa 20 µl rastvora MTT-a (5 mg/ml) u inkubatoru na 37 °C, u trajanju od 30 min. Prisustvo formiranih ljubičastih kristala formazana se vizuelno proverava, a potom se supernatant odstrani i nataloženi kristali rastvore u 150 µl dimetil-sulfoksida (DMSO). Intenzitet boje određen je merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 492 nm čitačem za mikrotitar ploče (ELISA čitač). Rezultati su prikazani kao procenat vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolnu grupu čija je vijabilnost arbitrarno uzeta kao 100%.

### **2.4. Kristal violet esej**

Kristal violet (KV) je esej koji je, kao i MTT test, indikator ćelijske vijabilnosti, ali se bazira na obeležavanju negativno naelektrisanih proteina, polisaharida i nukleinskih kiselina u vijabilnim adherentnim ćelijama i stoga se može koristiti kao mera broja ćelija. Po završetku 24 h tretmana ćelije su kratko isprane PBS-om, a zatim fiksirane sa 4% PFA u toku 20 min, na 4 °C. Zatim su ćelije obojene sa 1% KV rastvorom u trajanju od 15 min, posle čega su ploče dobro isprane vodom da bi se odstranio višak boje, i ostavljene da se osuše. Sutradan je boja vezana za ćelije rastvorena u 33% sirćetnoj kiselini i apsorbancija je očitana na 540 nm, sa pozadinskom apsorbancijom na 670 nm na ELISA čitaču. Vijabilnost netretiranih ćelija je uzeta kao 100%, a vijabilnost tretiranih grupa je izražena u odnosu na kontrolu.

## 2.5. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija je metoda kojom se može analizirati više karakteristika ćelija, uključujući njihovu veličinu, granularnost, kao i intenzitet fluorescence. Suspenzija ćelija prolazi kroz sistem fluida koji je tako konstruisan da omogućava analizu pojedinačnih partikula što obezbeđuje veliku osetljivost metode. Ćelije se najčešće obeležavaju fluorescentnim molekulima ili antitelima sa vezanom fluoroforom, fluorofora se zatim pobuđuje laserom i emituje fluorescencu određene talasne dužine koju aparat registruje i na taj način nam može dati informacije o ćelijskom statusu, smrti, proliferaciji, prisustvu određenih proteina i raznim drugim karakteristikama. Ova metoda korišćena je za analizu ćelijske smrti i detekciju ekspresije CD40 receptora. U svim eksperimentima korišćene su i neobeležene ćelije, kao kontrolna grupa pomoću koje su podešeni parametri na protočnom citofluorimetru tako da može da registruje populaciju BV-2 ćelija.

### 2.5.1. Analiza ćelijske smrti

Apoptozu i nekrozu, dva različita mehanizma ćelijske smrti, moguće je razlikovati na osnovu određenih morfoloških karakteristika koje apoptotične i nekrotične ćelije poseduju. Ćelije u ranoj apoptozu gube asimetričnost ćelijske membrane i kao posledica toga fosfatidilserin se premešta sa citoplazmatične strane gde se normalno nalazi, na spoljašnju stranu ćelijske membrane. Ovako lokalizovan fosfatidilserin se može detektovati pomoću aneksina V za koji se specifično vezuje. Dvojnim bojenjem sa propidijum jodidom, interkalirajućim agensom koji se vezuje za nukleinske kiseline, moguće je razlikovati rano apoptotične ćelije od kasno apoptotičnih i nekrotičnih koje su izgubile integritet ćelijske membrane i u koje propidijum jodid može da uđe.

Po završetku tretmana od 24 h ćelije su odlepljene sa podloge tripsinizacijom, a potom spojene sa odgovarajućim supernatantima (da bi u analizu ušle i mrtve ćelije koje su se odlepili od podloge). Ćelije su isprane PBS-om, a potom inkubirane u 100  $\mu$ l pufera za vezivanje aneksina (Tabela 1) sa 1,5  $\mu$ l aneksina (Tabela 3) obeleženog fluorescein izotiocijanata fluoroforom (*engl.* fluorescein isothiocyanate, FITC) i 1,5  $\mu$ l propidijum jodida koncentracije 1 mg/ml (Tabela 3). Posle inkubacije koja je trajala 15

minuta u mraku, na sobnoj temperaturi, vezivanje aneksina je zaustavljeno dodavanjem 200  $\mu$ l pufera za vezivanje aneksina. Analiza je rađena na CyFlow® Space Partec protočnom citofluorimetru, uz korišćenje PartecFloMax® softvera. Čelije koje su bile aneksin V pozitivne, a propidijum jodid negativne smatraju se apoptotičnim, dok se čelije obojene i aneksinom V i propidijum jodidom smatraju nekrotičnim. Žive čelije su bile negativne i na aneksin V i na propidijum jodid. Minimum 10 000 čelija je analizirano, a rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih i nekrotičnih čelija.

### **2.5.2. Detekcija ekspresije CD40 kostimulatornog proteina**

BV-2 čelije su tretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om u periodu od 24 h, a potom pokupljene i isprane PBS-om. Čelijska suspenzija je potom inkubirana sa anti-mišjim CD40 antitelom konjugovanim sa FITC fluoroforom, u periodu od 1h na 4 °C. Razblaženje antitela (Tabela 5) pravljeno je u 10% FCS-u u PBS-u. Po završetku inkubacije, čelije su dva puta isprane PBS-om i fluorescenca je očitana na CyFlow® Space Partec protočnom citofluorimetru, pomoću PartecFloMax® softvera. Minimum 10 000 čelija je analizirano, a rezultati su prikazani kao procenat čelija koje eksprimiraju CD40.

### **2.6. Analiza morfologije BV-2 čelija**

Imajući u vidu da se mikroglijske čelije odlikuju različitom morfologijom u zavisnosti od stanja aktivacije, oblik i veličina BV-2 čelija su analizirani pomoću fazno-kontrastnog snimanja čelija, kao i bojenjem citoskeleta pomoću fluorescentno obeleženog faloidina, peptidnog toksina poreklom iz gljiva koji sa velikom specifičnošću vezuje F-aktin. Čelije su tretirane 24 h, isprane PBS-om i fazno kontrastne slike su odmah napravljene. Za bojenje F-aktina čelije su, posle tretmana od 24 h, fiksirane korišćenjem 4% paraformaldehida u trajanju od 20 minuta. Posle fiksiranja, čelije su dobro isprane PBS-om, a potom je izvršena permeabilizacija membrane pomoću 0,25% rastvora deterdženta Triton X-100, tokom 15 minuta. Ovaj korak je važan prilikom obeležavanja struktura koje se nalaze unutar čelije jer se na taj način omogućuje prolazak boje ili antitela kroz membranu. F-aktin je detektovan pomoću faloidina obeleženog sa Alexa Fluor 555 fluoroforom (Tabela 3). Čelije su

inkubirane sa faloidinom u periodu od 30 minuta, na temperaturi od 4 °C. Posle 3 ispiranja PBS-om u trajanju od 5 minuta, i poslednjim ispiranjem u destilovanoj vodi, ćelije su 5 minuta inkubirane sa Hoechst 33342 fluorescentnom bojom (Tabela 3). Hoechst se vezuje za dvolančanu DNK i emituje plavu fluorescencu na talasnoj dužini od 460 nm, omogućujući tako vizuelizaciju jedra. S obzirom da može da prođe kroz ćelijsku membranu, Hoechst se koristi i za bojenje živih, kao i fiksiranih ćelija. Razblaženje ove boje pravi se u destilovanoj vodi do konačne koncentracije 0,025 mg/ml. Ćelije su isprane 5 puta u destilovanoj vodi i pokrivene moviolom (Tabela 1), a zatim su stakalca sa ćelijama postavljena na mikroskopska stakla, posmatrana i fotografisana pod Zeiss Axiovert mikroskopom (Zeiss, Nemačka).

Površina ćelija analizirana je u softverskom paketu AxioVision Rel 4.6 (Zeiss, Nemačka). Ćelije su merene u pet različitih regiona (138  $\mu\text{m}$   $\times$  104  $\mu\text{m}$ ) na stakalcu, a analizirana su 3 stakalca po grupi, u 3 eksperimenta, i određena je srednja vrednost za veličinu ćelija u svakoj grupi.

## **2.7. Imunocitohemijsko obeležavanje**

Imunocitohemija je metoda koja se zasniva na specifičnoj interakciji između antitela i antigena i omogućuje lokalizaciju specifičnih makromolekula (najčešće proteina) u ćelijama. U eksperimentima je korišćena kombinacija primarnih i sekundarnih antitela, gde je primarno antitelo specifično za protein od interesa, dok je sekundarno antitelo specifično za vrstu iz koje potiče primarno antitelo, i obeleženo je fluoroforom što omogućava vizuelizaciju reakcije na fluorescentnom mikroskopu. Imunofluorescenca je korišćena za detekciju i analizu ekspresije iNOS i p65/NF- $\kappa$ B. Za iNOS detekciju ćelije su stimulisane LPS-om i tretirane benfotiaminom u trajanju od 24 h, dok su za detekciju p65/NF- $\kappa$ B ćelije tretirane 30 min i potom analizirane, s obzirom da se translokacija NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora odvija brzo pošto mikroglija primi signal za aktivaciju.

Posle tretmana BV-2 ćelije su kratko isprane PBS-om, a zatim fiksirane sa 4% paraformaldehidom kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Posle fiksacije ćelije su ponovo isprane PBS-om, 3 puta u trajanju od 5 minuta. Ovako pripremljene ćelije se

mogu čuvati na 4 °C do nedelju dana ili se mogu odmah iskoristiti za imunocitohemijsko obeležavanje. Stakalca sa ćelijama koje se obeležavaju sa antitelom za NF-κB su uronjena u ledeni metanol i držana u zamrzivaču na -20 °C, 5 minuta. Potom su ćelije isprane tri puta PBS-om, u trajanju od 3 minuta. Sve ćelije su tretirane 0,25% rastvorom Tritona X-100, 15 minuta, radi permeabilizacije membrane. Posle ispiranja od viška deterdženta, nespecifično vezivanje antitela je blokirano sa 3% rastvorom goveđeg serum albumina (*engl.* bovine serum albumine, BSA) u PBS-u, 30 minuta na sobnoj temperaturi. BV-2 ćelije su potom inkubirane sa odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela (Tabela 5) preko noći na 4 °C. Sledećeg dana je usledilo ispiranje nevezanog antitela PBS-om, 5 puta u trajanju od 3 minuta. Potom su ćelije inkubirane sa odgovarajućim fluorescentno obeleženim antitelom (Tabela 6), 1 h na sobnoj temperaturi. Radi očuvanja fluorofora u toku ovog koraka, kao i svakog sledećeg, pokrovna stakalca sa ćelijama su držana u mraku. Nakon dužeg ispiranja u PBS-u (5 × 3 min) ćelije su inkubirane 5 minuta sa Hoechst fluorescentnom bojom. Usledilo je ispiranje u destilovanoj vodi, nakon čega su stakalca sa ćelijama pokrivena moviolom i postavljena na mikroskopska stakla. Ćelije koje su prošle celu proceduru bez inkubacije sa primarnim antitelom bile su kontrola bojenja. Kod takvih ćelija nije zabeležen značajan fluorescentni signal.

Ćelije su posmatrane i fotografisane Zeiss Axiovert mikroskopom. Određeno vreme ekspozicije nije menjano između grupa. Intenzitet p65/NF-κB fluorescence u nukleusu ćelija određen je pomoću Image J softvera. Region nukleusa određen je pomoću Hoechst bojenja, a zatim preklopljen sa p65/NF-κB signalom, gde je određen intenzitet fluorescence. U svakoj eksperimentalnoj grupi analizirano je minimum 200 ćelija na 3 stakalca, iz 3 različita eksperimenta, a rezultati su predstavljeni u arbitrarnim jedinicama (*engl.* arbitrary units, AU). Podaci su svrstani u intervale od 5 AU i predstavljeni kao kumulativni procenti za svaku grupu.

## **2.8. Određivanje koncentracije nitrita**

Aktivirane mikroglijske ćelije proizvode NO koji reaguje sa molekularnim kiseonikom i superoksidnim anjonom i formira peroksinitrit, nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) i nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Efekat tretmana na NO produkciju mikroglijskih ćelija može se proceniti

pomoću Grisovog testa koji određuje koncentraciju nitrita, stabilnog NO produkta. Grisov reagens sadrži sulfanilamid koji sa nitritima formira diazonijum soli, dok N-(naftil)-etilenediamin dihidrohlorid sa ovim solima daje roze boju. S obzirom da Grisov reagens reaguje samo sa nitritima, nitrati se prvo redukuju do nitrita korišćenjem metalnog kadmijuma.

Posle 24 h tretmana pokupljeni su supernatanti BV-2 ćelijskih kultura. U supernatante su stavljene granule kadmijuma radi efikasne redukcije nitrata do nitrita. Uzet je alikvot od 50  $\mu$ l i pomešan sa istom zapreminom Grisovog reagensa (Tabela 1) u pločama sa 96 bunarića nakon čega su ploče ostavljene 10 minuta u mraku radi razvijanja boje. Standardna kriva je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija natrijum nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ). Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 570 nm, na ELISA čitaču. Rezultati su izraženi u  $\mu\text{M}$  produkovanih nitrita i predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška (SE) iz tri nezavisna eksperimenta, rađena u triplikatu.

## **2.9. Izolacija RNK**

Prvi korak u analizi ekspresije gena od interesa jeste izolacija RNK. BV-2 ćelije su posejane u sterilne ploče i tretirane benfotiaminom u trajanju od 4 i 6 h. Potom je supernatant uklonjen, a ćelije lizirane dodatkom 1ml TRIzol reagensa. Lizat ćelija je nekoliko puta provučen kroz nastavak pipete radi što bolje homogenizacije, a zatim prebačen u male plastične epruvete i ostavljen 5 min na sobnoj temperaturi da bi se omogućilo potpuno razdvajanje nukleoproteinskih kompleksa. Dodato je 200  $\mu$ l hloroforma, epruvete su snažno vorteksovane dok smeša nije postala bela, a zatim su ostavljene na sobnoj temperaturi 3 minuta. Radi efikasnog razdvajanja faza, uzorci su centrifugirani 15 minuta na temperaturi od 4  $^{\circ}\text{C}$  i brzini od 12000  $\times$  g. Posle centrifugiranja uočene su 3 faze: donja crvena organska faza u kojoj su pretežno DNK i proteini, srednja bela interfaza i gornja bezbojna vodena faza u kojoj se nalazi RNK. Gornja faza je prenetu u nove ependorfice u koje je dodato 0,5 ml izopropanola nakon čega su ependorfice snažno vorteksovane. Uzorci su čuvani na -80  $^{\circ}\text{C}$  preko noći. Sutradan su uzorci odleđeni i centrifugirani 10 minuta na 4  $^{\circ}\text{C}$  i brzini od 12000  $\times$  g. RNK je ovako staložena kao beli talog na dnu epruvete. Da bi se dobio što čistiji uzorak RNK, talog se dva puta ispira sa 0,5 ml 75% etanola napravljenog u DEPC tretiranoj

vodi, radi inaktivacije RNKaza (Tabela 4). Posle centrifugiranja 5 minuta na 4 °C i brzini od 7500 × g, etanol je odliven, a epruvete su ostavljene na sobnoj temperaturi 15 - 30 minuta da bi se talog osušio. Talog je posmatran na nekoliko minuta da bi se sprečilo isušivanje što smanjuje rastvorljivost RNK. Posle sušenja talog RNK je rastvoren u 30 µl upH<sub>2</sub>O (Tabela 4). U sledećem koraku je urađena elektroforeza na 1% agaroznom gelu, radi provere kvaliteta RNK. Koncentracije su određene merenjem apsorbance na 260 nm (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS, Austrija).

### **2.10. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije**

U sledećem koraku, komplementarna DNK (cDNK) se sintetiše na osnovu izolovane RNK, reverznom transkripcijom, i koristi u daljoj analizi. Uzorci su prvo tretirani DNKazom da bi se odstranili ostaci genomske DNK koji mogu smetati u daljoj analizi ekspresije gena. RNK (1 µg) je tretirana sa 1 U DNKaze I (Tabela 4) na 37 °C u trajanju od 30 minuta, a potom je DNKaza inaktivirana sa 25 mM EDTA na 65 °C tokom 10 minuta. Ovako pripremljeni uzorci su potom ušli u proces reverzne transkripcije.

Za sintezu cDNK korišćen je komercijalno dostupan komplet (Tabela 4) koji je sadržao reverznu transkriptazu (RNK zavisna DNK polimeraza), dezoksiribonukleotide, inhibitor enzima RNKaze i prajmere za početak sinteze molekula DNK, nasumične heksamere. Reakciona smeša se sastojala iz uzorka koji sadrži 1 µg RNK, pufera za reverznu transkripciju, dNTP miksa (100 mM), nasumičnih prajmera, MultiScribe reverznu transkriptazu i upH<sub>2</sub>O (Tabela 4). Reakciona smeša je inkubirana 10 minuta na 25 °C, a potom 120 minuta na 37 °C, optimalnoj temperaturi za aktivnost reverzne transkriptaze. Reakcija je prekinuta inkubacijom na 85 °C u trajanju od 5 minuta. Ovako sintetisana cDNK je skladištena na – 20 °C do korišćenja.

### **2.11. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Reakcija lančanog umnožavanja (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) je metoda u kojoj se umnožava DNK ili RNK od interesa, zahvaljujući lančanoj reakciji enzima polimeraze. U našim eksperimentima matrica je bila cDNK sintetisana na

osnovu izolovane RNK. DNK polimeraza u PCR reakciji amplifikuje samo DNK od interesa zahvaljujući oligonukleotidnim prajmerima koji su komplementarni sa segmentom određene sekvence, a čije prisustvo je neophodno za aktivnost polimeraze. Mi smo koristili tehniku kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (*engl.* quantitative real-time PCR, qPCR). Proces umnožavanja se kontroliše ciklusima temperaturnih promena, a količina umnoženog produkta se prati u realnom vremenu zahvaljujući detekciji fluorescentnog molekula koji se vezuje isključivo za dvolančanu DNK.

Korišćena je fluorescentna boja SYBR Green, a komercijalno dostupna smeša pored fluorescentne boje sadrži i odgovarajući pufer, miks dNTP i termostabilnu DNK polimerazu (Tabela 4). Reakciona smeša za amplifikaciju sastojala se iz SYBR Green miksa, uzorka cDNK razblaženog 10 ×, prajmera za odgovarajuće transkripte (Tabela 7) i up H<sub>2</sub>O. Reakcija se odvijala u specijalnoj sterilnoj ploči sa 96 bunarića, prilagođenoj za qPCR, a korišćen je aparat ABI Prism 7000. Ploča je prvo inkubirana 2 minuta na 50 °C, a zatim 10 minuta na 95 °C radi disocijacije dvolančane DNK. Usledilo je 40 ciklusa koji su započeti sa 15 sekundi na 95 °C za denaturaciju dvolančane DNK i omogućavanje vezivanja prajmera i elongaciju lanaca što se odvijalo u svakom ciklusu u toku 1 minuta na specifičnoj temperaturi vezivanja prajmera. Ova temperatura je određena za svaki par prajmera ponaosob i data je u Tabeli 7.

Rezultati su analizirani u programu 7500 System software (Applied Biosystems, SAD). Nivo ekspresije gena od interesa (Tabela 7) izražen je u odnosu na nivo ekspresije kontrolnog gena čija ekspresija ostaje ista u posmatranom sistemu nezavisno od eksperimentalne procedure. Ovakvi geni se nazivaju endogene ili interne kontrole. U eksperimentima su u ove svrhe korišćeni GAPDH i β-aktin (ACTB). Komparativni Ct metod je korišćen za analizu rezultata. Ct vrednost (*engl.* treshold cycle) se definiše kao ciklus u toku amplifikacije kada fluorescentni signal prelazi prag detekcije. Ct vrednost je mera ekspresije gena u uzorku, što je Ct vrednost niža to je ekspresija gena veća, s obzirom da tokom amplifikacije ranije prelazi prag detekcije. Razlika između Ct vrednosti za ciljani gen i internu kontrolu je poređena za kontrolnu i tretirane grupe ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metod). Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu.



## 2.12. Enzimski imunološki esej

ELISA je metoda koja pomoću specifičnih antitela može da detektuje antigen u uzorku. U eksperimentima je korišćena tzv. „sendvič“ ELISA metoda u kojoj se koriste dva antitela specifična za različite epitope na antigenu. Pomoću ove metode određena je koncentracija citokina TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 u supernatantu BV-2 ćelijskih kultura.

Mikroglijske ćelije su posejane u sterilne ploče sa 24 otvora i tretirane kao što je već opisano. Posle 24 h tretmana, supernatanti iz ćelijskih kultura su skupljeni i skladišteni na -80 °C do korišćenja. ELISA eseji su rađeni u pločama sa 96 otvora (NUNC, Thermo Scientific, SAD), dizajniranim specifično za ELISA testove. Ploče su obložene odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela (Tabela 8). Sutradan su ploče isprane puferom za ispiranje (0,05% Tween u PBS-u) 4 puta, a potom je usledilo blokiranje nespecifičnih mesta za vezivanje (10% rastvor FBS-a za TNF- $\alpha$ , 1% BSA za IL-6 i IL-10). Posle blokiranja ploče su isprane 3 puta i u svaki bunarić je dodato 50  $\mu$ l uzorka odnosno standarda. Standardi su odgovarajuća razblaženja komercijalno dostupnih citokina. Ploča je pokrivena adhezivnom trakom i inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h. Zatim su ploče dobro isprane 4 puta i usledila je inkubacija sa sekundarnim antitelom koje je obeleženo biotinom, u trajanju od 1 h, na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja u svaki bunarić je dodat avidin obeležen peroksidazom iz rena. Avidin ima veliki afinitet za vezivanje biotina. Ovako se formira kompleks u kome je antigen u „sendviču“: primarno antitelo – antigen – sekundarno antitelo obeleženo biotinom – avidin sa peroksidazom iz rena. Posle ispiranja nevezanog avidina sledi detekcija pomoću odgovarajućeg supstrata za peroksidazu iz rena. Za detekciju TNF-  $\alpha$  korišćen je hromogeni supstrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB). Posle inkubacije u mraku u trajanju od 15 minuta razvijena je plava boja. Reakcija je prekinuta dodavanjem 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Zorka, Šabac, Srbija) posle čega je razvijena žuta boja čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji citokina u uzorku. Apsorbanca je merena na 450 nm na ELISA čitaču. Za detekciju IL-6 i IL-10 korišćena je 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) kao supstrat. Po dodatku ABTS-a ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi 10 minuta i praćeno je razvijanje zelene boje. Apsorbanca se meri na 405 nm sa korekcijom na 670 nm na svakih 5 minuta u toku 45 min. Kao relevantne uzimaju se vrednosti apsorbance koje ne

prelaze vrednost 0,2 za blank (medijum) i 1,3 za standard najveće koncentracije. Koncentracije citokina su očitane sa standardne krive i izražene u pg /ml.

### **2.13. Priprema ćelijskog lizata**

BV-2 ćelije su gajene i tretirane na prethodno opisan način, a zatim lizirane radi analize ekspresije proteina imunoblot metodom. Tretmani su trajali 5, 15, 30 i 60 minuta, kao i 24 h, u zavisnosti od dinamike promene ekspresije posmatranih proteina. Posle tretmana, ćelije su odlepljene sa podloge tripsinizacijom, isprane PBS-om i lizirane puferom za liziranje (Tabela 1), kome je dodat miks proteaznih (Roche, Nemačka) i, ako je u pitanju analiza fosforilisanih proteina, fosfataznih inhibitora (Pierce, SAD). Posle inkubacije na ledu u trajanju od 15 minuta, lizat ćelija je centrifugiran na  $12\ 000 \times g$ , 20 minuta, na  $4\ ^\circ C$ , radi odstranjivanja ćelijskog otpada. Supernatant je prebačen u novu tubu, alikvotiran i skladišten na  $-80\ ^\circ C$  do korišćenja.

### **2.14. Priprema citosolne i jedarne frakcije proteina**

Citosolna i jedarna frakcija proteina pripremane su pomoću komercijalno dostupnog *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* kompleta (Thermo Scientific, SAD), radi analize ekspresije i translokacije NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora. BV-2 ćelije su pretretirane benfotiaminom kao što je opisano, a potom stimulisane LPS-om 30 minuta. Medijum je odstranjen, a ćelije su pokupljene tripsinizacijom i isprane PBS-om. Posle centrifugiranja od 3 minuta, na brzini od  $500 \times g$ , talog ćelija je resuspendovan u  $150\ \mu l$  hladnog pufera za ekstrakciju citosolne frakcije I (*engl.* Cytoplasmic Extraction Reagent I, CER I) kome je dodat miks proteaznih i fosfataznih inhibitora. Ćelijski pelet je snažno vorteksovan i inkubiran na ledu 10 minuta. Potom je dodato  $8,25\ \mu l$  hladnog pufera za ekstrakciju citosolne frakcije II (*engl.* Cytoplasmic Extraction Reagent II, CER II). Tube sa ćelijskim lizatima su snažno vorteksovane, inkubirane na ledu 1 minut, a potom ponovo vorteksovane i centrifugirane 5 minuta na maksimalnoj brzini ( $16\ 000 \times g$ ). Supernatant koji je sadržao citosolnu frakciju proteina je odmah prebačen u novu tubu i skladišten na  $-80\ ^\circ C$  do korišćenja. Jedarni talog je resuspendovan u  $75\ \mu l$  hladnog pufera za ekstrakciju nuklearne frakcije (Nuclear Extraction Reagent, NER) i suspenzija je inkubirana 40 minuta na ledu uz povremeno

vorteksovanje, a potom centrifugirana 10 minuta pri brzini od  $16\ 000 \times g$ . Dobijeni supernatant sa nuklearnim ekstraktom je prebačen u novu ohlađenu tubu i skladišten na  $-80\ ^\circ\text{C}$ .

### **2.15. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina u pripremljenim uzorcima određena je metodom zasnovanom na svojstvu bicinoninske kiseline da detektuje  $\text{Cu}^{1+}$  koji se formira redukcijom  $\text{Cu}^{2+}$  u prisustvu proteina u alkalnoj sredini. Korišćen je komercijalno dostupan komplet *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, SAD), prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša sastojala se iz 115  $\mu\text{l}$  dejonizovane vode, 10  $\mu\text{l}$  uzorka i 125  $\mu\text{l}$  boje. Razvijanje boje odvijalo se 2 h na  $37\ ^\circ\text{C}$ , posle čega je očitana apsorbancija na 540 nm, na ELISA čitaču. Standardna kriva je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija BSA.

### **2.16. Elektroforetsko razdvajanje proteina**

Za analizu ekspresije proteina od interesa u ovoj studiji pripremljeni uzorci su elektroforetski razdvojeni, a potom detektovani imunoblot metodom. Elektroforeza je rađena na poliakrilamidnim gelovima sa natrijum-dodecilsulfatom (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), čime su proteini razdvojeni po molekularnoj težini. Gel za razdvajanje je u sastavu imao 5; 7,5 ili 10% poliakrilamida u zavisnosti od molekularne težine ispitivanih proteina, dok je gel za koncentrovanje sadržao 4% poliakrilamida (Tabela 1). Uzorci su pripremljeni sa puferom za uzorke (Tabela 1), zagrejani 5 minuta na  $95\ ^\circ\text{C}$  radi denaturacije proteina, a zatim su jednake količine proteina nanešene na gel. Kao standard za molekularnu težinu korišćena je komercijalno dostupna smeša obojenih proteina poznatih molekularnih težina (Fermentas, Nemačka) koja je nanesena na gel pored uzoraka. Razdvajanje se odvijalo u mini aparaturi za elektroforezu (Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell, Bio-Rad, SAD) u puferu za elektroforezu (Tabela 1), pod konstantnim naponom od 120 V, na sobnoj temperaturi.

## 2.17. Prenos proteina na poliviniliden-fluoridnu membranu i imunoblot analiza

Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na poliviniliden-fluoridnu membranu (*engl.* polyvinylidene fluoride, PVDF) (Millipore, SAD) urađen je u sistemu za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, SAD), pri čemu se negativno naelektrisani proteini kreću ka pozitivnoj anodi gde je postavljena PVDF membrana. Gel sa razdvojenim proteinima je kratko inkubiran u puferu za transfer (Tabela 1). PVDF membrana je aktivirana u metanolu (15 sekundi), isprana u vodi (2 minuta), a potom ekvilibrisana u puferu za transfer (10 minuta). Prenos proteina je obavljen pod konstantnim naponom (100 V) u toku 1 h. PVDF membrane su potom bojene Ponceau S bojom (Tabela 1) koja se vezuje za proteine. Na ovaj način je proveravano da li je prenos bio dobro obavljen. Membrane su potom isprane destilovanom vodom i dalje korišćene za imunoblot analizu.

Posle prenosa proteina, membrane su inkubirane u 5% BSA u TBST puferu (Tabela 1) na sobnoj temperaturi, u trajanju od 1h, radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela. Usledila je inkubacija sa primarnim antitelom (Tabela 5), preko noći na 4 °C. Sutradan su membrane isprane u TBST puferu 3 puta u trajanju od 10 minuta, da bi se uklonio višak nevezanog primarnog antitela. Potom su membrane inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (Tabela 6), 1h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja (3 × 10 minuta), membrane su inkubirane u rastvoru luminola (Tabela 1). Peroksidaza rena katalizuje oksidaciju luminola pri čemu se emituje svetlosni signal koji je zabeležen na fotografskom filmu (Kodak), gde je jačina signala bila proporcionalna količini vezanog antitela. Program ImageQuant 5.2 je korišćen za analizu signala, a dobijene vrednosti optičkih gustina za analizirane proteine su normalizovane u odnosu na količinu β-aktina ili β-tubulina u bunariću, proteina čija se ekspresija ne menja pod dejstvom tretmana. Tako dobijene vrednosti su prikazane u arbitrarnim jedinicama (za iNOS, MnSOD, CAT, GPx, GR) ili u procentima, u odnosu na ekspresiju u kontrolnoj grupi kojoj je arbitrarno data vrednost 100% (za COX-2, pERK, pJNK, pp38, pAkt, p65/NF-κB). Rezultati prikazani grafički predstavljaju srednje vrednosti (±SE) iz 3 nezavisna eksperimenata ponovljena u triplikatu .

## **2.18. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite**

U cilju analize parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, u BV-2 ćelijama je određen sadržaj  $\bullet\text{O}_2^-$ , MDA i ukupnog glutaciona, a analizirane su i aktivnosti antioksidativnih enzima CuZnSOD i MnSOD, CAT, GPx i GR. Ćelije su tretirane u trajanju od 24h kao što je već opisano, isprane PBS-om i pokupljene sterilnom plastičnom grebalicom. BV-2 ćelije su lizirane sonikacijom, a potom je uzorak centrifugiran na brzini od  $15\,000 \times g$  u trajanju od 5 minuta, na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Talog je odbačen, a supernatant sa liziranim ćelijskim sadržajem je prebačen u novu tubu i skladišten na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  do korišćenja.

### **2.18.1. Merenje koncentracije superoksid anjona**

Kao parametar oksidativnog stresa, određivana je koncentracija  $\bullet\text{O}_2^-$ , pomoću metode koja se zasniva na redukciji nitro plavo tetrazolijuma (*engl.* nitro blue tetrazolium, NBT) do monoformazana, što se može pratiti spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na talasnoj dužini 550 nm. Reakciona smeša je sadržala 1 mM NBT rastvoren u fosfatnom puferu (pH 8,6) i 0,1 mg/ml želatina. Rastvor NBT-a je sat vremena bio izložen azotu pod pritiskom da bi se smanjio napon kiseonika u medijumu. Potom je lizat ćelija dodat u reakcionu smešu i praćena je promena apsorbance na 550 nm. Rezultati su izraženi kao procenat redukovanog NBT-a u odnosu na kontrolnu grupu za koju je arbitrarno određena 100% redukcija NBT-a.

### **2.18.2. Analiza sadržaja malondialdehida**

Pokazatelj nivoa oksidativnog stresa je i sadržaj MDA, koji oslikava nivo lipidne peroksidacije i može se odrediti pomoću tiobarbituratnog eseja koji se bazira na reakciji tiobarbituratne kiseline i MDA čiji je proizvod kompleks žute boje (Villacara i sar., 1989). TBA reagens, sačinjen od 15 % trihlorsirćetne kiseline, 0,375 % tiobarbiturne kiseline i 0,25 mol/L hlorovodonične kiseline, je pomešan sa lizatom ćelija, a zatim je reakciona smeša zagrevana na  $95\text{ }^\circ\text{C}$  5 minuta. Posle hlađenja uzorci su centrifugirani 1 minut pri brzini od  $3000 \times g$  i apsorbancia supernatanta je očitana na 532 nm. Rezultati su prikazani u nmol MDA/ml.

### 2.18.3. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona

Glutation je glavni neenzimski antioksidans u mikrogliji i njegov sadržaj u ćeliji je indikator sposobnosti ćelija da se izbore sa oksidativnim stresom. Koncentracija ukupnog glutaciona izmerena je pomoću reciklirajućeg eseja koji koristi 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoevu kiselinu (DTNB) i GR. DTNB oksiduje redukujuću formu GSH do GSSG pri čemu se formira 5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina (TNB). U sledećem koraku GR redukuje GSSG do GSH. Nivo stvaranja TNB-a je proporcionalan ukupnoj koncentraciji glutaciona i prati se merenjem apsorbance na 412 nm u periodu od 6 min (Anderson, 1986). Reakciona smeša se sastojala iz 700  $\mu$ l pufera ( $211 \times 10^{-6}$  g NADH u fosfatnom puferu, pH 7,5 sa 6,3 mM EDTA), 100  $\mu$ l DTNB (6 mM u fosfatnom puferu, pH 7,5, sa 6,3 mM EDTA), 175  $\mu$ l vode i 25  $\mu$ l uzorka. Reakcija je započeta dodavanjem 10  $\mu$ l GR (266 U/mL u fosfatnom puferu, pH 7,5 sa 6,3 mM EDTA). Na osnovu poznatih koncentracija GSSG konstruisana je odgovarajuća standardna kriva. Koncentracija ukupnog glutaciona izražena je u nmol/ml.

### 2.18.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Kao mera antioksidativne zaštite, određena je aktivnost antioksidativnog enzima SOD. Superoksid anjon, supstrat SOD, se generiše u spontanoj oksidaciji epinefrina koja se odvija pod dejstvom molekularnog kiseonika u baznoj sredini. Tokom oksidacije epinefrina formira se proizvod roze boje. SOD reaguje sa superoksid anjonom i smanjuje brzinu formiranja obojenog proizvoda. Reakciona smeša se sastojala iz 10 mM epinefrina, uzorka i 50 mM natrijum bikarbonatnog pufera pH 10,2, sa 1mM EDTA. Reakcija je započinjala dodavanjem epinefrina i praćena je merenjem apsorbance na 480 nm u vremenskom rasponu od 5-8 minuta, kada je zavisnost linearna. Da bi se odredila aktivnost mitohondrijalne SOD (MnSOD), aktivnost citosolne forme (CuZnSOD) je inhibirana dodatkom 5 mM KCN u reakcionu smešu. Aktivnost CuZnSOD određena je kao razlika između ukupne SOD i MnSOD aktivnosti. Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao količina enzima koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Rezultati su prikazani u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

### **2.18.5. Merenje aktivnosti katalaze**

Metoda za određivanje aktivnosti CAT, još jednog ključnog enzima u antioksidativnoj zaštiti, zasniva se na praćenju redukcije vodonik peroksida (supstrat za CAT) u reakciji sa amonijum molibdatom pri čemu se formira kompleks žute boje (Goth, 1991). Uzorak je inkubiran 1 minut sa 65  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu, pH 7,2. Negativna kontrola je bila epruveta sa fosfatnim puferom umesto uzorka. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 32,4 mM amonijum molibdata i apsorbance je praćena na talasnoj dužini od 405 nm. Jedinica aktivnosti CAT predstavlja broj redukovanih  $\mu\text{molova}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u minuti. Rezultati su izraženi u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

### **2.18.6. Analiza aktivnosti glutathion peroksidaze**

Aktivnost GPx određena je indirektnom metodom, merenjem potrošnje NADPH na 340 nm. GPx katalizuje redukciju lipidnih hidroperoksida do alkohola i vode pri čemu se GSH oksiduje do GSSG. Potom se nastali GSSG reciklira ponovo do GSH uz katalitičko dejstvo enzima GR i oksidaciju koenzima NADPH. Oksidacija NADPH do  $\text{NADP}^+$  se prati spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 340 nm, što predstavlja meru aktivnosti GPx. Redukcija jednog mola GSSG zahteva jedan mol NADPH. Jedinica aktivnosti GPx definiše se kao broj  $\mu\text{molova}$  oksidovanog NADPH u minuti, a aktivnost GPx izražena je u jedinicama po miligramu proteina.

### **2.18.7. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze**

Metoda za određivanje aktivnosti GR zasniva se na sposobnosti ovog enzima da katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do  $\text{NADP}^+$ . Reakciona smeša se sastojala iz 1 mM NADH u 200 mM Tris HEPES puferu, pH 7,2 sa 1 mM EGTA, uzorka i 4 mM GSSG. Smeša je inkubirana 15 minuta na 37 °C, a zatim su dodati 0,1 M HCl i 6 M NaOH, a u kontrolu 4 mM GSSG. Apsorbance je merena na fluorimetru, na  $\lambda_{\text{Ex}}=360$  nm,  $\lambda_{\text{Em}}=460$  nm. NAD i NADP imaju plavu fluorescencu u redukovanom obliku, ali ne fluoresciraju u oksidovanom obliku, pa se gubitak fluorescence može pratiti fluorimetrijski, što predstavlja veoma osetljivu metodu. Kao standard korišćen je 100 mM  $\text{NAD}^+$  od koga su pravljena odgovarajuća razblaženja.

Jedinica aktivnosti enzima GR definiše se kao broj  $\mu$ molova oksidovanog NADPH u minuti, a rezultati su predstavljeni u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

### **2.19. Merenje unutarćelijske koncentracije ATP-a**

Promene unutarćelijske koncentracije ATP-a u BV-2 ćelijama nakon tretmana benfotiaminom izmerene su primenom bioluminiscentnog kompleta (*ATP Bioluminescent Assay Kit*, Sigma, Nemačka). ATP je prethodno ekstrahovan iz ćelija vrelom vodom, po opisanom protokolu (Yang i sar., 2002). Ukratko, BV-2 ćelije su tretirane benfotiaminom 30 min, a zatim stimulisane LPS-om u trajanju od 1h, 4h i 24h, a potom je medijum uklonjen, na ćelije je sipana kipuća voda i one su sakupljene sterilnom plastičnom grebalicom. Tako dobijena ćelijska suspenzija je prebačena u tubice i potom kuvana 10 minuta, a zatim centrifugirana 5 minuta na  $12\ 000 \times g$ , na temperaturi od  $4\ ^\circ\text{C}$ . Talog sačinjen od ostataka ćelija je odbačen, a supernatanti su odmah iskorišćeni za određivanje koncentracije ATP-a. Uzorci su inkubirani sa smešom luciferina i luciferaze, prema uputstvu proizvođača kompleta. Intenzitet luminiscence je meren pomoću luminometra (CHAMELEON<sup>TM</sup>V, Hidex, Turku, Finland). Konstruisana je ATP standardna kriva, na osnovu koje su određene koncentracije ATP-a u uzorcima. Koncentracija ATP-a izražena je u nmol ATP/mg proteina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti koncentracije ATP ( $\pm$  SE) iz 3 nezavisna eksperimenata ponovljena u triplikatu.

### **2.20. Statistička obrada podataka**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE iz najmanje tri nezavisna eksperimenta, od kojih je svaki izveden u triplikatu. Za analizu statističke značajnosti razlika između rezultata za različite tretmane korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Bonferroni testom za višestruka poređenja. Vrednosti parametra  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnim.



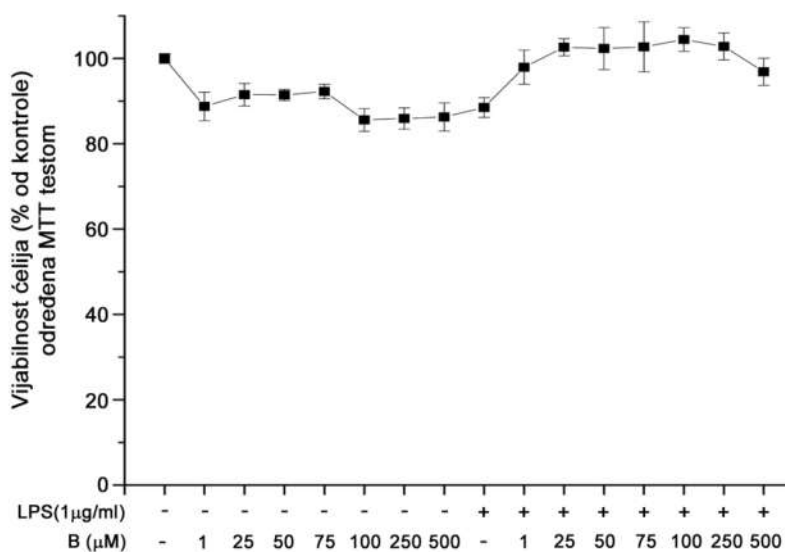
## **IV REZULTATI**

U skladu sa prethodno postavljenim ciljevima, potencijalni antiinflamatorni i antioksidativni uticaj benfotiamina na aktiviranu mikrogliju ispitan je u LPS-om stimulisanoj kulturi BV-2 ćelija, široko prihvaćenom *in vitro* modelu neuroinflamacije. Efekat benfotiamina praćen je i u nestimulisanim ćelijama, radi provere dejstva supstance na mikroglijske ćelije u uslovima kada inflamacija nije prisutna.

## 1. Efekat benfotiamina na preživljavanje i morfologiju BV-2 mikroglijskih ćelija u kulturi

### 1.1. Benfotiamin ne utiče na vijabilnost BV-2 ćelija

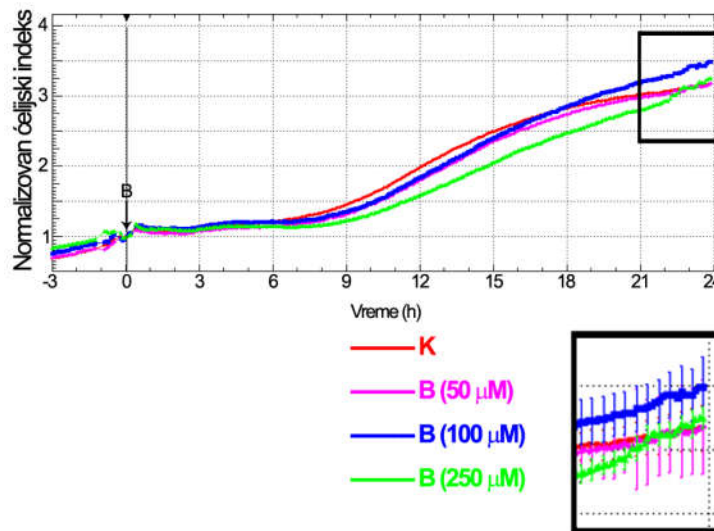
Uticaj benfotiamina na vijabilnost BV-2 ćelija ispitan je u opsegu koncentracija od 1 do 500  $\mu\text{M}$ . Vijabilnost je određena u BV-2 ćelijama tretiranim benfotiaminom u trajanju od 24 h ili pretretiranim benfotiaminom i stimulisanim LPS-om tokom 24 h. Benfotiamin nije uticao na vijabilnost nestimulisanih BV-2 ćelija, kao ni ćelija koje su stimulisane LPS-om, ni u jednoj od navedenih koncentracija (Slika 7). U daljim eksperimentima benfotiamin je korišćen u koncentracijama 50, 100 i 250  $\mu\text{M}$ .



**Slika 7. Uticaj tretmana benfotiaminom i stimulacije LPS-om na vijabilnost BV-2 mikroglijskih ćelija.** BV-2 ćelije su tretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om u trajanju od 24 h i njihova vijabilnost je određena MTT testom. Rezultati su prikazani kao procenat živih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane kulture čija je vijabilnost uzeta kao 100%. Simboli na grafiku predstavljaju srednje vrednosti tri nezavisno izvedena eksperimenta ( $\pm$  SE).

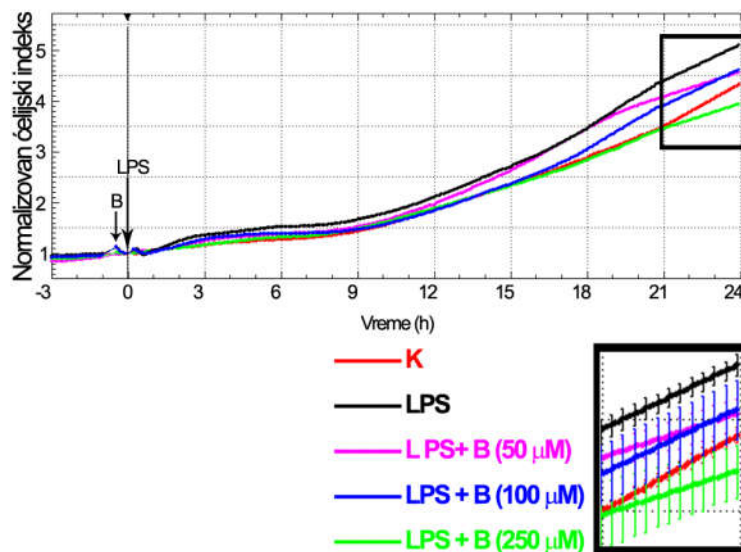
## 1.2. Benfotiamin menja morfologiju BV-2 mikroglijskih ćelija stimulisanih LPS-om

Funkcijski status BV-2 ćelija u realnom vremenu analiziran je RTCA aparatom. Merenjem impedanse instrument određuje ćelijski indeks koji govori o vijabilnosti, morfologiji i adheziji ispitivanih ćelija. U svim grupama ćelijski indeks se postepeno uvećavao, kako su ćelije adherirale za podlogu i proliferisale (Slike 8 i 9). Tretman benfotiaminom u navedenim koncentracijama nije uticao na ćelijski indeks (Slika 8).



**Slika 8. Status benfotiaminom tretiranih BV-2 ćelija u realnom vremenu.** BV-2 ćelije su tretirane benfotiaminom 24 h i njihovo stanje je praćeno RTCA aparatom. Na grafiku je prikazan normalizovan ćelijski indeks za kontrolnu grupu ćelija (K, crvena linija), i ćelije tretirane benfotiaminom u koncentracijama 50 µM (B, roze linija), 100 µM (B, plava linija) i 250 µM (B, zelena linija).

Međutim, 24 h posle stimulacije LPS-om došlo je do značajnog povećanja ćelijskog indeksa u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 9). Pretretman ćelija benfotiaminom doveo je do smanjenja ćelijskog indeksa kod ćelija stimulisanih LPS-om, a ovaj efekat je bio najizraženiji u koncentraciji 250 µM, koja je ćelijski indeks vratila na kontrolni nivo. Da bi utvrdili da li su promene ćelijskog indeksa posle tretmana posledica promena u morfologiji ili broju ćelija urađene su citološke analize i kristal violet esej.

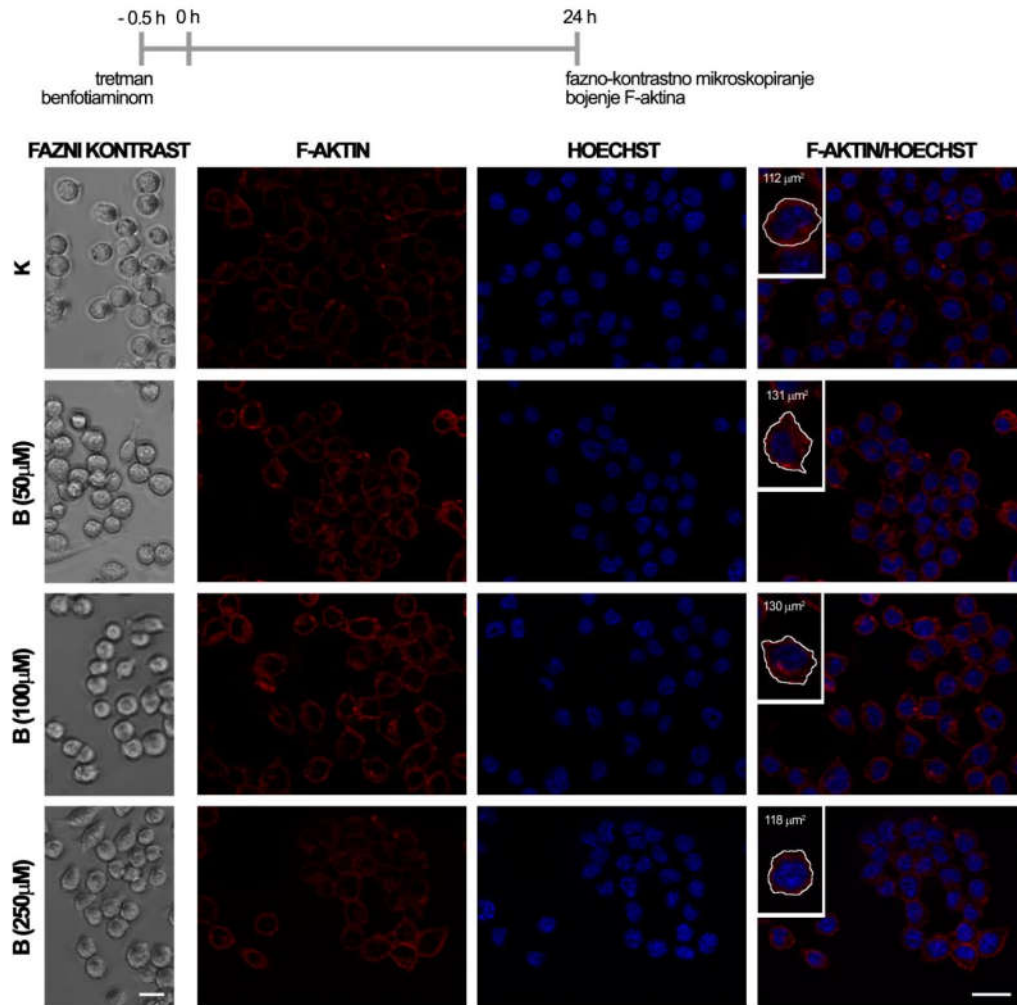


**Slika 9. Uticaj benfotiamina na status LPS-stimuliranih BV-2 ćelija u realnom vremenu.** Ćelijski indeks BV-2 ćelija je praćen RTCA aparatom. Na grafiku su prikazane normalizovane vrednosti ćelijskog indeksa u kontrolnoj grupi ćelija (K, crvena linija), grupi stimuliranoj LPS-om (LPS, crna linija) i ćelijama stimuliranim LPS-om i pretretiranim benfotiaminom (LPS+B (50 µM), roze linija; LPS + B (100 µM), plava linija; LPS + B (250 µM), zelena linija).

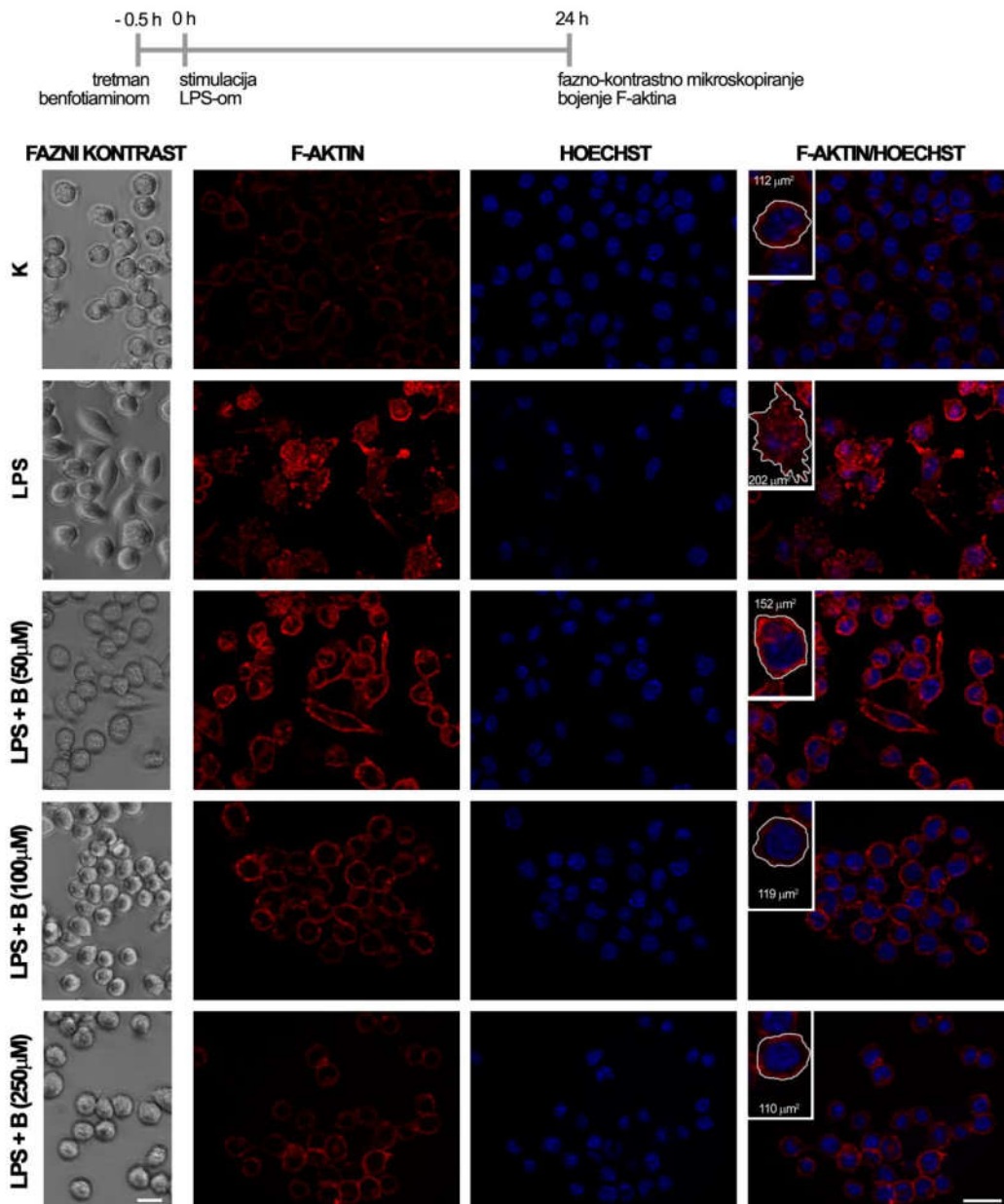
Morfologija ćelija analizirana je fazno-kontrastnim mikroskopiranjem i bojenjem citoskeleta fluorescentno obeleženim faloidinom (Slike 10 i 11). U kontrolnim uslovima, BV-2 ćelije imale su okruglasti oblik, dok su mikrofilamenti difuzno raspoređeni uz membranu ćelija (Slika 10). Benfotiamin nije uticao na oblik i veličinu ćelija. Sa druge strane, stimulacija LPS-om dovela je do drastičnih promena u ćelijskoj morfologiji (Slika 11). Kod ćelija stimuliranih LPS-om došlo je do uvećanja ćelijskog tela i pružanja brojnih nastavaka u različitim pravcima. LPS je indukovao i reorganizaciju mikrofilamenata u snopove nagomilane u nastavcima i izraženim mikroprojekcijama. Tretman benfotiaminom pre stimulacije LPS-om sprečio je morfološke promene i reorganizaciju F-aktina, a ćelije tretirane u koncentraciji 250 µM su izgledale kao u kontrolnoj grupi. Određivanje površine ćelija potvrdilo je da benfotiamin značajno smanjuje LPS-om indukovano uvećanje površine ćelijskog tela (Slika 12).

Kristal violet testom je potvrđeno da benfotiamin ne utiče na broj živih BV-2 ćelija (Slika 13), kako u grupi ćelija stimuliranih LPS-om, tako i u grupi nestimuliranih

ćelija. Stoga je zaključeno da su zabeležene promene ćelijskog indeksa posledica promena morfologije BV-2 ćelija izazvanih reorganizacijom mikrofilamenata. S obzirom na to da promene morfologije prethode aktivaciji mikroglije ovi rezultati ukazuju da benfotiamin može imati potencijalnu antiinflamatornu ulogu.



**Slika 10. Morfologija BV-2 ćelija tretiranih benfotiaminom.** BV-2 ćelije posmatrane su pod faznim kontrastom i bojene faloidinom (crveno) i Hoechst-om (plavo) u kontrolnim uslovima (K) i posle tretmana različitim koncentracijama benfotiamina (B; 50, 100 i 250 μM). Uveličani umetak na slikama pokazuje veličinu ćelija u svakoj grupi, određenu pomoću AxioVisionRel 4.6 softvera. Dužina skale: 20 μm.



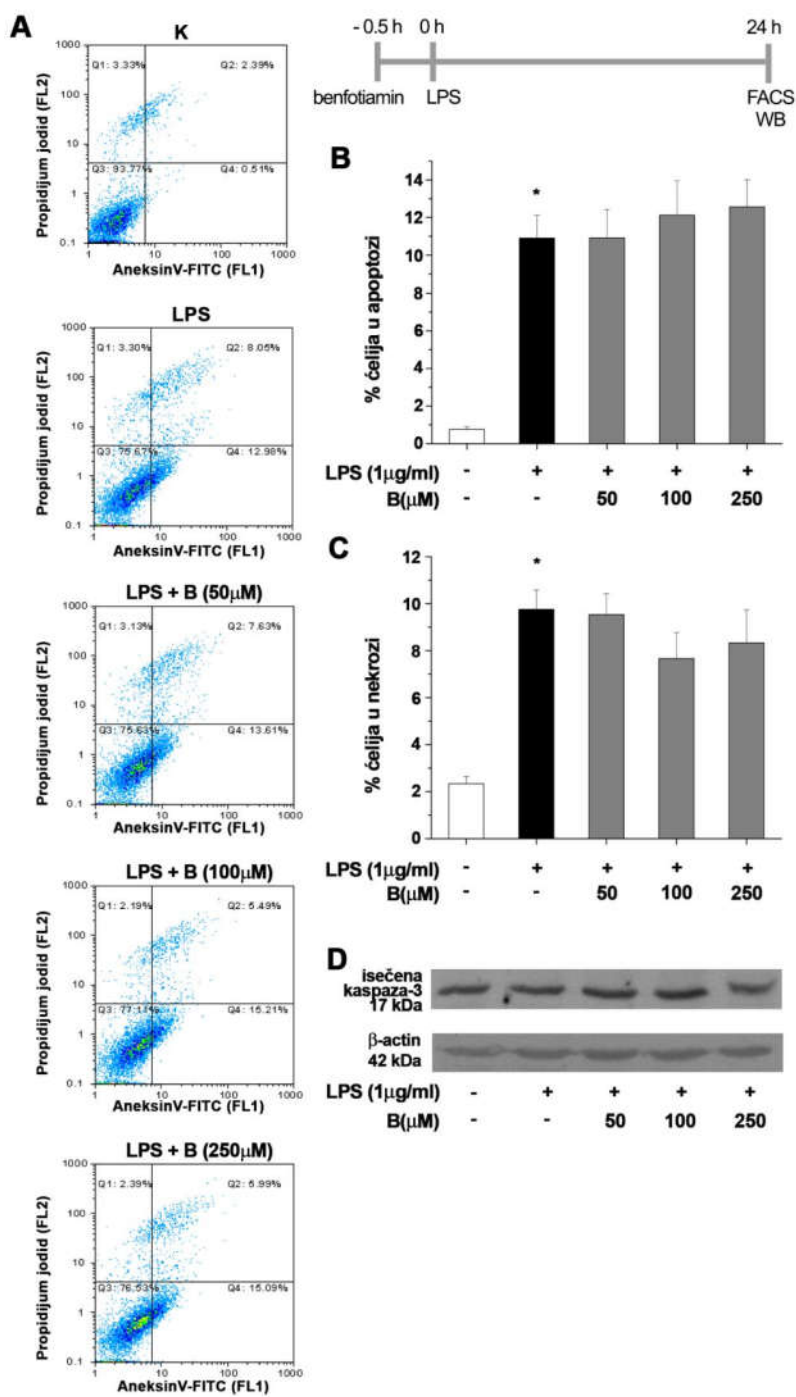
**Slika 11. Efekat benfotiamina na morfologiju LPS-stimuliranih BV-2 ćelija.** Morfologija BV-2 ćelija je analizirana fazno-kontrastnim mikroskopiranjem i bojenjem faloidinom (crveno). Posmatrane su kontrolne ćelije (K), ćelije stimulirane LPS-om (LPS) i ćelije pretretirane različitim koncentracijama benfotiamina pre LPS stimulacije (LPS + B (50  $\mu$ M), LPS + B (100  $\mu$ M), LPS + B (250  $\mu$ M)). Uveličani umetak na slikama pokazuje veličinu ćelija u svakoj grupi, određenu pomoću AxioVisionRel 4.6 softvera. Dužina skale: 20  $\mu$ m.



### 1.3. Ispitivanje ćelijske smrti u kulturi BV-2 mikrogljijskih ćelija

Kolorimetrijski eseji kao što su MTT i KV koriste se za procenu vijabilnosti ćelija, ali ne pružaju informacije o tipu ćelijske smrti – apoptoze i nekroze. S obzirom na to da LPS indukuje apoptozu mikrogljijskih ćelija (Lee i sar., 2001a; Lee i sar., 2001b), urađena je analiza dvostrukim bojenjem fluorescentno obeleženim aneksinom V i propidijum jodidom, kako bi se utvrdilo prisustvo apoptotičnih i/ili nekrotičnih ćelija tokom stimulacije LPS-om i pretretmana benfotiaminom. Aneksin V se vezuje za fosfatidilserin, koji je kod apoptotičnih ćelija izložen sa spoljašnje strane ćelijske membrane, dok propidijum jodid ulazi samo u ćelije koje su izgubile integritet ćelijske membrane. Protočna citofluorimetrija je pokazala da LPS dovodi do umerenog, ali statistički značajnog povećanja broja apoptotičnih (12,98%, Slika 14A i 14B) i nekrotičnih ćelija (8,05%, Slika 14A i 14C) u odnosu na procenat apoptotičnih (0,51 %) i nekrotičnih (2,39 %) ćelija u kontroli. Pretretman benfotiaminom nije doveo do značajnih promena broja ćelija u apoptozu i nekrozu. U skladu sa rezultatima protočne citofluorimetrije, imunoblot analiza je pokazala blago povećanje ekspresije aktivne forme kaspaze 3 kod LPS-om stimuliranih BV-2 ćelija (Slika 14D). Ekspresija ovog enzima koji se aktivira u apoptozu nije se promenila pod tretmanom benfotiaminom. Navedeni rezultati pokazuju da LPS dovodi do blagog povećanja apoptoze i nekroze, dok benfotiamin ne utiče na ove procese.





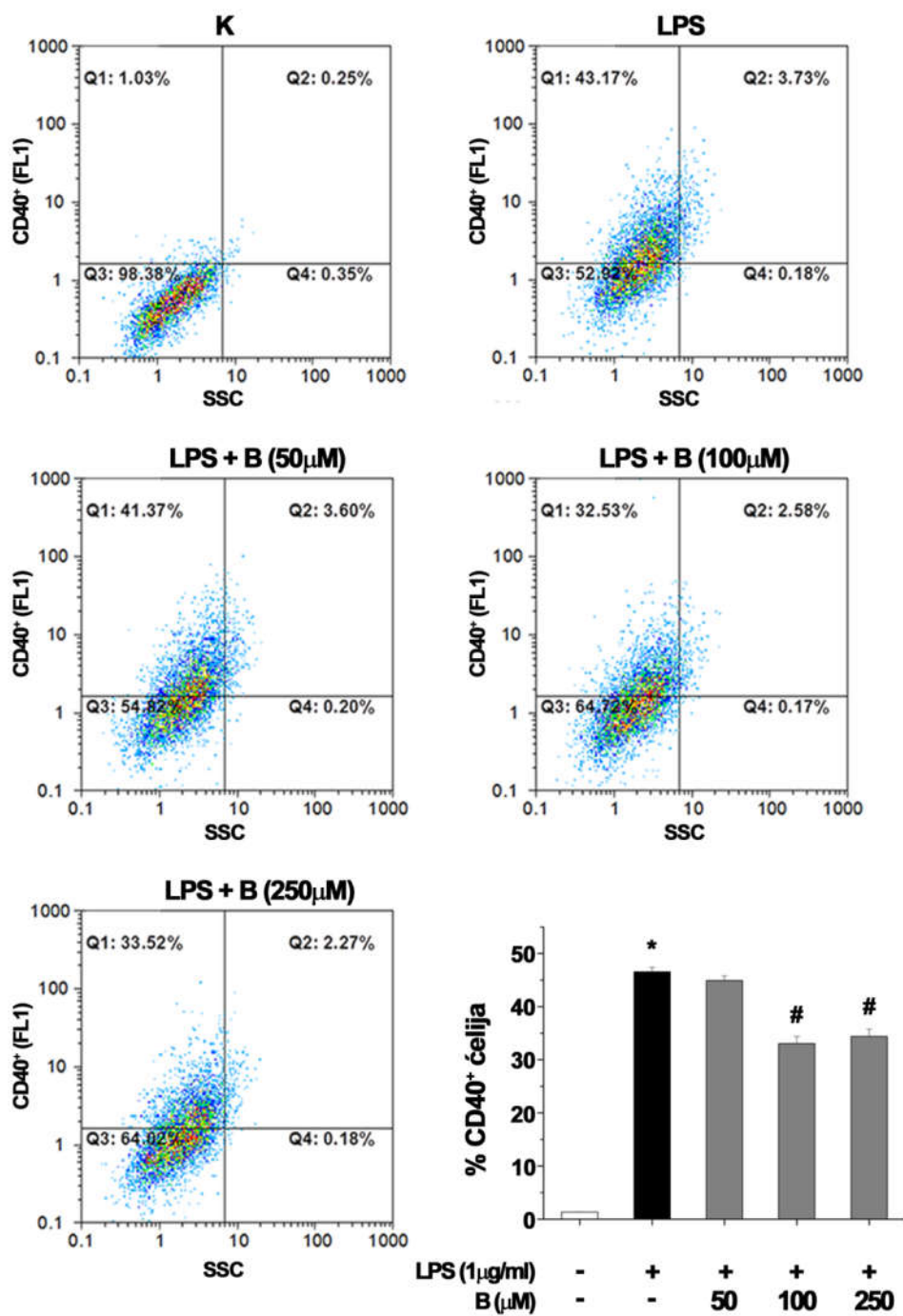
**Slika 14. Efekat pretretmana benfotiaminom na apoptozu i nekrozu u LPS-om stimulisanoj kulturi BV-2 ćelija.** BV-2 ćelije su obojene aneksinom V i propidijum jodidom, a zatim analizirane protočnom citofluorimetrijom. Ćelije obeležene samo aneksinom V su analizirane kao apoptotične, dok su nekrotične ćelije pozitivne na aneksin V i propidijum jodid. Prikazan je reprezentativni od tri nezavisna eksperimenta (A), kao i srednje vrednosti (%) ± SE za apoptotične (B) i nekrotične ćelije (C) iz svih eksperimenata. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu. Aktivnost kaspaze 3 je procenjena imunoblot analizom (D).

## **2. Efekat benfotiamina na sintezu i oslobađanje LPS-om indukovanih proinflamatornih i antiinflamatornih faktora u BV-2 mikroglijskim ćelijama**

Imajući u vidu da je ključni aspekt fenotipa aktivirane mikroglije indukcija inflamatornih medijatora, u ovom delu disertacije ispitan je efekat benfotiamina na LPS-om indukovanu sintezu i oslobađanje seta ključnih proinflamacijskih i antiinflamacijskih molekula (NO, i citokina TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10), ekspresiju enzima uključenih u sintezu proinflamacijskih molekula (iNOS, COX-2), kao i imunoregulatornog receptora CD40, čija indukcija prethodi inflamatornoj aktivaciji mikroglije.

### **2.1. Benfotiamin suprimira ekspresiju receptora CD40**

CD40 je važan imunoregulatorni receptor koji posreduje u neuroinflamatornom odgovoru mikroglije. S obzirom na to da LPS indukuje ekspresiju CD40 (Qin i sar., 2005), proučavan je potencijal benfotiamina da smanji ekspresiju ovog receptora čija aktivacija dovodi do produkcije proinflamatornih molekula (Chen i sar., 2006). Protočnom citofluorimetrijom je utvrđeno da je ekspresija CD40 u netretiranoj grupi ćelija izuzetno niska, i da je oko 1% od analiziranih ćelija eksprimiralo ovaj receptor na membrani (Slika 15). Očekivano, stimulacija LPS-om u trajanju od 24 h je dovela do znatnog povećanja ekspresije CD40 (oko 46% ćelija bilo je pozitivno na CD40). Pretretman benfotiaminom u koncentracijama 100 i 250  $\mu$ M doveo je do statistički značajnog smanjenja CD40 pozitivnih ćelija, na oko 33%. Ovi rezultati ukazuju na antiinflamatorni potencijal benfotiamina, a imajući u vidu ulogu CD40 receptora u pokretanju i održavanju inflamacije, dalje je proučavan efekat benfotiamina na proinflamatorne medijatore koje proizvodi aktivirana mikroglija.

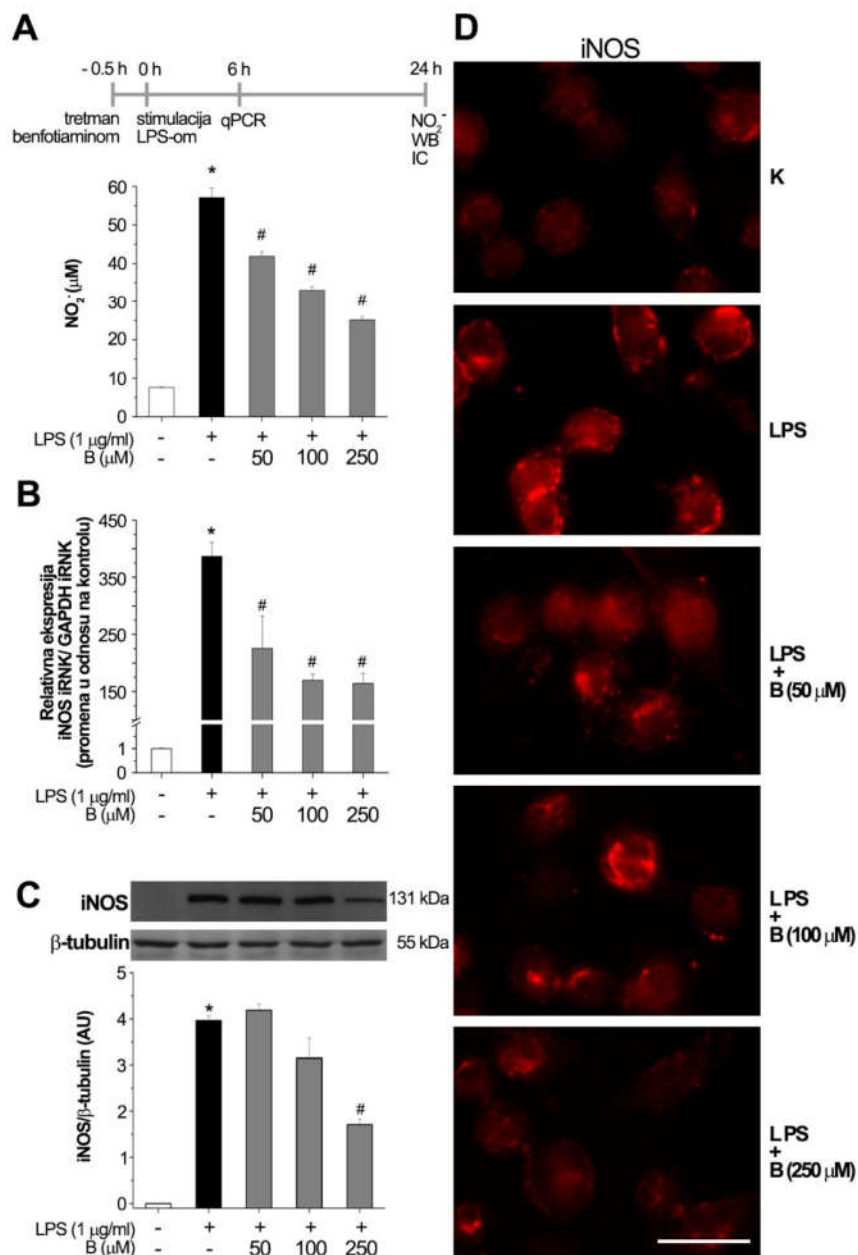


**Slika 15. Efekat benfotiamina na ekspresiju CD40 receptora kod LPS-om stimuliranih BV-2 ćelija.** Ekspresija CD40 analizirana je protočnom citofluorimetrijom u kontrolnoj grupi (K), grupi stimuliranoj LPS-om (LPS) i grupama pretretiranim različitim koncentracijama benfotiamina i potom stimuliranim LPS-om (LPS + B (50 μM); LPS + B (100 μM); LPS + B (250 μM)). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti % CD40 pozitivnih ćelija iz tri nezavisna eksperimenta (± SE). Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimuliranu LPS-om.

## 2.2. Benfotiamin smanjuje produkciju NO

Produkcija NO izmerena je posredno, određivanjem koncentracije  $\text{NO}_2^-$  Grisovom metodom, u supernatantima BV-2 mikrogljijskih kultura. S obzirom na to da je NO nestabilan molekul, teško je direktno odrediti njegovu koncentraciju. Stoga se meri koncentracija njegovih metabolita  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$ , pri čemu se  $\text{NO}_3^-$  prvo redukuje do  $\text{NO}_2^-$  pomoću metalnog kadmijuma. Kao što je i očekivano, u kulturama stimulisanim LPS-om došlo je do drastičnog skoka produkcije NO u poređenju sa kontrolom (Slika 16A). Sa druge strane, pretretman benfotiaminom je na dozno-zavisani način smanjio akumulaciju nitrita, čak za 50% u najvišoj koncentraciji.

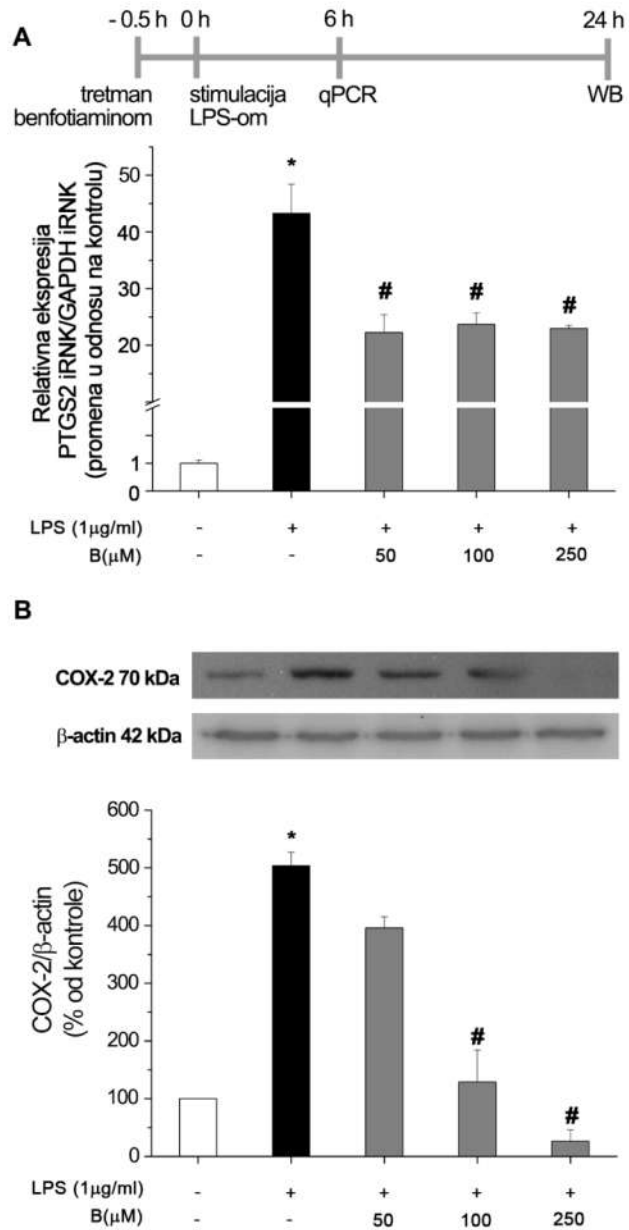
Imajući u vidu da NO u mikroglji nastaje katalitičkom aktivnošću iNOS-a, u narednom eksperimentu ispitana je ekspresija iNOS-a na genskom i proteinskom nivou. BV-2 ćelije su pretretirane benfotiaminom i stimulirane LPS-om, a nakon 6 h izolovana je RNK, i ekspresija gena za iNOS je analizirana qPCR metodom. Proteinska ekspresija je analizirana 24 h posle tretmana, imunoblot metodom, kao i posmatranjem imunofluorescentno obeleženih ćelija. Stimulacija LPS-om dovela je do izraženog povećanja iRNK za iNOS, dok je pretretman benfotiaminom efikasno smanjio količinu iNOS iRNK, u svim primenjenim koncentracijama (Slika 16B). Benfotiamin je u koncentraciji od 250  $\mu\text{M}$  suprimirao i proteinsku ekspresiju ovog enzima (Slika 16C, 16D). Uzevši u obzir navedene rezultate može se zaključiti da benfotiamin uspešno smanjuje produkciju toksičnog proinflatornog medijatora NO, izazvanu LPS stimulacijom mikroglije, suprimirajući ekspresiju gena i proteina za iNOS.



**Slika 16. Uticaj benfotiamina na produkciju NO i ekspresiju iNOS-a na genskom i proteinskom nivou kod LPS-om stimulisanih ćelija.** NO produkcija je određena modifikovanom Grisovom metodom (A). Ekspresija iNOS iRNK je određena qPCR metodom. Rezultati su analizirani pomoću  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode i ekspresija iNOS iRNK je izražena u odnosu na ekspresiju GAPDH iRNK u istom uzorku, a zatim su dobijene vrednosti izražene u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1 (B). Ekspresija iNOS proteina je analizirana imunoblot metodom i prikazan je reprezentativni blot. Kvantifikacija je izvršena u ImageQuant 5.2 programu, a vrednosti optičkih gustina traka korigovane su u odnosu na odgovarajuće optičke gustine za  $\beta$ -tubulin i rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani u AU  $\pm$  SE (C). Imunofluorescentno obeležavanje iNOS enzima na BV-2 ćelijama (D). Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om. Dužina skale: 20  $\mu$ m.

### 2.3. Benfotiamin inhibira ekspresiju COX-2

COX-2 je inducibilni enzim čija ekspresija raste u uslovima inflamacije. Imajući u vidu njegovu ulogu u nastanku proinflamatornog medijatora PGE<sub>2</sub>, u sledećem eksperimentu analizirana je ekspresija gena *PTGS2* i COX-2 proteina u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om. Ekspresija *PTGS2* gena porasla je više od 40 puta kod LPS-om stimulisanih ćelija u odnosu na kontrolu (Slika 17A). Sa druge strane, pretretman benfotiaminom smanjio je ovaj efekat LPS stimulacije, na približno 50%, u svim korišćenim koncentracijama. Efekat benfotiamina uočen je i na nivou ekspresije COX-2 proteina u koncentracijama 100 i 250 μM (Slika 17B).



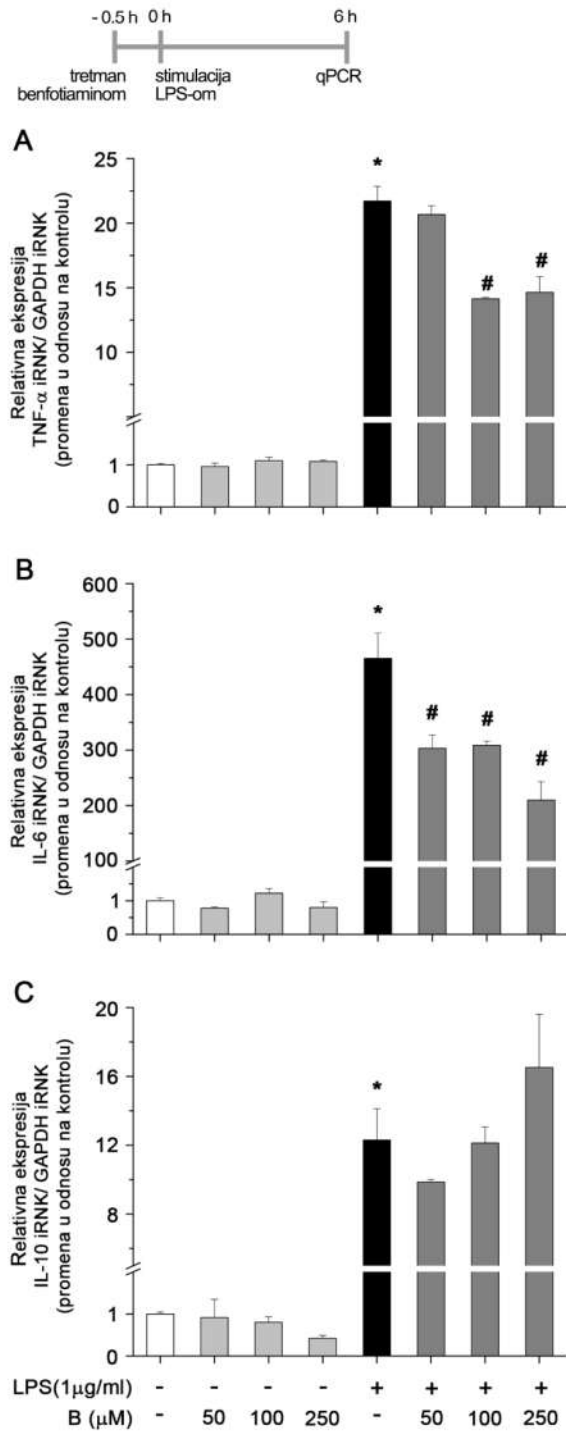
**Slika 17. Ekspresija *PTGS2* gena i COX-2 proteina.** Ekspresija iRNA za *PTGS2* određena je qPCR metodom i analizirana pomoću  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode. Nivo ekspresije *PTGS2* iRNA izražen je u odnosu na nivo *GAPDH* iRNA u istom uzorku. Nivo ekspresije u svakom uzorku normalizovan je u odnosu na kontrolu (1) (A). Ekspresija COX-2 proteina je analizirana imunoblot metodom. Prikazan je reprezentativni blot kao i rezultati denzitometrijske analize. Vrednosti optičkih gustina traka na imunoblotu korigovane su u odnosu na odgovarajuće optičke gustine za  $\beta$ -aktin, a potom normalizovane u odnosu na kontrolu (100%) (B). Na graficima su predstavljene srednje vrednosti ekspresije iz tri različita eksperimenta  $\pm$  SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

#### 2.4. Benfotiamin moduliše sintezu i oslobađanje citokina

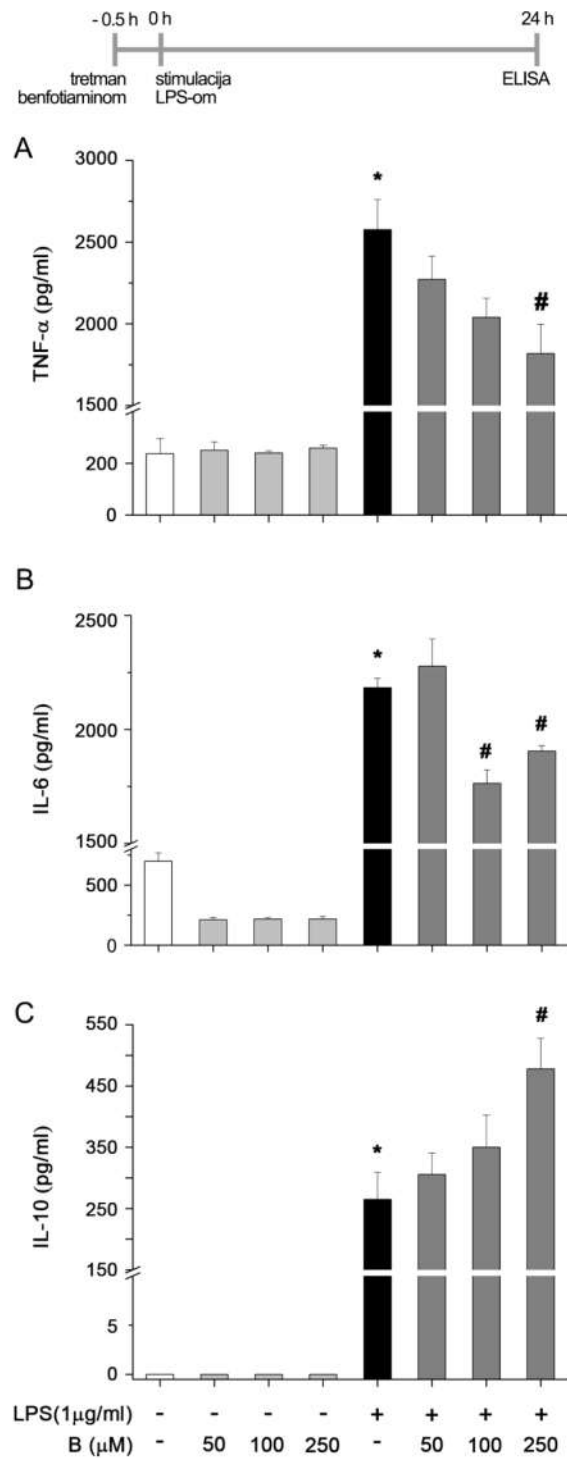
Imajući u vidu da citokini igraju centralnu ulogu u pokretanju i održavanju inflamatornog stanja povezanog sa aktivacijom mikroglije, ispitan je efekat benfotiamina na sintezu i produkciju proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, kao i antiinflammatoryh citokina IL-10. Sinteza ovih citokina praćena je na genskom nivou qPCR metodom 6 h posle tretmana, a njihovo oslobađanje u supernatantima kultura ELISA tehnikom, 24 h po završetku tretmana. Da bi utvrdili da li tretman benfotiaminom ostvaruje uticaj na mikroglijske ćelije u uslovima kada inflamacija nije prisutna, efekat benfotiamina je procenjen prvo u nestimulisanim kulturama, a zatim i u ćelijama koje su stimulisane LPS-om.

U kontrolnim kulturama ekspresija svih transkripata je svedena u odnosu na internu kontrolu GAPDH, i dodeljena im je arbitrarna vrednost 1. U nestimulisanim BV-2 kulturama, benfotiamin nije uticao na gensku ekspresiju TNF- $\alpha$  (Slika 18A), IL-6 (Slika 18B) i IL-10 (Slika 18C). Međutim, u ćelijama stimulisanim LPS-om došlo je do višestrukog povećanja ekspresije gena svih analiziranih citokina. Sa druge strane, tretman benfotiaminom je značajno smanjio sintezu proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  (u koncentracijama 100 i 250  $\mu$ M) i IL-6 (u svim korišćenim koncentracijama) u ćelijama stimulisanim LPS-om. Premda je benfotiamin pokazao težnju da poveća nivo transkripta za IL-10 u poređenju sa grupom stimulisanom LPS-om, statistički značajna razlika nije registrovana. Oslobađanje proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  (Slika 19A) i IL-6 (Slika 19B) je u kontrolnim uslovima bilo na bazalnom nivou, dok je produkcija IL-10 bila ispod granice detekcije (Slika 19C). Očekivano, u ćelijama stimulisanim LPS-om došlo je do intenzivnog oslobađanja svih analiziranih citokina. Efekat benfotiamina na produkciju citokina u ćelijama stimulisanim LPS-om je bio u skladu sa njegovim efektom na transkripte za ove proteine. Benfotiamin značajno smanjuje produkciju TNF- $\alpha$  (u koncentraciji 250  $\mu$ M), kao i produkciju IL-6 (u koncentracijama 100  $\mu$ M i 250  $\mu$ M). U kontrolnim kulturama i kulturama tretiranim benfotiaminom nije zabeleženo oslobađanje IL-10, dok su ćelije stimulisane LPS-om produkovale IL-10. Iako nije pokazao statistički značajan efekat na gensku ekspresiju za IL-10, benfotiamin u koncentraciji 250  $\mu$ M efikasno povećava produkciju ovog antiinflammatoryh citokina u ćelijama stimulisanim LPS-om.





**Slika 18. Uticaj benfotiamina na ekspresiju citokina na nivou iRNA.** Efekat benfotiamina na ekspresiju iRNA za TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) i IL-10 (C) praćen je qRT-PCR metodom, u nestimulisanoj kulturi i kulturi stimulisanoj LPS-om. Nivo ekspresije iRNA za citokina izražen je u odnosu na nivo GAPDH iRNA u istom uzorku, a zatim normalizovan u odnosu na kontrolu (1). Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta  $\pm$  SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.



**Slika 19. Uticaj benfotiamina na oslobađanje citokina.** Koncentracije TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) i IL-10 (C) su određene ELISA metodom, u supernatantima nestimuliranih i LPS-om stimuliranih BV-2 kultura. Rezultati su prikazani u pg/ml, kao srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta  $\pm$  SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

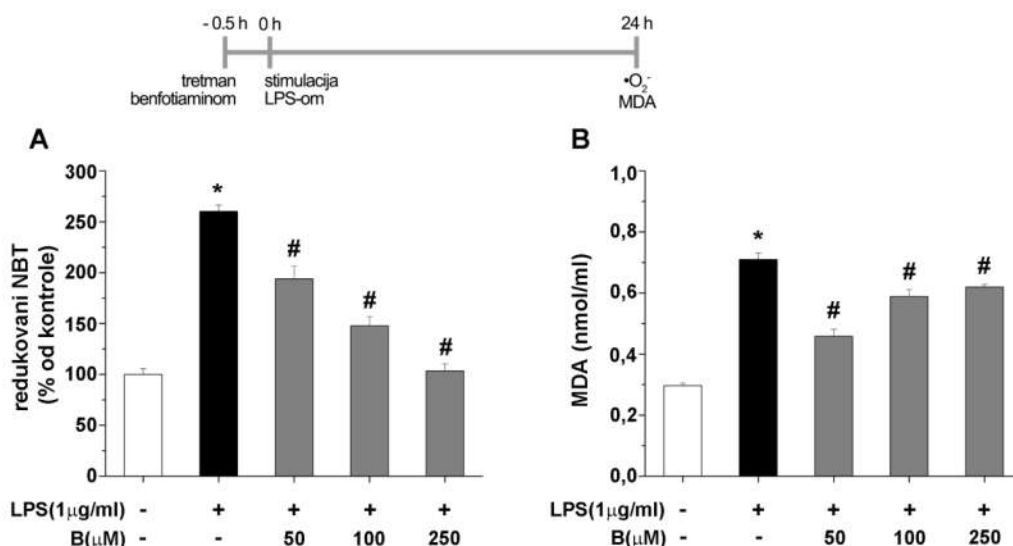
Kada se razmotre navedeni rezultati, može da se zaključi da benfotiamin ostvaruje antiinflamatorni uticaj u ćelijama stimulisanim LPS-om, smanjući sintezu i produkciju proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, dok istovremeno povećava produkciju antiinflamatornog citokina IL-10.

### **3. Ispitivanje efekta benfotiamina na antioksidativni sistem LPS-om stimulisanih BV-2 mikrogljijskih ćelija**

Imajući u vidu da je aktivacija mikroglije praćena povećanjem nivoa oksidativnog stresa, u narednoj grupi eksperimenata izučena je sposobnost benfotiamina da moduliše nivo oksidativnog stresa u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om. Kao indikacija oksidativnog stresa poslužili su nivoi reaktivnih vrsta ( $\bullet\text{O}_2^-$  i MDA), ekspresija enzima antioksidativne zaštite (MnSOD, CAT, GPx i GR), aktivnost enzima antioksidativne zaštite (MnSOD, Cu,ZnSOD, CAT, GPx i GR) i sadržaj antioksidativnog molekula glutationa u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om.

#### **3.1. Benfotiamin smanjuje produkciju reaktivnih vrsta**

LPS je indukovao snažan oksidativni stres u BV-2 ćelijama, povećavajući koncentraciju  $\bullet\text{O}_2^-$  više od 2,5 puta u odnosu na kontrolu (Slika 20A). Pretretman benfotiaminom je na dozno-zavisani način smanjio produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$ , pri čemu je koncentracija 250  $\mu\text{M}$  vratila LPS-indukovanu produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$  na kontrolni nivo. Osim toga, u aktiviranim ćelijama zabeleženo je i dvostruko povećanje koncentracije MDA (Slika 20B), ključnog pokazatelja lipidne peroksidacije ( $0,71 \pm 0,02$  nmol/ml, u odnosu na  $0,30 \pm 0,01$  nmol/ml u kontroli). Pretretman benfotiaminom je značajno smanjio nivo MDA u ćelijama stimulisanim LPS-om, u svim primenjenim koncentracijama (50  $\mu\text{M}$ :  $0,46 \pm 0,02$  nmol/ml; 100  $\mu\text{M}$ :  $0,59 \pm 0,02$  nmol/ml; 250  $\mu\text{M}$ :  $0,62 \pm 0,01$  nmol/ml). Dobijeni rezultati ukazuju na snažna antioksidativna svojstva benfotiamina koja se ispoljavaju direktnom detoksifikacijom reaktivnih vrsta.



**Slika 20. Efekat benfotiamina na nivo •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i MDA u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om.** (A) Koncentracija •O<sub>2</sub><sup>-</sup> određena je praćenjem NBT redukcije. Rezultati su izraženi kao procenat redukovano NBT u odnosu na kontrolu (100%). (B) Nivo MDA (nmol/ml) određen je pomoću tiobarbituratnog eseja. . Stubići predstavljaju srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta ± SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \**p* < 0,05 u odnosu na kontrolu, #*p* < 0,05 u odnosu na LPS grupu.

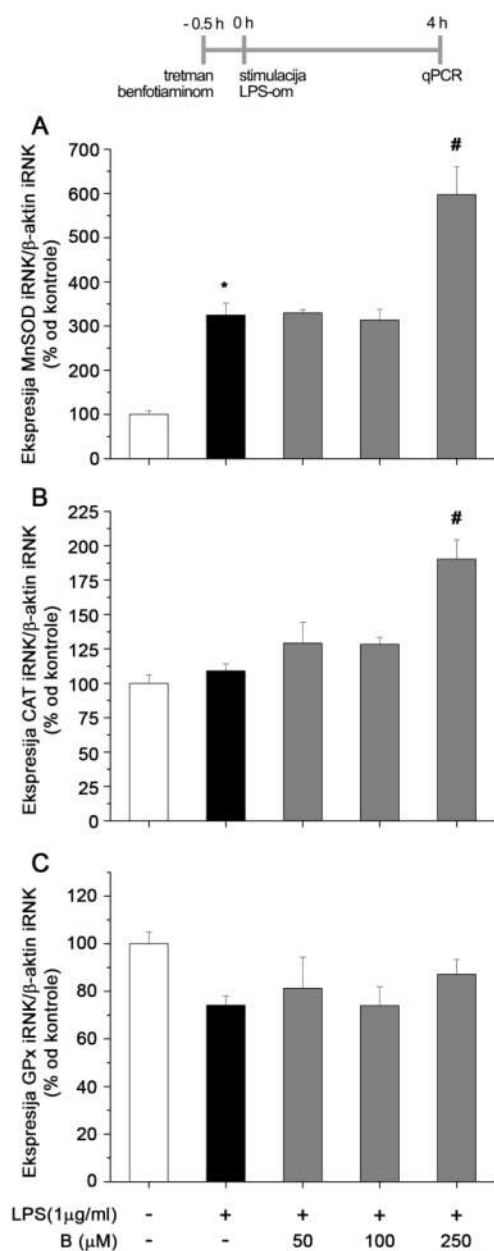
### 3.2. Benfotiamin moduliše ekspresiju enzima antioksidativne zaštite

U daljoj analizi antioksidativnih svojstava benfotiamina ispitivan je njegov uticaj na gensku ekspresiju enzima neophodnih u odbrani protiv oksidativnog stresa, MnSOD, CAT i GPx. MnSOD učestvuje u prvoj liniji antioksidativne odbrane i uklanja •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, pri čemu nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji se dalje detoksifikuje u vodu pod dejstvom CAT i GPx. Transkripti za ove enzime praćeni su qPCR metodom, 4 h posle stimulacije LPS-om.

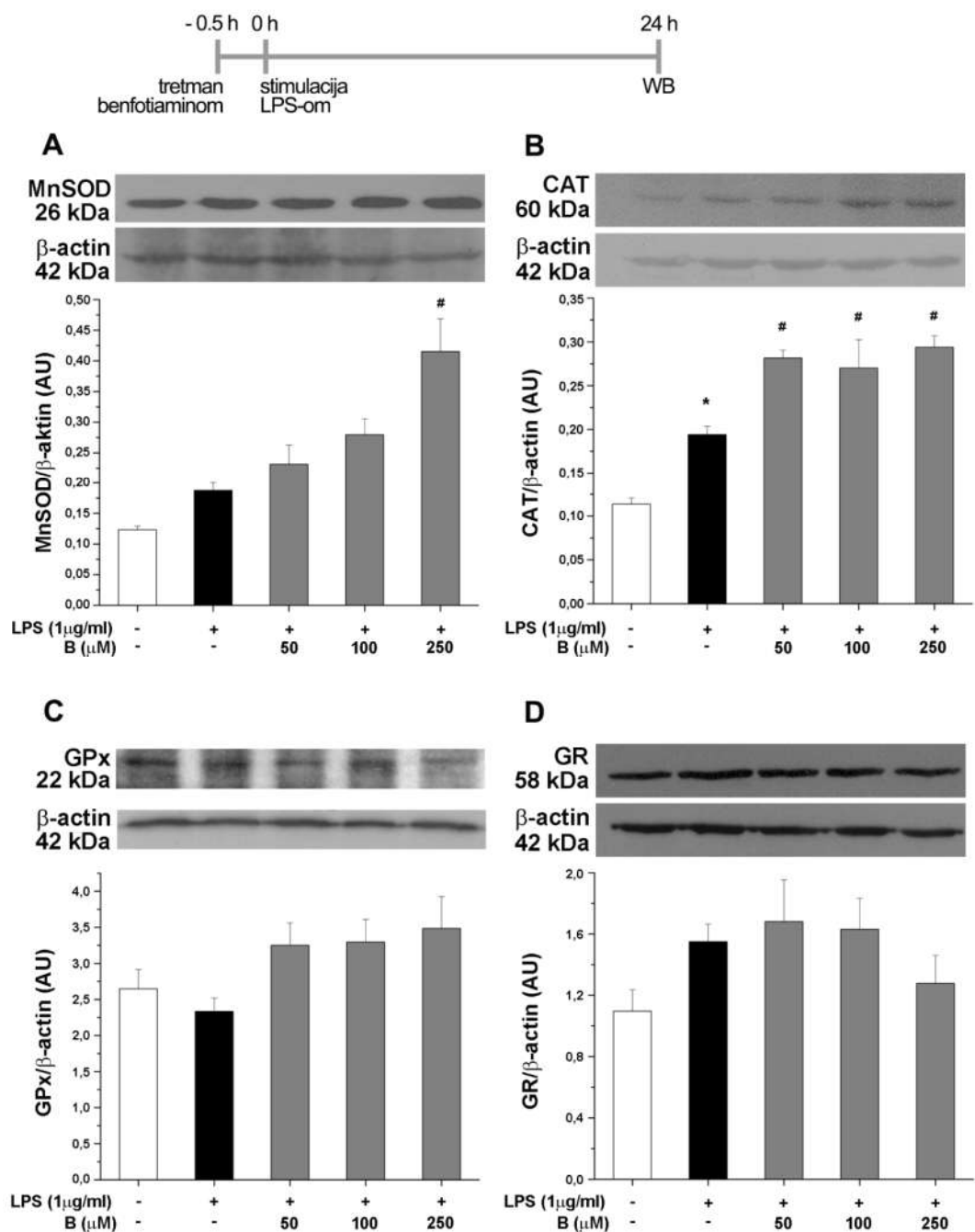
Stimulacija LPS-om je dovela do značajnog porasta ekspresije gena za MnSOD (Slika 21A), 320% u odnosu na kontrolu, što upućuje na povećanu antioksidativnu odbranu. Tretman benfotiaminom u koncentracijama od 50 i 100 μM nije izazvao promene, dok je koncentracija 250 μM značajno povećala količinu MnSOD transkripta (597,6 ± 62,6 %). Ekspresija gena za CAT nije se promenila pod stimulacijom LPS-om (Slika 21B), kao ni kada su ćelije pretretirane benfotiaminom u koncentracijama 50 i 100 μM. Međutim, posle tretmana benfotiaminom u koncentraciji 250 μM, količina transkripta za CAT se uvećala gotovo dva puta (190,4 ± 13,9 %) u odnosu na grupu

stimulisanu LPS-om. Primenjeni tretmani nisu uticali na ekspresiju gena za GPx (Slika 21C). Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da su antioksidativna svojstva benfotiamina delom posredovana indukcijom ekspresije antioksidativnih enzima, MnSOD i CAT.

Proteinska ekspresija antioksidativnih enzima, MnSOD, CAT, GPx i GR, praćena je imunoblot metodom. Svi enzimi su detektovani na bazalnom nivou u kontrolnoj grupi ćelija (Slika 22). LPS nije značajno uticao na ekspresiju proteina za MnSOD (Slika 22A). Nasuprot tome, pretretman benfotiaminom u koncentraciji 250  $\mu$ M je snažno indukovao ekspresiju MnSOD, povećavajući dvostruko nivo ovog proteina u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om. Ovaj efekat benfotiamina je bio u skladu sa prethodno pokazanim uticajem na ekspresiju iRNK za MnSOD. Za razliku od MnSOD, ekspresija CAT se značajno uvećala posle stimulacije BV-2 ćelija LPS-om (Slika 22B). Benfotiamin je dodatno povećao ekspresiju CAT, u svim primenjenim koncentracijama. Sa druge strane, primenjeni tretmani nisu uticali na proteinsku ekspresiju enzima uključenih u metabolizam glutaciona, GPx (Slika 22C) i GR (Slika 22D).



**Slika 21. Efekat benfotiamina na ekspresiju antioksidativnih enzima na nivou iRNK u ćelijama stimulisanim LPS-om.** Ekspresija iRNK za MnSOD (A), CAT (B) i GPx (C) određena je qPCR metodom. Rezultati su analizirani pomoću  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode i ekspresija iRNK za enzime je izražena u odnosu na ekspresiju iRNK  $\beta$ -aktina u istom uzorku, a zatim su dobijene vrednosti izražene u odnosu na kontrolnu grupu (100%). Stubići predstavljaju srednje vrednosti (%) iz tri različita eksperimenta ( $\pm$  SE). Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.



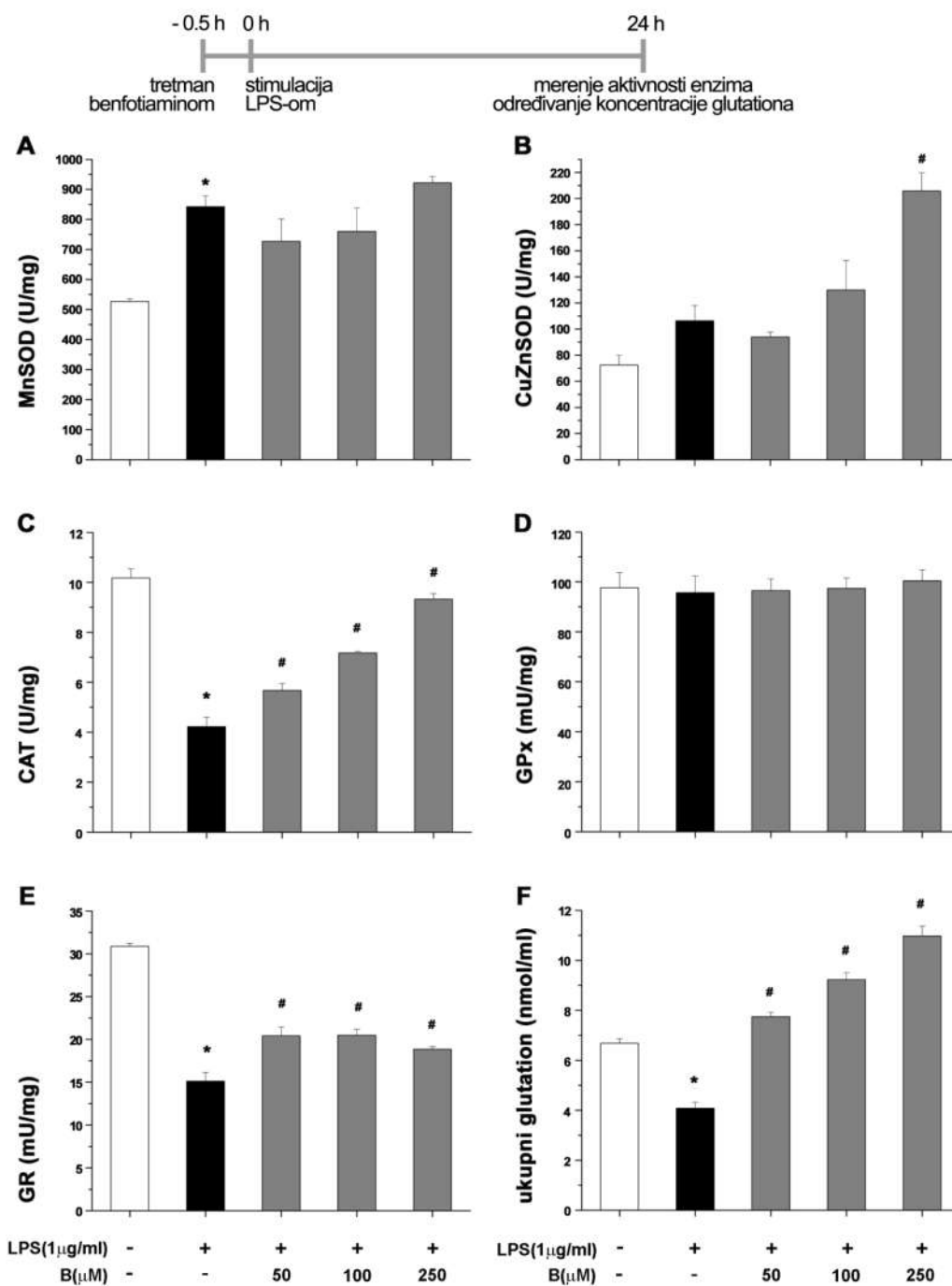
**Slika 22. Efekat benfotiamina na proteinsku ekspresiju antioksidativnih enzima u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om.** Ekspresija proteina za MnSOD (A), CAT (B), GPx (C) i GR (D) određena je imunoblot metodom. Relativne vrednosti dobijene denzitometrijskom analizom traka za ciljani protein su korigovane u odnosu na vrednosti dobijene za β-aktin u istom bunariću i prikazane u AU. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, a rezultati predstavljeni stubićima su srednje vrednosti ± SE iz tri nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

### **3.3. Benfotiamin povećava aktivnost antioksidativnih enzima i sadržaj glutaciona**

U cilju rasvetljavanja antioksidativnih svojstava benfotiamina ispitane su aktivnosti antioksidativnih enzima MnSOD, Cu,ZnSOD, CAT, GPx, GR, kao i koncentracija ukupnog glutaciona. Bazalna aktivnost MnSOD u nestimulisanoj grupi ćelija je iznosila  $526,9 \pm 8,5$  U/mg, dok je posle stimulacije LPS-om uvećana na  $842,5 \pm 36,1$  U/mg (Slika 23A). Iako je pokazano da benfotiamin povećava ekspresiju ovog enzima, izostaje njegov uticaj na aktivnost MnSOD. Nasuprot tome, benfotiamin u koncentraciji  $250 \mu\text{M}$  dvostruko povećava aktivnost Cu,ZnSOD (Slika 23B). Zanimljivo je da stimulacija LPS-om ne ostvaruje statistički značajan efekat na aktivnost ovog enzima. Bazalna aktivnost CAT ( $10,2 \pm 0,4$  U/mg) je više nego upola smanjena pod uticajem LPS-a ( $4,2 \pm 0,4$  U/mg, Slika 23C), dok benfotiamin dozno-zavisno povećava ovu aktivnost, i u koncentraciji  $250 \mu\text{M}$  je vraća na kontrolni nivo ( $9,3 \pm 0,2$  U/mg). Aktivnost GPx, se ne menja ni u jednom od primenjenih tretmana, slično genskoj i proteinskoj ekspresiji (Slika 23D). Mada nije zabeležen efekat tretmana na ekspresiju GR proteina, LPS i benfotiamin ubedljivo menjaju aktivnost ovog enzima (Slika 23E). Bazalna aktivnost GR ( $30,9 \pm 0,4$  mU/mg) je upola smanjena posle LPS stimulacije ( $15,1 \pm 1,0$  mU/mg). Sa druge strane, pretretman benfotiaminom u svim primenjenim koncentracijama značajno povećava aktivnost GR u stimulisanim ćelijama ( $50 \mu\text{M}$ :  $20,4 \pm 1,0$  mU/mg;  $100 \mu\text{M}$ :  $20,5 \pm 0,7$  mU/mg;  $250 \mu\text{M}$ :  $18,9 \pm 0,3$  mU/mg).

Koncentracija ukupnog glutaciona, glavnog antioksidansa u mikroglijskim ćelijama, je u nestimulisanim ćelijama iznosila  $6,7 \pm 0,2$  nmol/ml (Slika 23F). LPS je smanjio sadržaj glutaciona na  $4,1 \pm 0,2$  nmol/ml, dok je benfotiamin povećao koncentraciju glutaciona u aktiviranim ćelijama u svim primenjenim koncentracijama, premašivši vrednosti u kontroli ( $50 \mu\text{M}$ :  $7,8 \pm 0,2$  nmol/ml;  $100 \mu\text{M}$ :  $9,2 \pm 0,3$  nmol/ml;  $250 \mu\text{M}$ :  $11,0 \pm 0,4$  nmol/ml).



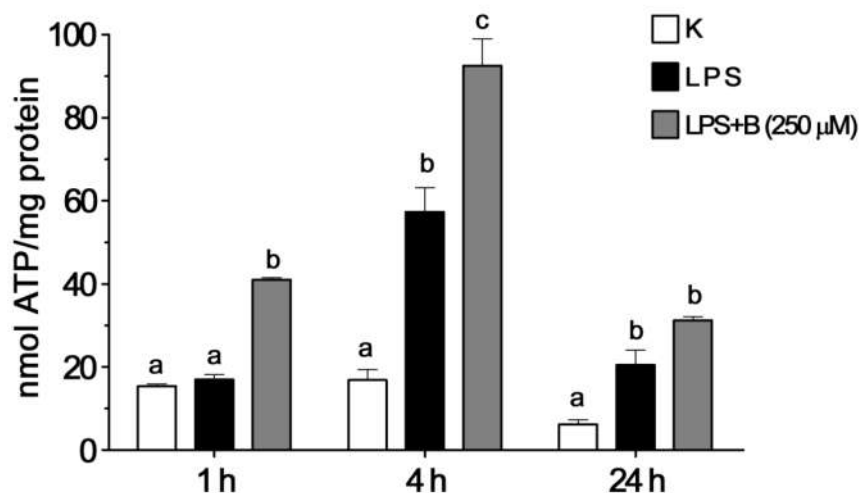


**Slika 23.** Efekat benfotiamina na aktivnost antioksidativnih enzima i sadržaj ukupnog glutatona u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om. Aktivnosti MnSOD (A), Cu,ZnSOD (B), CAT (C), GPx (D), GR (E) određene su u BV-2 ćelijama, a rezultati su izraženi u specifičnim jedinicama aktivnosti enzima (U/mg proteina). Koncentracija ukupnog glutatona izražena je u nmol/ml (F). Rezultati prikazani stubićima predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE iz tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

### 3.4. Benfotiamin povećava sadržaj ATP-a u BV-2 ćelijama

Imajući u vidu da je koncentracija ATP-a indikator energetskeg statusa ćelija, kao i da promene u nivou ATP-a mogu signalizirati promene u broju i aktivnosti mitohondrija, u sledećem eksperimentu je analizirana koncentracija ATP-a u BV-2 ćelijama posle stimulacije LPS-om i pretretmana benfotiaminom. Koncentracija ATP-a u BV-2 ćelijama određena je 1 h, 4 h i 24 h posle stimulacije LPS-om (Slika 24). Nivo ATP-a je povećan 4 h posle stimulacije LPS-om ( $57,3 \pm 5,9$  nmol/mg u odnosu na  $16,8 \pm 2,5$  nmol/mg u kontroli), a ostao je povišen i 24 h kasnije ( $20,5 \pm 3,6$  nmol/mg u odnosu na  $6,2 \pm 1,1$  nmol/mg u kontroli). Iako LPS nije imao efekat 1 h posle stimulacije, pretretman benfotiaminom u koncentraciji od  $250 \mu\text{M}$  snažno je povećao unutarćelijsku koncentraciju ATP-a u istoj vremenskoj tački ( $41,0 \pm 0,5$  nmol/mg u odnosu na  $15,4 \pm 0,5$  nmol/mg u kontroli). Ovaj trend je nastavljen i posle 4 h ( $92,5 \pm 6,5$  nmol/mg). Međutim, efekat benfotiamina je manje izražen 24 h kasnije kada je unutarćelijski sadržaj ATP-a u nivou grupe stimulisane LPS-om ( $31,2 \pm 0,9$  nmol/mg). Povećanje koncentracije ATP-a pod primenjenim tretmanima upućuje na zaključak da u BV-2 ćelijama dolazi do promene u broju odnosno aktivnosti mitohondrija.

U celini, navedeni rezultati pokazuju da su ćelije izložene LPS stimulaciji pod većim oksidativnim stresom, dok tretman benfotiaminom povećava antioksidativni potencijal ovih ćelija, indukujući ekspresiju i aktivnost antioksidativnih enzima sa jedne, i direktno smanjujući štetne oksidative vrste sa druge strane. Takođe, benfotiamin povećava koncentraciju ukupnog glutaciona čime je ćelijama olakšana borba sa oksidativnim vrstama, a podiže i sadržaj ATP-a što poboljšava njihov energetske status.



**Slika 24. Nivo ATP-a u BV-2 ćelijama posle stimulacije LPS-om i pretretmana benfotiaminom.** Koncentracija ATP-a je određena primenom bioluminiscentnog eseja, 1 h, 4 h i 24 h posle stimulacije LPS-om. Za svaku vremensku tačku su prikazane izmerene koncentracije ATP u kontrolnim uslovima (K), u ćelijama stimulisanim LPS-om (LPS) i ćelijama pretretiranim benfotiaminom u koncentraciji 250 μM, a zatim stimulisanim LPS-om (LPS+B(250 μM)). Stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije ATP (nmol/mg proteina) iz tri nezavisna eksperimenta ( $\pm$  SE) izvedena u duplikatu. Nivo statističke značajnosti između grupa je označen slovima, grupe koje se međusobno statistički razlikuju ne dele isto slovo ( $p < 0,05$ ).

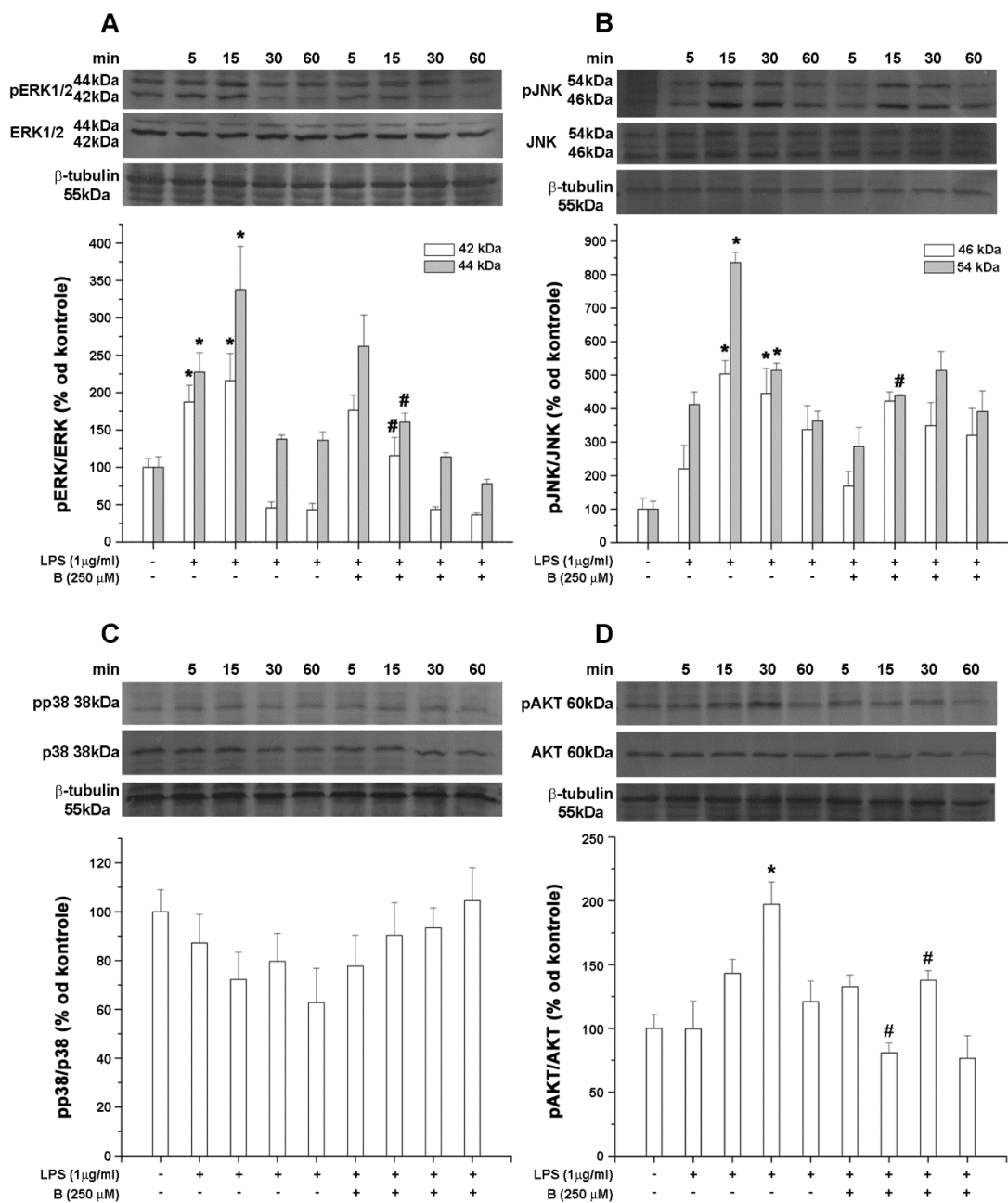
#### 4. Ispitivanje signalnih puteva delovanja benfotiamina u BV-2 ćelijama

Naredni eksperimenti imali su za cilj ispitivanje signalnih puteva u ispoljavanju antiinflamatornog i antioksidativnog efekta benfotiamina. Analiziran je uticaj benfotiamina na fosforilaciju MAPK i Akt kinaze, budući da je poznato da se ove signalne kaskade aktiviraju u mikroglijskim ćelijama u odgovoru na LPS i da njihova aktivacija dovodi do povećane ekspresije proinflamatornih citokina i iNOS enzima. Takođe, analizirana je aktivacija NF-κB, imajući u vidu da ovaj transkripcioni faktor reguliše transkripciju proinflamatornih molekula.

#### **4.1. Benfotiamin moduliše LPS-indukovanu aktivaciju MAPK i Akt signalnih puteva**

BV-2 ćelije su pretretirane benfotiaminom i stimulisane LPS-om 5, 15, 30 i 60 minuta, a zatim su ćelije lizirane i fosforilacija ERK, JNK, p38 i Akt kinaze je analizirana imunoblot metodom (Slika 25). Ovaj vremenski interval izabran je s obzirom na to da su aktivacija MAPK i Akt rani događaji, inicirani neposredno nakon delovanja LPS-a. Više vremenskih tačaka izabrano je sa ciljem da se analizira potencijal benfotiamina da spreči aktivaciju posmatranih kaskada. LPS snažno aktivira obe ERK subjedinice (Slika 25A). Statistički značajno povećanje stepena fosforilacije obe kinaze uočeno je 5 i 15 minuta nakon stimulacije LPS-om, dok se u kasnijim vremenima stepen fosforilacije vraća na kontrolni nivo. Benfotiamin efikasno smanjuje LPS-indukovanu fosforilaciju 15 minuta nakon aktivacije, kada je uočen maksimalan efekat LPS-a. U mikrogliji stimulisanoj LPS-om uočeno je statistički značajno povećanje stepena fosforilacije JNK-a (Slika 25B), a maksimalan efekat postignut je 15 minuta nakon stimulacije, kada se nivo p46 i p54 subjedinica povećava na 440%, odnosno, 840% od kontrole. Fosforilacija JNK izražena je i 30 minuta nakon stimulacije LPS-om, posle čega se nivo fosforilacije vraća na kontrolni. U ćelijama pretretiranim benfotiaminom stepen fosforilacije p54 subjedinice je gotovo upola manji (440%) u odnosu na ćelije stimulisane LPS-om, dok se stepen fosforilacije p46 subjedinice nije promenio. U BV-2 ćelijama LPS ne menja nivo aktivacije p38 kinaze u posmatranom vremenskom intervalu, pa očekivano, pretretman benfotiaminom ostaje bez efekta (Slika 25C). Kada je reč o Akt kinazi, aktivacija je uočena 30 minuta nakon stimulacije LPS-om (200% u odnosu na kontrolu), dok je u ćelijama pretretiranim benfotiaminom aktivacija Akt kinaza potpuno izostala (Slika 25D).

Na osnovu prikazanih rezultata može da se zaključi da benfotiamin smanjuje stepen aktivacije ERK, JNK i Akt kinaza u ćelijama stimulisanim LPS-om i da su nishodni antiinflamatorni efekti verovatno posredovani navedenim signalnim putevima.



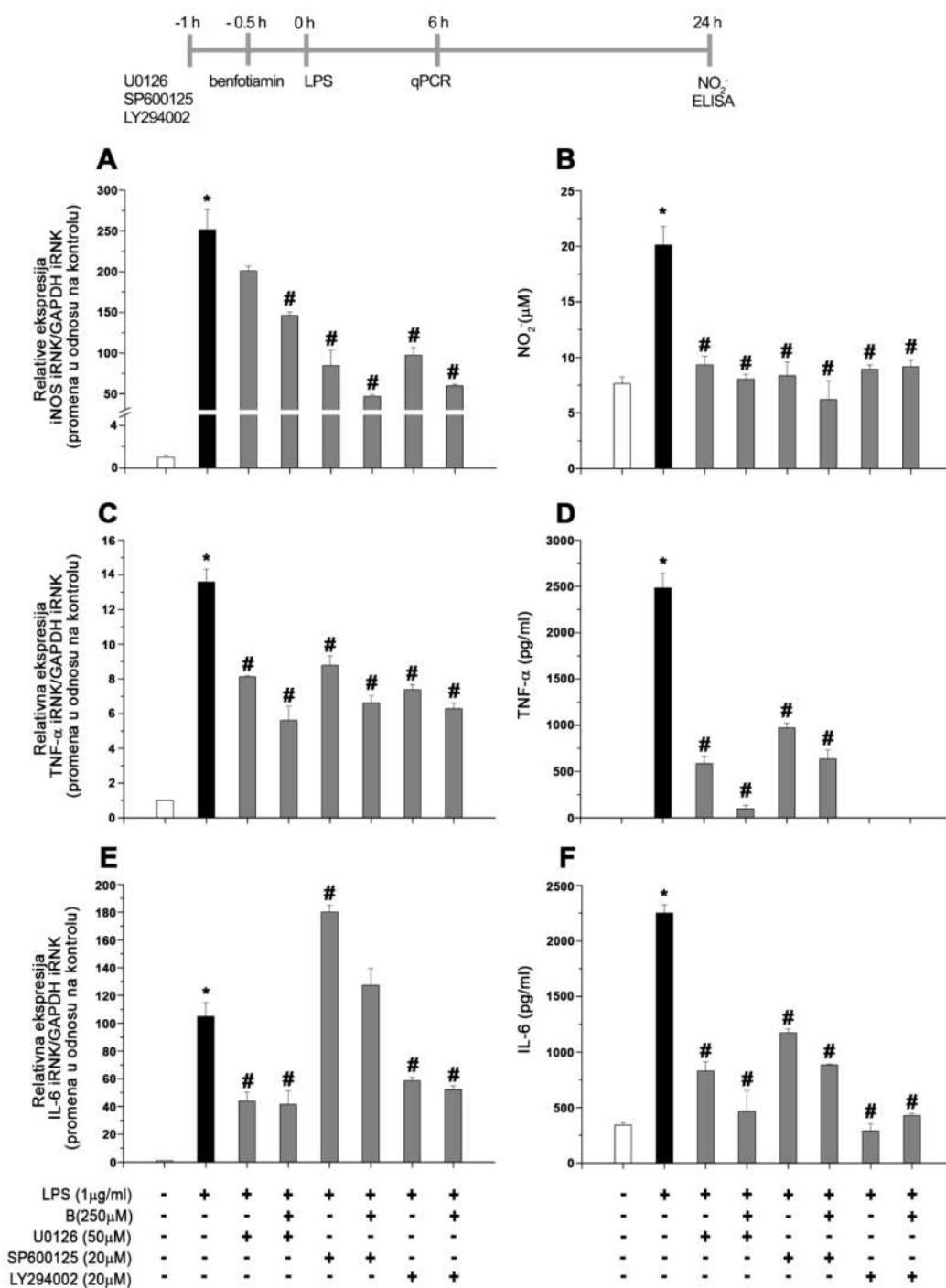
**Slika 25. Efekat benfotiamina na MAPK i Akt signalne puteve aktivirane stimulacijom LPS-om.** Aktivacija ERK (A), JNK (B), p38 (C) i Akt (D) kinaza analizirana je imunoblot metodom, 5-60 min posle stimulacije LPS-om. Nivo fosforilacije prikazan je u odnosu na ekspresiju nefosforilisane forme i sveden na  $\beta$ -tubulin za isti bunarić, a zatim su dobijene vrednosti normalizovane u odnosu na kontrolu (100%). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, a stubići na graficima predstavljaju srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta ( $\pm$  SE). Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

#### **4.2. Antiinflamatorni efekat benfotiamina je posredovan ERK, JNK i Akt signalnim putevima**

U sledećoj grupi eksperimenata ispitan je efekat farmakoloških inhibitora ERK, JNK i Akt signalnih kaskada, u cilju definisanja njihove uloge u antiinflamatornom dejstvu benfotiamina. BV-2 ćelije su tretirane inhibitorima za ERK (U0126), JNK (SP600125) i Akt (LY294002) signalizaciju, a potom i benfotiaminom i LPS-om i posle 4 h je određen nivo iRNK za iNOS, TNF- $\alpha$  i IL-6. Takođe je merena produkcija NO, TNF- $\alpha$  i IL-6, 24 h posle stimulacije LPS-om.

Inhibitori JNK i Akt signalizacije su samostalno, kao i u kombinaciji sa benfotiaminom snažno inhibirali LPS-om povećanu ekspresiju iRNK za iNOS (Slika 26A). Inhibitor ERK signalizacije nije ostvario statistički značajan efekat na transkript za iNOS, mada je uočen trend smanjenja. Inhibitorski efekat na produkciju NO izazvanu LPS-om zabeležen je u svim upotrebljenim tretmanima (Slika 26B), što upućuje na zaključak da su sva tri signalna puta uključena u NO signalizaciju kod mikroglialnih ćelija. Takođe, svi inhibitori su smanjili transkripciju gena za TNF- $\alpha$  (Slika 26C). Očekivano, slično dejstvo zabeleženo je i na produkciju TNF- $\alpha$ , pri čemu je LY294002 ostvario najizraženiji efekat, snizivši produkciju ovog proinflamatornog citokina ispod nivoa detekcije (Slika 26D). Benfotiamin nije pokazao statistički značajan aditivan efekat. U0126 i LY294002 su smanjili gensku ekspresiju za IL-6, dok je SP600125 povećao količinu ovog transkripta (Slika 26E). Ipak, svi upotrebljeni tretmani su inhibirali oslobađanje IL-6 citokina (Slika 26F).

S obzirom na to da su svi inhibitori, samostalno i u kombinaciji sa benfotiaminom, znatno smanjili produkciju NO, TNF- $\alpha$  i IL-6 može da se zaključi da su sva tri signalna puta uključena u signalizaciju proinflamatornim medijatorima u aktiviranoj mikrogliji.



**Slika 26. Uticaj farmakoloških inhibitora aktivacije ERK, JNK i Akt kinaza.** Ekspresija iRNK za iNOS (A), TNF- $\alpha$  (C) i IL-6 (E) je analizirana qPCR metodom. Rezultati su analizirani pomoću  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode i ekspresija iRNK za enzime je izražena u odnosu na ekspresiju iRNK GAPDH u istom uzorku, a zatim su dobijene vrednosti izražene u odnosu na kontrolnu grupu (1). Oslobođanje NO (B) određeno je u supernatantima kultura Grisovom metodom, a produkcija TNF- $\alpha$  (D) i IL-6 (F) ELISA metodom. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta  $\pm$  SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.

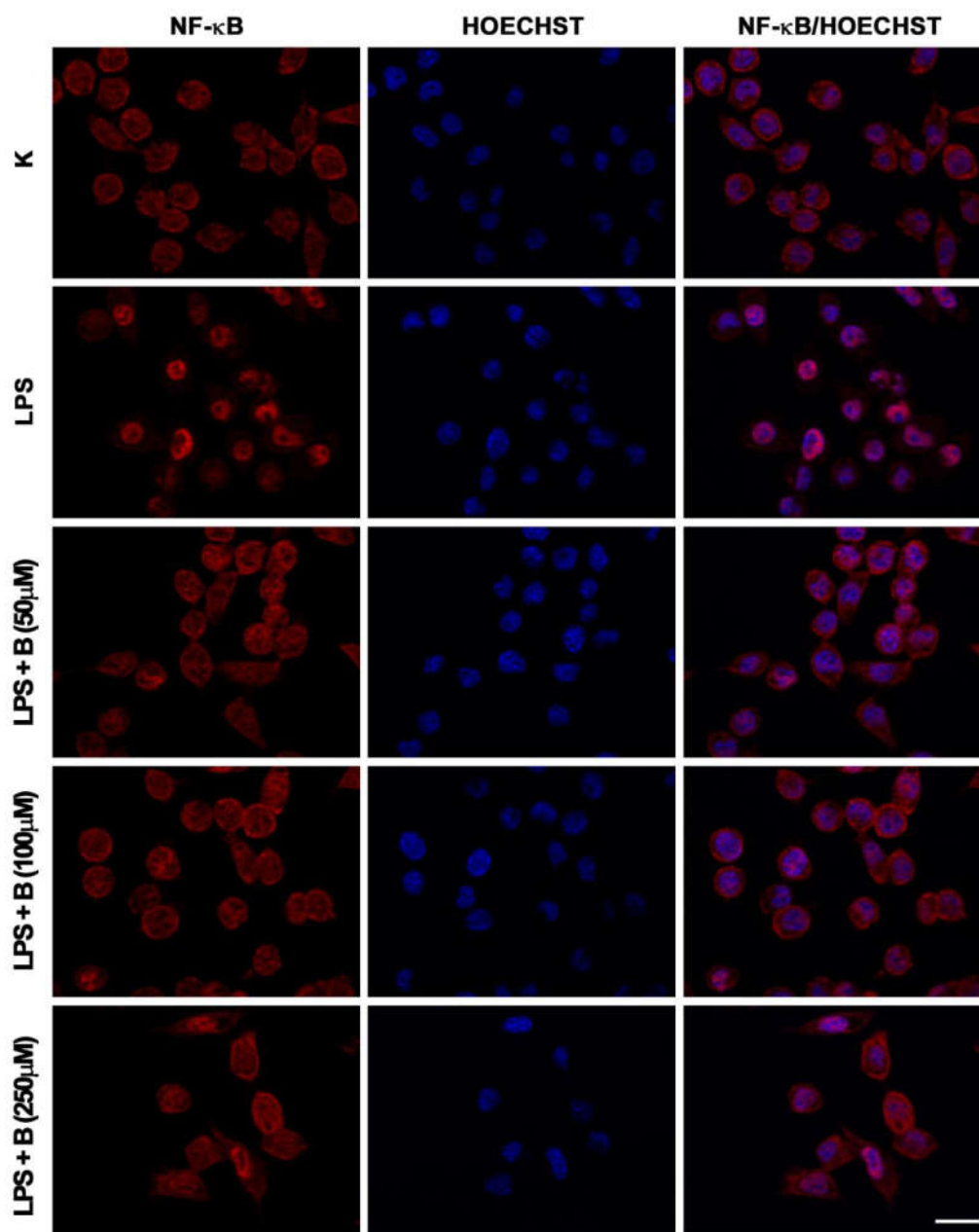
### **4.3. Benfotiamin smanjuje translokaciju NF- $\kappa$ B u jedro u aktiviranim BV-2 ćelijama**

Budući da NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor ima važnu ulogu u inflamatornom odgovoru mikroglije, u narednim eksperimentima praćena je njegova aktivacija, odnosno translokacija p65 subjedinice u jedro. Translokacija je posmatrana 30 minuta posle stimulacije LPS-om. Analizirane su mikrografije BV-2 ćelija nakon imunofluorescentnog bojenja p65/NF- $\kappa$ B i fluorescentnog bojenja jedara Hoechst obeleživačem. Intenzitet p65/NF- $\kappa$ B fluorescence u jedru određen je u regionima ćelija gde su bila prisutna oba fluorescentna signala i izražen je u arbitrarnim jedinicama (AU). Translokacija je potvrđena i imunoblot metodom.

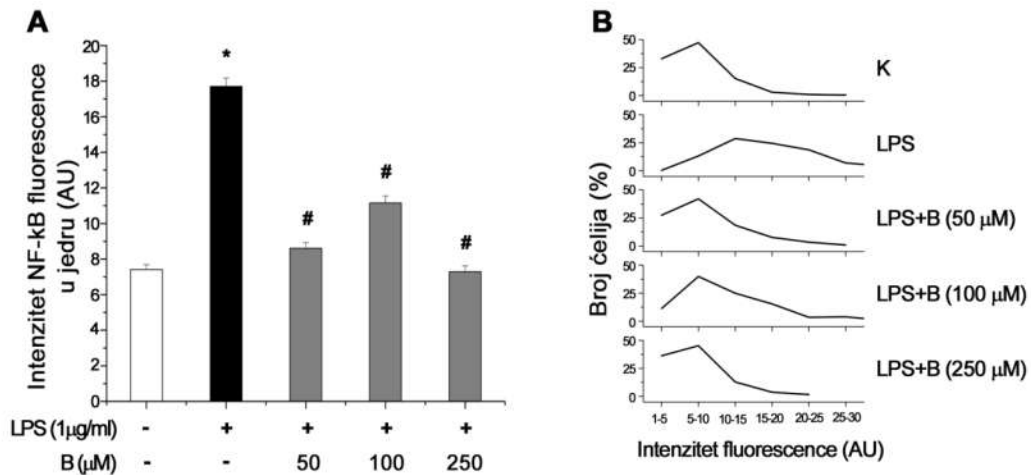
U kontrolnim uslovima p65/NF- $\kappa$ B je pretežno eksprimiran u citoplazmi sa umerenim prisustvom u jedru (Slika 27, Slika 28A,  $7,4 \pm 0,3$  AU). Stimulacija LPS-om izaziva masovnu translokaciju p65/NF- $\kappa$ B u jedro, gde je izmereno značajno povećanje intenziteta fluorescence ( $17,7 \pm 0,5$  AU). Pretretman benfotiaminom dovodi do statistički značajnog smanjenja translokacije pri svim primenjenim koncentracijama, pri čemu koncentracija 250  $\mu$ M vraća intenzitet fluorescence u jedru na kontrolni nivo ( $7,3 \pm 0,3$  AU). Takođe, razmatrana je raspodela intenziteta p65/NF- $\kappa$ B fluorescence u jedru među ćelijama u svakoj grupi (Slika 28B). Analiza je pokazala da je u preko 80% ćelija u kontrolnoj kulturi intenzitet fluorescence u rasponu 1-10 AU, što je pokazatelj slabe jedarne lokalizacije. Nasuprot tome, u 90% ćelija stimulisanih LPS-om intenzitet fluorescence je bio veći od 10 AU, a 30% ćelija je pripadalo rasponu 20-30 AU. U grupama pretretiranim benfotiaminom raspodela intenziteta fluorescence je bila kao u kontroli, pri čemu je koncentracija od 250  $\mu$ M pokazivala najizraženiji efekat, sa 80% ćelija u rasponu 1-10 AU. U cilju dalje potvrde uticaja benfotiamina na NF- $\kappa$ B signalizaciju urađena je imunoblot analiza u jedarnoj (Slika 29A) i citosolnoj (Slika 29B) frakciji. Očekivano, posle stimulacije LPS-om u jedru je zabeležena povećana ekspresija p65/NF- $\kappa$ B, što pretretman benfotiaminom efikasno sprečava.

U celini, ovi rezultati navode na zaključak da su antioksidativna i antiinflamatorna svojstva benfotiamina posredovana direktnim efektom koji ostvaruje na NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor.

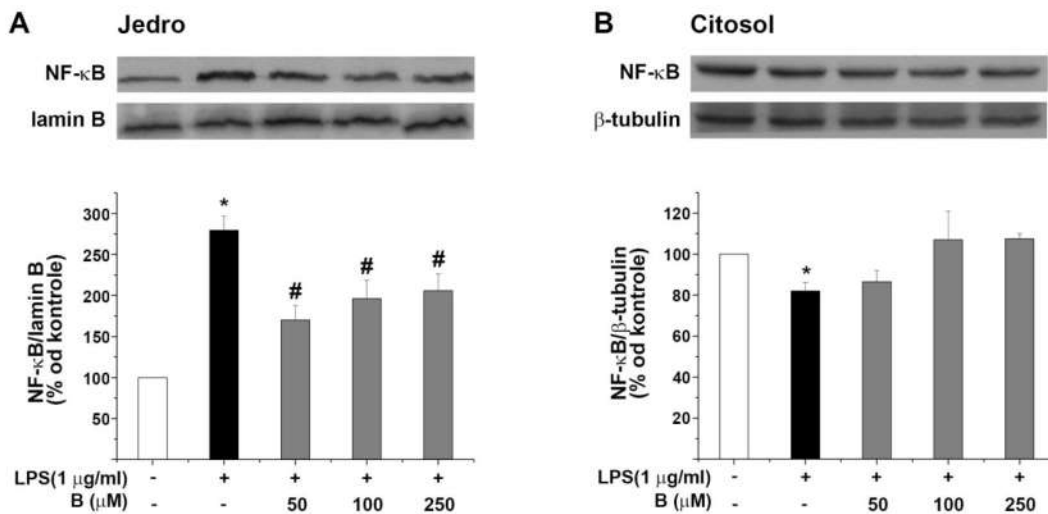




Slika 27. Uticaj benfotiamina na translokaciju NF- $\kappa$ B. Prikazane su mikrografije BV-2 ćelija imunofluorescentno obeleženih antitelom na p65/NF- $\kappa$ B (crveno) i Hoechst fluorescentnom bojom koja se vezuje za DNK (plavo). Dužina skale: 20  $\mu$ m.



**Slika 28. Kvantifikacija intenziteta fluorescence NF-κB u jedru.** Intenzitet p65/NF-κB fluorescence u jedru je izmeren u preko 200 ćelija u svakoj eksperimentalnoj grupi, pomoću ImageJ softvera. Rezultati su prikazani u arbitrarnim jedinicama. Predstavljene su srednje vrednosti intenziteta fluorescence ± SE iz tri nezavisna eksperimenta (A). Rezultati su svrstani u intervale od po 5 AU i prikazana je raspodela intenziteta fluorescence u svim eksperimentalnim grupama (B). Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om.



**Slika 29. Imunoblot analiza ekspresije NF-κB u jedru i citosolu.** Ekspresija NF-κB određena je u jedru (A) i citosolu (B) posle tretmana benfotiaminom i stimulacije LPS-om u trajanju od 30 minuta. Vrednosti dobijene denzitometrijskom analizom su svedene na lamin B (u jedru), odnosno β-tubulin (u citosolu) u istom bunariću. Odnos optičkih gustina NF-κB/laminin B, odnosno NF-κB/tubulin u netretiranim ćelijama korišćen je kao osnov za poređenje (100%). Stubići na graficima predstavljaju srednje vrednosti istih odnosa optičkih gustina u tretiranim grupama (± SE) iz 3 nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimulisanu LPS-om. Slike A i B predstavljaju reprezentativne imunoblotove.

# **V DISKUSIJA**

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju antiinflamatornu i antioksidativnu ulogu benfotiamina u *in vitro* modelu neuroinflamacije. Tretman benfotiaminom sprečava morfološke promene izazvane aktivacijom, smanjuje produkciju proinflamatornih medijatora NO,  $\bullet\text{O}_2^-$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, dok istovremeno povećava antioksidativni kapacitet aktivirane mikroglije. Ovaj efekat benfotiamin ostvaruje zahvaljujući direktnom uticaju na MAPK i NF- $\kappa$ B signalne puteve.

Mikroglija, kao glavni pokretač inflamacije u različitim oboljenjima CNS-a predstavlja potencijalnu terapijsku metu (Lucas i sar., 2006). Izučavanje njenih morfoloških i funkcionalnih karakteristika u ćelijskoj kulturi omogućuje ispitivanje određenih patoloških stanja ćelija koja se ne mogu utvrditi u *in vivo* sistemima. *In vitro* modeli obezbeđuju homogeni sistem u kome je prisutan samo jedan tip ćelija u strogo kontrolisanim uslovima u kojima se mogu simulirati određeni aspekti različitih bolesti. Ovakav sistem omogućava proučavanje mehanizama koji su u osnovi aktivacije mikroglije, njene pokretljivosti, ulogu pojedinih proinflamatornih i antiinflamatornih faktora koje oslobađa i drugih karakteristika ovih ćelija koje se ne mogu sa dovoljnom preciznošću odrediti u *in vivo* sistemima (Stansley i sar., 2012). Takođe, traženje potencijalnih terapeutika je u mnogome olakšano u *in vitro* uslovima koji omogućuju proučavanje direktnog uticaja različitih supstanci na mikroglijske ćelije i njihovu aktivaciju, kao i molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi njihovog dejstva. Međutim, *in vitro* studije ne mogu u potpunosti da zamene ili predvide dešavanja u *in vivo* eksperimentima, zbog odsustva fiziološkog konteksta u kome različite ćelije uspostavljaju međusobne kontakte i komuniciraju putem signalnih molekula.

Primarna kultura mikroglijskih ćelija se dobija iz moždane kore novorođenih životinja, najčešće pacova ili miševa, i često se koristi u fiziološkim i farmakološkim studijama (Giulian i Baker, 1986). Priprema primarne mikroglijske kulture zahteva veliki broj životinja, puno vremena i resursa. Takođe, s obzirom da imaju nizak proliferacioni kapacitet, prinos mikroglijskih ćelija u svakom eksperimentu je ograničen. Stoga su eksperimenti koji zahtevaju veliki broj ćelija, kao što je na primer ispitivanje signalnih mehanizama u osnovi nekog fenomena, teško izvodljivi.

BV-2 imortalizovana ćelijska linija je u širokoj upotrebi kao zamena za primarnu mikrogliju, i korišćena je u eksperimentima u kojima je ispitivana fagocitoza (Bocchini i sar., 1992; Furtner i sar., 2007), u elektrofiziološkim studijama (Zierler i sar., 2008), za ispitivanje signalnih puteva (Watters i sar., 2002), kao i za ispitivanje antiinflamatornog dejstva velikog broja supstanci (Bellezza i sar., 2013; Liu i sar., 2012; Dirscherl i sar., 2010; Huang i sar., 2014; Zhong i sar., 2012; Choi i Park, 2012; Dang i sar., 2014; Wang i sar., 2011). Primarna mikroglijska kultura i BV-2 ćelijska linija su upoređivane u nekoliko studija. Horvath i sar. su pokazali da mišja BV-2 linija deli određene karakteristike sa primarnom mikroglijom izolovanom iz pacova, da postoji sličan trend u migraciji i oslobađanju NO, TNF- $\alpha$  i IL-6, ali da se razlikuju u ekspresiji IL-1 $\beta$ , MCP-1 i pERK (Horvath i sar., 2008). Detaljnija analiza transkriptoma je pokazala da BV-2 ćelije dele 90% gena indukovanih LPS-om sa primarnom mišjom kulturom, mada je ekspresija ovih gena manje izražena u BV-2 ćelijama. Slično je pokazano i u analizi ekspresije proteina i zaključeno da su BV-2 ćelije dobar model sistem za proučavanje inflamacije (Henn i sar., 2009). Zbog brojnih sličnosti sa primarnom kulturom u morfološkom, fenotipskom i funkcionalnom smislu, BV-2 ćelije su u širokoj upotrebi u izučavanju mikroglije (Henn i sar., 2009; Blasi i sar., 1990; Bocchini i sar., 1992) i zato su odabrane kao model sistem u ovoj studiji.

BV-2 ćelije smo stimulisali LPS-om, endotoksinom koji izaziva brz inflamatorni odgovor mikroglije. Na ovaj način aktivirane ćelije predstavljaju dobro okarakterisan i često korišćen model sistem neuroinflamacije. Aktivacija mikroglije podrazumeva transformaciju ćelija u morfološkom smislu, indukciju površinskih receptora uključenih u inflamaciju, kao i oslobađanje brojnih proinflamatornih medijatora kao što su citokini, hemokini, ROS i RNS, eikozanoidi i proteaze. Pokazano je da terapeutici koji smanjuju aktivaciju mikroglije, a u vezi sa tim i inflamaciju, imaju neuroprotektivno dejstvo u patologijama kao što je AB (Weitz i Town, 2012; Meyer-Luehmann i Prinz, 2015), EAE (Ding i sar., 2014) i traumatska ili ishemijska povreda CNS-a (Hailer, 2008). Stoga je pronalaženje novih efikasnih terapeutika koji bi smanjili aktivaciju mikroglije stalno u fokusu istraživača koji se bave patološkim stanjima CNS-a. Traženje odgovarajuće terapije predstavlja poseban izazov kod hroničnih oboljenja gde bi idealno

rešenje bilo zaustaviti prelazak akutnog inflamatornog odgovora u hronični (Lucas i sar., 2006).

Benfotiamin je analog vitamina B1 koji pokazuje antiinflamatorna i antioksidativna svojstva (Balakumar i sar., 2008; Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012), čiji terapijski potencijal nije ispitan na mikrogliji. Pokazano je da benfotiamin ostvaruje povoljna terapijska dejstva u nekim patologijama nervnog sistema, kao što su neuropatije izazvane dijabetesom (Winkler i sar., 1999; Haupt i sar., 2005), alkoholne neuropatije (Manzardo i sar., 2013), inflamatorni i neuropatski bol (Sanchez-Ramirez i sar., 2006), a pokazano je i njegovo povoljno dejstvo na animalnom modelu za AB (Pan i sar., 2010). Imajući u vidu potrebu za terapijom koja je efikasna u stišavanju aktivacije mikroglije, ispitali smo uticaj benfotiamina na morfološke i funkcionalne karakteristike mikroglije. Kliničke studije u kojima je ispitivan terapijski potencijal benfotiamina u lečenju ljudi obolelih od dijabetesa, govore u prilog tezi da benfotiamin nije škodljiv ni u visokim dozama (900 mg/dan, Alkhalaf i sar., 2010; Alkhalaf i sar., 2012).

U prvom delu studije utvrđeno je da benfotiamin ne utiče na vijabilnost BV-2 ćelija u fiziološkim uslovima, u ispitanom opsegu koncentracija. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je benfotiamin bezbedno jedinjenje koje ne pokazuje citotoksičan efekat (Beltramo i sar., 2004; Marchetti i sar., 2006; Yadav i sar., 2010; Fraser i sar., 2012; Shoeb i Ramana, 2012). Zanimljivo je napomenuti da je citotoksično dejstvo benfotiamina zabeleženo kod tretmana određenih leukemičnih ćelijskih linija, čime je otvoreno pitanje o antitumorskom dejstvu benfotiamina (Sugimori i sar., 2015). Osim što ne utiče na vijabilnost ćelija, benfotiamin u našem modelu ne narušava ni morfologiju ni adhezivna svojstva mikroglijskih ćelija. Analizom citoskeleta utvrđeno je da su ćelije tretirane benfotiaminom imale isti oblik i veličinu kao i kontrolna grupa. Takođe, tretman benfotiaminom ne menja ekspresiju i osobađanje proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, kao ni NO produkciju (Bozic i sar., 2015a). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da benfotiamin ne utiče na vijabilnost BV-2 ćelija i ne dovodi do njihove aktivacije. S obzirom da je važno da terapija patoloških stanja CNS-a ne remeti funkciju mirujuće mikroglije, benfotiamin je dobar kandidat za ispitivanje antiinflamatornog i antioksidativnog efekta u aktiviranoj mikrogliji. Važno je napomenuti da smo utvrdili

da benfotiamin ne utiče ni na vijabilnost aktiviranih ćelija, jer kad je u pitanju potraga za terapeutikom koji bi delovao na aktiviranu mikrogliju, poželjno je da on bude modulator/regulator njene aktivnosti bez ispoljavanja citotoksičnog dejstva, budući da se sve odvija u delikatnoj sredini CNS-a.

U cilju procene aktivacije BV-2 ćelija, analizirali smo morfološke promene koje prate aktivaciju i koje olakšavaju kretanje mikroglije ka mestu inflamacije i fagocitozu patogena i/ili ćelijskog otpada (Boche i sar., 2013). U *in vitro* sistemu mikroglija se često odlikuje morfologijom koja se može okarakterisati kao prelazna između ramifikovane i ameboidne, što je posledica veštačkih uslova u kulturi i ukazuje na metamorfozni kapacitet mikroglije (Abd-El-Basset, 2000). Poznato je da su BV-2 mikroglijske ćelije okruglastog oblika kada se gaje u punom medijumu sa FBS-om (Laurenzi i sar., 2001), dok stimulacija LPS-om dovodi do morfoloških promena, reorganizacije citoskeleta, uvećanja ćelijskog tela mikroglije i pojave lamelipodija (Abd-El-Basset i Fedoroff, 1995; Manivannan i sar., 2013). Reorganizacija F-aktina je u osnovi morfoloških promena i neophodna je za migraciju aktiviranih ćelija (Abd-El-Basset i sar., 2004; Rosslensbroich i sar., 2005; Savić i sar., 2014).

BV-2 ćelije koje smo stimulisali LPS-om pokazivale su jasne morfološke promene: imale su veće ćelijsko telo i formirale su brojne nastavke u vidu lamelipodija i filopodija sa aktinskim mikrofilamentima organizovanim u filamentozne snopove. Pretretman benfotiaminom je indukovao morfologiju ćelija nalik onoj u kontrolnim uslovima, ćelije su se odlikovale okruglastim oblikom i manjom površinom, bez izraženih nastavaka, dok je F-aktin bio uniformno raspoređen uz membranu. Tako, benfotiamin smanjuje formiranje membranskih nabora za koje je pokazano da su neophodni za hemotaktičke pokrete (Honda i sar., 2001). Naši rezultati su u skladu sa studijom Muller-Krebs i sar. u kojoj je pokazano da benfotiamin utiče na reorganizaciju aktina u podocitima izloženim visokim koncentracijama glukoze (Muller-Krebs i sar., 2015). Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdilo na koji način benfotiamin utiče na morfološke promene, a jedno od mogućih objašnjenja jeste njegov uticaj na MAPK signalni put, s obzirom da je pokazano da je ova signalna kaskada uključena u reorganizaciju citoskeleta tokom aktivacije mikroglije (Waetzig i sar., 2005). Pokazano je da aktivirani ERK, p38 i JNK utiču na reorganizaciju aktina i tubulina i omogućuju

uvećanje ćelija i njihovu migraciju. JNK katalizuje fosforilaciju citoskeletnih elemenata (Chang i sar., 2003; Waetzig i sar., 2005) i indukuje ekspresiju aktina putem aktivacije c-Jun (Bishopric i sar., 1992). Smanjenje ćelijskog tela i morfologija nalik ćelijama u kontrolnim uslovima posle tretmana benfotiaminom ukazuju na njegov delotvoran efekat u smanjenju aktivacije mikroglije.

Poznato je da LPS, u zavisnosti od vremena stimulacije i upotrebljene koncentracije, dovodi do apoptoze mikroglijskih ćelija (Lee i sar., 2001a; Lee i sar., 2001b; Liu i sar., 2001; Taylor i sar., 2003). U skladu sa tim, i u ovoj studiji je zabeleženo da LPS izaziva umerenu apoptozu i nekrozu BV-2 ćelija, dok benfotiamin ne dovodi do značajnih promena u ovim procesima. Ćelijska smrt usled preterane stimulacije mikroglije primećena je i u drugim model sistemima aktivacije (Kingham i sar., 1999; Kingham i Pocock, 2000; Taylor i sar., 2003). Više signalnih mehanizama je uključeno u LPS-om indukovanu apoptozu, pri čemu važnu ulogu igraju NO i ROS koje mikroglija produkuje (Lee i sar., 2001a; Lee i sar., 2001b; Rojo i sar., 2014). Aktivacija kaspaze 11, kao i NO produkcija, dovode do aktivacije efektorskih kaspaza 1 i 3 koje zatim uvode ćelije u apoptozu (Lee i sar., 2001b). Saglasno tome, naša studija je pokazala da posle stimulacije LPS-om dolazi do blagog povećanja ekspresije aktivirane kaspaze 3, ali i to da benfotiamin nije značajno uticao na njenu ekspresiju.

Uloga apoptoze aktiviranih mikroglijskih ćelija nije do kraja razjašnjena, s obzirom da može biti štetna ili korisna u zavisnosti od stadijuma inflamacije. Tako u početnim fazama infekcije, eliminacija mikroglijskih ćelija može biti veoma nepovoljna jer dovodi do oslabljene odbrane CNS-a, dok u hroničnoj inflamaciji može predstavljati regulatorni mehanizam kojim se sprečava preterana aktivacija mikroglije (Lehnardt, 2010). Uzimajući u obzir da citotoksični efekat neke supstance može imati nepovoljno dejstvo na mikroglijske i druge ćelije CNS-a, strategija u terapiji neurodegenerativnih oboljenja je usmerena ka smanjenju i razrešenju aktivacije mikroglije, ali ne i njenoj eliminaciji (Nakagawa i Chiba, 2015; Michell-Robinson i sar., 2015; Saijo i sar., 2013). Suzbijanje produkcije proinflamatornih medijatora i stimulisanje oslobađanja antiinflamatornih citokina je terapijski pristup za koji se pretpostavlja da ima daleko povoljnije dejstvo. Kako benfotiamin nije pokazao citotoksično dejstvo u sledećoj grupi



eksperimenata analizirali smo njegov regulatorni/modulatorni kapacitet preko efekta na proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore u aktiviranoj mikrogliji.

Ekspresija CD40 receptora na membrani mikroglijskih ćelija ima važnu ulogu u inflamatornom odgovoru CNS-a. CD40 pripada TNF- $\alpha$  familiji receptora i eksprimiraju ga različite imunske, ali i druge ćelije. CD40 ligand (CD40L, CD154) je transmembranski protein koji pripada TNF familiji, a eksprimira se na CD4<sup>+</sup> T ćelijama, B ćelijama, trombocitima, mastocitima, bazofilima i drugim ćelijama (Chen i sar., 2006). Vezivanje CD40L za receptor aktivira nekoliko signalnih kaskada što dovodi do promena u genskoj ekspresiji i specifičnog ćelijskog odgovora. Aktivacija CD40 receptora u mikrogliji dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, MAPK, PI3K, faktora asociranih sa receptorom za TNF i JAK/STAT signalnog puta, što stimuliše sintezu i oslobađanje brojnih citokina i hemokina, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-12, NO, matriksna metaloproteinaza 9 (MMP-9), MCP-1 i CXCL10 (Benveniste i sar., 2004; Jana i sar., 2001; Jana i sar., 2002). Pored toga, aktivacija CD40 stimuliše sazrevanje mikroglije u antigen prezentujuće ćelije (Fischer i Reichmann, 2001).

Promene ekspresije CD40 receptora ili CD40L su zabeležene u nekoliko patologija CNS-a: AB (Calingasan i sar., 2002; Giunta i sar., 2010), MS (Gerritse i sar., 1996), TPM (Lavrnja i sar., 2015), demenciji povezanoj sa HIV-om (D'Aversa i sar., 2002) i cerebralnoj ishemiji (Garlichs i sar., 2003). Kada nisu aktivirane, mikroglijske ćelije eksprimiraju veoma nizak nivo CD40 receptora, dok se pod dejstvom proinflamatornih signala kao što su IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i LPS, ekspresija CD40 značajno povećava (Chen i sar., 2006). TNF- $\alpha$  ima važnu ulogu u indukciji genske ekspresije CD40 pod tretmanom IFN- $\gamma$ , s obzirom da antitela koja neutrališu TNF- $\alpha$  smanjuju CD40 ekspresiju indukovanu IFN- $\gamma$  (Nguyen i Benveniste, 2002). LPS takođe indukuje gensku i proteinsku ekspresiju CD40 putem aktivacije NF- $\kappa$ B koji se vezuje za promotor CD40 u jedru i dovodi do transkripcije ovog gena. LPS posredno aktivira i STAT1 koji takođe dovodi do transkripcije CD40 gena (Qin i sar., 2005). Rezultati naših eksperimenata pokazuju izraženo povećanje ekspresije CD40 u mikrogliji posle stimulacije LPS-om, što je u skladu sa prethodnim studijama (Qin i sar., 2005; Qin i sar., 2006; Kim i sar., 2002). Sa druge strane, benfotiamin smanjuje indukovanu ekspresiju CD40, što ukazuje na njegovu potencijalnu antiinflamatornu ulogu u

oboljenjima CNS-a. Postoji nekoliko načina putem kojih benfotiamin može da ostvari ovakvo dejstvo. U ovoj studiji, ali i u drugim sistemima pokazano je da benfotiamin ima direktan efekat na aktivaciju NF- $\kappa$ B (Bozic i sar., 2015a; Hammes i sar., 2003; Yadav i sar., 2009; Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012). S obzirom da benfotiamin smanjuje translokaciju NF- $\kappa$ B u jedro, posredno dolazi i do smanjenja transkripcije gena koje NF- $\kappa$ B aktivira, među kojima je i CD40. Sa druge strane, pokazano je da antiinflamatorni citokini kao što su TGF- $\beta$ , IL-4 i IL-10 inhibiraju ekspresiju CD40 na mikroglijskim ćelijama (Kim i sar., 2002; Nguyen i sar., 1998). Uzimajući u obzir da benfotiamin povećava produkciju IL-10, njegov efekat na ekspresiju CD40 može biti dodatno posredovan i ovim molekulom.

Analiza antiinflamatornog efekta benfotiamina nastavljena je proučavanjem njegovog uticaja na sintezu i produkciju proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 i antiinflamatornog citokina IL-10 u aktiviranoj mikrogliji. Hronična aktivacija mikroglije je praćena preteranom produkcijom proinflamatornih citokina koji održavaju i pojačavaju imunski odgovor, povećavaju ROS i RNS produkciju, dovode do ekscitotoksičnosti i aktiviraju apoptozu u neuronima, promovišući tako neurodegeneraciju (Smith i sar., 2012). Smanjenje oslobađanja proinflamatornih citokina predstavlja jednu od potencijalnih terapijskih strategija u lečenje neurodegenerativnih oboljenja, na šta upućuju i eksperimentalna i klinička istraživanja.

U našoj studiji LPS je snažno indukovao transkripciju analiziranih proinflamatornih citokina, što je bilo praćeno povećanim oslobađanjem ovih peptida u medijum. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim studijama u kojima je pokazano da LPS povećava koncentraciju TNF- $\alpha$  (Sawada i sar., 1989; Savic i sar., 2014) i IL-6 (Lee i sar., 1993; Savic i sar., 2014). Prethodne studije u kojima je ispitivan antiinflamatorni efekat benfotiamina pokazale su potencijal ove supstance da smanji produkciju proinflamatornih citokina u uslovima inflamacije. Naime, benfotiamin smanjuje produkciju TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  i drugih proinflamatornih medijatora u kulturi makrofaga aktiviranih LPS-om (Yadav i sar., 2010). Takođe, benfotiamin smanjuje oslobađanje IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 i MCP-1 indukovano uveitisom kod pacova (Yadav i sar., 2009). Naši rezultati pokazuju da benfotiamin smanjuje nivo proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 u aktiviranoj mikrogliji. Treba napomenuti da

su Wu i Ren pokazali da benfotiamin ne utiče na ekspresiju TNF- $\alpha$  u kori mozga dijabetičnih miševa (Wu i Ren, 2006).

TNF- $\alpha$  je centralni medijator u inflamatornim reakcijama urođenog imunskog odgovora koji je uključen u produkciju drugih citokina, aktivaciju i ekspresiju adhezivnih molekula i stimulaciju rasta (Hehlhans i Pfeffer, 2005). Vezivanje TNF- $\alpha$  za receptore dovodi do aktivacije nekoliko signalnih puteva koji mogu rezultirati aktivacijom kaspaze 8 i dovesti do apoptoze. Međutim, pretpostavlja se da TNF- $\alpha$  uglavnom ne izaziva apoptozu, ako ne postoji drugi apoptotski signal. TNF- $\alpha$  aktivira NF- $\kappa$ B i MAPK signalne kaskade što između ostalog dovodi do produkcije i drugih proinflamatornih medijatora (Park i Bowers, 2010). Transkripciju gena za TNF- $\alpha$  može da pokrene više unutarćelijskih signalnih kaskada, pri čemu je NF- $\kappa$ B najvažniji transkripcioni faktor koji dovodi do povećane genske ekspresije ovog citokina (Rojo i sar., 2014; Wang i sar., 2002). Rezultati naše studije pokazuju da benfotiamin direktno smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B, stoga može da se zaključi da putem inhibicije NF- $\kappa$ B benfotiamin smanjuje sintezu i oslobađanje TNF- $\alpha$ . Benfotiamin smanjuje aktivaciju ERK, JNK i Akt signalnih kaskada koje takođe dovode do sinteze TNF- $\alpha$  što pokazuju rezultati ove, ali i prethodnih studija (Pyo i sar., 1998; Bhat i sar., 1998; Waetzig i sar., 2005).

Pored TNF- $\alpha$ , IL-6 je važan proinflamatorni citokin sa brojnim funkcijama u aktiviranoj mikrogliji. Nivo IL-6 raste u svakom neuroinflamatornom stanju CNS-a, prilikom povrede, infekcije, kao i u neurodegenerativnim oboljenjima. Povećana ekspresija IL-6 dovodi do mikroglioze, dok se mikrogljoza indukovana tretmanom LPS-om može sprečiti antitelom specifičnim za IL-6 (Spooren i sar., 2011). IL-6 stimuliše proliferaciju mikroglije *in vitro* (Streit i sar., 2000), i učestvuje u fagocitnoj aktivnosti i morfološkim promenama tokom aktivacije mikroglije (Shafer i sar., 2002). IL-6 ima važnu regulatornu ulogu u inflamatornom odgovoru, a u vezi je sa modulacijom ekspresije mnogih gena koji su uključeni u inflamaciju, apoptozu i oksidativni stres (Erta i sar., 2012). Kao što je slučaj i sa drugim proinflamatornim medijatorima, glavni transkripcioni faktor koji dovodi do transkripcije IL-6 je NF- $\kappa$ B (Rojo i sar., 2014; Wang i sar., 2002), što je jedan od puteva preko kog benfotiamin dovodi do smanjenja IL-6. Takođe, brojne studije pokazuju ulogu MAPK signalnih kaskada u povećanju

ekspresije IL-6 (Leonard i sar., 1999; Turner i sar., 2007; Olsnes i sar., 2011). U skladu sa prethodnim studijama, naši rezultati pokazuju da tretman inhibitorima ERK i PI3K/Akt signalizacije dovodi do smanjenja sinteze i oslobađanja IL-6. Benfotiamin nije pokazao aditivni efekat u tretmanu sa inhibitorima ERK, JNK i PI3K/Akt signalnih kaskada.

Stimulacija LPS-om povećava gensku ekspresiju i oslobađanje antiinflamatornog citokina IL-10 u našem modelu, što je u skladu sa prethodnim studijama (Ledeboer i sar., 2002; Seo i sar., 2004; Savić i sar., 2014). Benfotiamin ne utiče na gensku ekspresiju IL-10, ali povećava oslobađanje ovog citokina u medijum. IL-10 smanjuje produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6,  $\bullet\text{O}_2^-$  i drugih proinflamatornih medijatora, kao i aktivnost enzima lizozima, čime dovodi do smanjene aktivacije mikroglije stimulisane LPS-om (Sawada i sar., 1999; Kremlev i Palmer, 2005; Heyen i sar., 2000). Smatra se da je neuroprotektivno dejstvo koje IL-10 ostvaruje u neurodegenerativnim oboljenjima upravo posledica smanjene aktivacije mikroglije. Pojačano oslobađanje IL-10 pod uticajem benfotiamina je jedan od mehanizama pomoću kojeg ovaj analog vitamina B1 smanjuje inflamatorni odgovor mikroglije. Na ovaj način benfotiamin posredno dovodi do smanjenja proinflamatornih medijatora i tako sprečava pozitivnu povratnu spregu u kojoj proinflamatorni citokini pojačavaju svoju dalju sintezu i oslobađanje.

Pretpostavlja se da signalizacija preko ERK, p38 i NF- $\kappa$ B dovodi do povećane genske ekspresije IL-10. Inhibicija ERK i p38 dovodi do smanjenja, ali ne i do potpune inhibicije ekspresije IL-10, što navodi na zaključak da su svi pomenuti signalni putevi važni za produkciju IL-10. LPS indukuje povećanu ekspresiju IL-10, vezujući se za TLR4 što dovodi do aktivacije navedenih signalnih mehanizama (Saraiva i O'Garra, 2010). S obzirom na to da NF- $\kappa$ B, ERK i p38 prvenstveno indukuju produkciju proinflamatornih medijatora, pretpostavlja se da njihova uloga u ekspresiji IL-10 predstavlja određenu vrstu regulatornog mehanizma koji sprečava preteranu aktivaciju mikroglije. Iako u ovoj studiji nije zabeležen efekat benfotiamina na p38 pokazano je da benfotiamin smanjuje ERK fosforilaciju i translokaciju NF- $\kappa$ B. Ipak, iako je primećen trend povećanja, benfotiamin ne dovodi do značajne indukcije genske ekspresije IL-10. Može se pretpostaviti da mehanizmi dejstva benfotiamina na oslobađanje IL-10 nisu na

nivou transkripcije, međutim dalji eksperimenti su potrebni da bi se utvrdilo na koji način benfotiamin ostvaruje svoj efekat.

S obzirom na važnu ulogu NO u neuroinflamaciji i neurodegeneraciji posredovanoj aktiviranom mikroglijom, u ovoj studiji je ispitivan uticaj benfotiamina na produkciju NO i ekspresiju iNOS enzima. Iako ima važne fiziološke funkcije, u visokim koncentracijama NO dovodi do oštećenja i smrti neurona i oligodendrocita (Boje i Arora, 1992; Merrill i sar., 1993). Osim što direktno oštećuje ćelijske komponente, NO reaguje sa  $\bullet\text{O}_2^-$  pri čemu se formira izuzetno reaktivan peroksinitrit koji nitroziluje tirozinske ostatke proteina, dovodi do lipidne peroksidacije i oštećenja DNK (Pacher i sar., 2007). Povećana NO produkcija je primećena u AB (Reynolds i sar., 2006), a smatra se da doprinosi razvoju MS, EAE (Smith i sar., 1999; Parkinson i sar., 1997) i PB (Jenner, 2007).

Prethodno je pokazano da benfotiamin smanjuje NO produkciju i inhibira proteinsku ekspresiju iNOS-a u makrofagima stimulisanim LPS-om (Yadav i sar., 2010). Smanjena ekspresija iNOS-a posle tretmana benfotiaminom zabeležena je i kod životinja obolelih od uveitisa izazvanog endotoksinom (Yadav i sar., 2009). U skladu sa prethodnim studijama, naši rezultati pokazuju da benfotiamin doзно-zavisno smanjuje produkciju NO u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om, suprimirajući gensku i proteinsku ekspresiju iNOS-a. Glavni mehanizam regulacije iNOS aktivnosti je na nivou regulacije ekspresije. Brojni transkripcioni faktori utiču na ekspresiju iNOS-a, između ostalog NF- $\kappa$ B i AP-1 (Pautz i sar., 2010; Kristof i sar., 2001). Naši rezultati pokazuju da benfotiamin smanjuje translokaciju NF- $\kappa$ B i aktivaciju ERK, JNK i Akt signalnih kaskada koje aktiviraju AP-1. U NO produkciji važnu ulogu igra i oksidativni stres, s obzirom da ROS i  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalje promovišu aktivaciju NF- $\kappa$ B, formirajući tako pozitivnu petlju u kojoj dolazi do sinteze iNOS-a i produkcije NO (Rojo i sar., 2014). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da benfotiamin direktno neutrališe reaktivne vrste, i tako utiče na NF- $\kappa$ B translokaciju, a time i ekspresiju iNOS-a. Pored toga, inhibitorni efekat benfotiamina na ekspresiju CD40 takođe može imati udela u suprimiranju ekspresije iNOS-a (Jana i sar., 2001). Može da se zaključi da benfotiamin deluje antiinflamatorno posredstvom smanjenja NO produkcije i da ovaj efekat

ostvaruje inhibirajući nekoliko signalnih mehanizama i pozitivnih petlji koje dovode do povećane ekspresije iNOS-a.

U cilju dalje analize antiinflamatorne uloge benfotiamina, ispitivan je njegov efekat na gensku i proteinsku ekspresiju COX-2, inducibilnog enzima koji se u mikrogliji eksprimira posle njene aktivacije (Minghetti, 2004). Povećan nivo ekspresije COX-2 i koncentracije PGE<sub>2</sub> zabeležen je u različitim patologijama CNS-a. Povećana ekspresija COX-2 zabeležena je demijelinizacionim lezijama u MS-u, i to u mikrogliji i makrofagima, kao i u oštećenim oligodendrocitima (Rose i sar., 2004). Inhibitori COX-1 i COX-2, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, se često koriste u terapiji MS-a (Palumbo i Bosetti, 2013), dok je na animalnom modelu za moždani udar pokazano da specifični inhibitori za COX-2 deluju neuroprotektivno (Nogawa i sar., 1997). Povećana genska i proteinska ekspresija COX-2 pokazana je kod ALS (Yasojima i sar., 2001), PB (Teismann i sar., 2003) i AB (Pasinetti i Aisen, 1998) pacijenata.

U skladu sa prethodnim studijama (Akundi i sar., 2005), naši rezultati pokazuju da LPS snažno indukuje gensku i proteinsku ekspresiju COX-2 u mikrogliji. Benfotiamin je efikasno smanjio ekspresiju ovog enzima, pri čemu je koncentracija 250 μM ostvarila najjači efekat na proteinsku ekspresiju. Smanjena ekspresija COX-2 posle tretmana benfotiaminom zabeležena je prethodno kod makrofaga aktiviranih LPS-om (Yadav i sar., 2010) i kod životinja obolelih od uvećitisa izazvanog LPS-om (Yadav i sar., 2009). Primarni mehanizam dejstva benfotiamina je verovatno putem inhibicije translokacije NF-κB (Bauer i sar., 1997). Međutim, treba uzeti u obzir i blisku povezanost iNOS i COX-2 enzima. Naime, pokazano je da NO stimuliše aktivnost COX-2 u *in vivo* (Marnett i sar. 2000) i *in vitro* sistemima (Salvemini i sar., 1995). Pretpostavlja se da iNOS i COX-2 deluju sinergistički, stimulišu formiranje brojnih proinflamatornih medijatora i zajedno dovode do oštećenja. NO nastaje aktivnošću iNOS-a, dok COX-2 dovodi do formiranja •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i zajedno formiraju peroksinitrit koji oštećuje brojne ćelijske komponente, između ostalog i glutamatne transportere, što dovodi do ekscitotoksičnosti i smrti neurona (Rose i sar., 2004). Može da se pretpostavi da benfotiamin narušava pozitivnu povratnu spregu koja se na ovaj način formira, i da smanjujući iNOS aktivnost dovodi i do smanjenja aktivnosti COX-2. Osim toga,

benfotiamin smanjuje ERK fosforilaciju što takođe dovodi do smanjene COX-2 ekspresije (Choi i sar., 2003).

Oksidativni stres u velikoj meri doprinosi razvoju brojnih patologija CNS-a. Neuronu su glavna meta ROS i RNS, s obzirom na to da sadrže velike količine polinezasićenih masnih kiselina koje lako bivaju oštećene u interakciji sa ovim visoko reaktivnim molekulima. Pored toga, neuronu imaju nizak regenerativni kapacitet i nedovoljnu antioksidativnu zaštitu. Neuronu sadrže nizak nivo glutationa, glavnog neenzimskog antioksidansa, ključnog za borbu protiv ROS i RNS. Izvor oksidativnog stresa može biti i visoka metabolička aktivnost neurona, s obzirom da su u pitanju ćelije koje imaju veliku potrošnju kiseonika u poređenju sa drugim tipovima ćelija (Chen i Zhong, 2014). Međutim, glavni izvor ROS i RNS u oboljenjima CNS-a predstavljaju mikroglijske ćelije. Hronično aktivirana mikroglija proizvodi velike koncentracije ovih toksičnih molekula, čime oštećuje okolno tkivo, ali moduliše i sopstvenu aktivnost. ROS i RNS aktiviraju dva transkripciona faktora u mikrogliji NF- $\kappa$ B i NRF2, koji zatim aktiviraju transkripciju brojnih gena koji utiču na dalju sudbinu ovih ćelija (Rojo i sar., 2014). Imajući u vidu važnu ulogu koju ROS imaju u neurodegenerativnim oboljenjima, upotreba antioksidanasa predstavlja jednu od mogućih strategija u terapiji. Antioksidativna terapija može da prati dva pristupa: neposrednu detoksifikaciju ROS i posrednu regulaciju odnosno povećanje antioksidativne zaštite ćelije ili smanjenje aktivnosti enzima koji dovode do ROS produkcije. Brojne studije su pokazale da je benfotiamin efikasan u borbi protiv oksidativnog stresa (Ceylan-Isik i sar., 2006; Wu i Ren, 2006; Balakumar i sar., 2008; Schmid i sar., 2008; Schupp i sar., 2008; Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012; Verma i sar., 2010; Harisa, 2013). S obzirom da smo u prethodnom delu studije pokazali antiinflamatorni efekat benfotiamina u aktiviranoj mikrogliji, a imajući u vidu da stimulacija LPS-om izaziva povećanu produkciju ROS i RNS u kulturi BV-2 mikroglijskih ćelija (Kaneko i sar., 2012), sledeći logičan korak bilo je ispitivanje uticaja benfotiamina na antioksidativni sistem BV-2 ćelija.

U prvom segmentu eksperimenata procenjen je efekat benfotiamina na sadržaj  $\bullet\text{O}_2^-$  i MDA. Aktivirana mikroglija produkuje  $\bullet\text{O}_2^-$  koji ima važnu ulogu u borbi protiv patogena (Colton i Gilbert, 1987). Međutim, visoke koncentracije  $\bullet\text{O}_2^-$  povezane su sa neuravnoteženim redoks statusom ćelije i neurodegeneracijom. Osim što oštećuje

ćelijske komponente i narušava signalizaciju,  $\bullet\text{O}_2^-$  dovodi do stvaranja drugih reaktivnih vrsta kao što su  $\text{ONOO}^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kraft i Harry, 2011). Familija NOX enzima katalizuje produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$  i primećeno je da upravo aktivacija ovih enzima u mikrogliji stimulisanom LPS-om dovodi do neurotoksičnosti i genske ekspresije proinflammatoryh medijatora (Qin i sar., 2004). BV-2 ćelije ekspimiraju funkcionalni NOX, što ih čini dobrim model sistemom za proučavanje oksidativnog stresa u kulturi mikroglijskih ćelija (Henn i sar., 2009). NOX2 je u mikrogliji glavna izoforma koja dovodi do produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$ . Osim stimulacijom LPS-om, NOX2 može biti aktivirana i proinflammatoryh citokinima  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , kao i drugim proinflammatoryh stimulusima kao što su ATP i  $\text{A}\beta$  (Kraft i Harry, 2011). U našem eksperimentalnom modelu zabeležen je više od 2,5 puta povećan nivo  $\bullet\text{O}_2^-$  posle LPS stimulacije u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, tretman benfotiaminom je dozno-zavisno smanjio koncentraciju  $\bullet\text{O}_2^-$ , pri čemu je najviša upotrebljena koncentracija vratila  $\bullet\text{O}_2^-$  na kontrolni nivo. Smanjenje  $\bullet\text{O}_2^-$  pod tretmanom benfotiaminom pokazano je u različitim *in vitro* i *in vivo* sistemima (Balakumar i sar., 2008; Balakumar i sar., 2009; Verma i sar., 2010; Harisa i sar., 2013; Yadav i sar., 2010). Ovaj efekat benfotiamin ostvaruje na dva načina, direktnom detoksifikacijom  $\bullet\text{O}_2^-$  i posredno, putem uticaja na transkripcione faktore i enzime koji su uključeni u produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$ . Direktni efekat pokazan je pomoću elektronske paramagnetne rezonance, gde je benfotiamin smanjio formiranje  $\bullet\text{O}_2^-$  (Bozic i sar., 2015b). Takođe, imajući u vidu da benfotiamin smanjuje translokaciju  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , za koga se zna da indukuje ekspresiju NOX subjedinice  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ , (Anrather i sar., 2006), možemo da pretpostavimo da ispitivani agens posredno utiče i na smanjenje ekspresije NOX. Pored toga, benfotiamin smanjuje ekspresiju COX-2, enzima koji dovodi do povećane produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  u aktiviranoj mikrogliji (Marnett i sar., 1999). Sa druge strane, unutarćelijska koncentracija  $\bullet\text{O}_2^-$  zavisi i od aktivnosti SOD, enzima koji prevode  $\bullet\text{O}_2^-$  do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Johnson i Giulivi, 2005). Primećeno smanjenje produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  posle tretmana benfotiaminom, može biti i usled povećane aktivnosti Cu,ZnSOD, izoforme SOD koja je prisutna u citoplazmi. Na osnovu svega navedenog, može da se zaključi da benfotiamin smanjuje produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$  putem više različitih mehanizama.

Smanjenje koncentracije  $\bullet\text{O}_2^-$ , kao prvog u nizu reaktivnih vrsta, ima višestruke povoljne efekte na aktivaciju mikroglije. Aktivacija NOX i iNOS enzima dovodi do



formiranja veoma toksičnog ONOO<sup>-</sup>, što izaziva apoptozu neurona koja se može sprečiti neutralizacijom •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i ONOO<sup>-</sup> (Mander i Brown, 2005). Takođe je pokazano da ONOO<sup>-</sup> koga produkuju mikroglijske ćelije dovodi do smrti oligodendrocita u kulturi (Li i sar., 2005). ONOO<sup>-</sup> direktno oksiduje proteine, lipide i DNK, a pored toga dovodi do nitracije tirozinskih i nitrozilacije cisteinskih ostataka što može da inaktivira enzime (Wilkinson i Landreth, 2006). Produkcija ONOO<sup>-</sup> se dovodi u vezu sa patogenezom različitih neurodegenerativnih bolesti kao što su AB (Koppal i sar., 1999) i PB (Kumar i sar., 2014). NO dovodi do povećane produkcije •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Brown i Borutaite, 2002), a NOX utiče na iNOS aktivaciju (Pawate i sar., 2004), te je aktivnost ova dva enzima blisko povezana i tokom njihove aktivacije dolazi do formiranja pozitivne povratne sprege koja dovodi do produkcije velikih koncentracija ROS i RNS.

Osim što oštećuju okolne ćelije, ROS ostvaruju značajan uticaj i na aktivaciju mikroglije. Tako je pokazano da ROS dovode do povećane produkcije proinflamatornih citokina, kao što je TNF- $\alpha$  (Forman i Torres, 2001). ROS takođe regulišu sudbinu mikroglijskih ćelija, uključujući ćelijsku proliferaciju, apoptozu i oslobađanje neurotransmitera, pa može da se pretpostavi da ROS imaju važnu ulogu u patološkoj aktivaciji mikroglije koja je primećena u brojnim neurodegenerativnim oboljenjima (Rojo i sar., 2014). Takođe je pokazano da ROS aktiviraju NF- $\kappa$ B, putem nekoliko različitih mehanizama koji uključuju aktivaciju IKK i inaktivaciju I $\kappa$ B proteina (Morgan i Liu, 2011). Tako benfotiamin smanjujući koncentraciju •O<sub>2</sub><sup>-</sup> doprinosi smanjenju drugih reaktivnih vrsta čime ublažava oksidativni stres, ali i inflamaciju u mikroglijskim ćelijama.

ROS i RNS dovode do lipidne peroksidacije, odnosno do oštećenja polinezasićenih masnih kiselina prisutnih u ćelijskoj membrani. MDA je jedan od produkata lipidne peroksidacije čija koncentracija raste u neurodegenerativnim oboljenjima (Rojo i sar., 2014). U našim eksperimentima, LPS je indukovao povećanje sadržaja MDA u BV-2 ćelijama, što je bio dodatni indikator oksidativnog stresa, dok je tretman benfotiaminom smanjio koncentraciju MDA u aktiviranoj mikrogliji u svim upotrebljenim koncentracijama. Sposobnost benfotiamina da spreči lipidnu peroksidaciju prethodno je pokazana u sistemu renalne disfunkcije izazvane tretmanom cisplatinom (Harisa, 2013) i endotelu koji je bio izložen nikotinu (Balakumar i sar.,

2008). Može da se pretpostavi da je benfotiamin smanjio nivo MDA u BV-2 ćelijama putem smanjenja koncentracije ROS i RNS koji dovode do oštećenja membrana.

Mikroglijske ćelije imaju dobro razvijene unutrašnje antioksidativne mehanizme. Kada su izložene povećanom oksidativnom stresu, ove ćelije povećavaju ekspresiju antioksidativnih enzima SOD, CAT, GPx i GR. Pored toga, sadrže više koncentracije glutationa od svih drugih ćelija CNS-a. Antioksidativni enzimi i glutation čine efikasan odbrambeni sistem koji im omogućava da se bore protiv ROS i RNS koje proizvode i da tako očuvaju funkcije neophodne za odbranu i oporavak CNS-a (Dringen, 2005).

SOD familija enzima katalizuje reakciju prelaska  $\bullet\text{O}_2^-$  do  $\text{H}_2\text{O}_2$  čime se neutrališe prvi u nizu slobodnih radikala. Povećanje ekspresije ovih enzima posredovano je putem nekoliko signalnih mehanizama, između ostalog i NF- $\kappa$ B transkripcionim faktorom (Rojo i sar., 2004; Storz i sar., 2005; Morgan i Liu, 2011). U našem eksperimentalnom modelu zabeleženo je povećanje genske ekspresije MnSOD posle stimulacije LPS-om. Takođe, pokazan je trend povećanja proteinske ekspresije ovog enzima, koji je, iako nije zabeležena statistički značajna razlika, praćen značajnim porastom aktivnosti. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama u kojima je pokazana povećana ekspresija MnSOD u mikrogliji posle stimulacije LPS-om (Sugaya i sar., 1997; Kaneko i sar., 2012), što je indukovano signalnim molekulima koji aktiviraju NF- $\kappa$ B. Tako je pokazano da u *in vitro* uslovima raste ekspresija i aktivnost MnSOD u prisustvu ROS (Shull i sar., 1991), a dovedena je u vezu i sa povećanom NO produkcijom u ćelijama tretiranim LPS-om (Sugaya i sar., 1997). Pored toga, Cu,ZnSOD transfekovane BV-2 ćelije smanjuju produkciju NO, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u odgovoru na LPS tretman što je verovatno posledica smanjene koncentracije  $\bullet\text{O}_2^-$  (Chang i sar., 2001). Tretman BV-2 ćelija permeabilnom SOD smanjuje oslobađanje ROS i inhibira gensku i proteinsku ekspresiju COX-2 i iNOS, što dovodi do smanjene produkcije PGE<sub>2</sub> i NO (Lee i sar., 2010c). Važnu ulogu ovih enzima pokazuju i studije na transgenim miševima koji ne ekspimiraju gene za Cu,ZnSOD odnosno MnSOD. Ove životinje žive veoma kratko usled ozbiljnih oksidativnih oštećenja (Morgan i Liu, 2011). Na osnovu navedenih rezultata, ali i prethodnih studija može da se zaključi da SOD enzimi imaju značajne regulatorne funkcije i da njihova aktivnost doprinosi smanjenju produkcije ROS, RNS i proinflamatornih medijatora u aktiviranoj mikrogliji.

S obzirom da je MnSOD eksprimirana u mitohondrijama, povećana genska ekspresija i aktivnost ovog enzima može biti posledica i povećanog broja ili aktivnosti mitohondrija u aktiviranoj mikrogliji. Park i sar. su pokazali da ROS poreklom iz mitohondrija takođe imaju važnu ulogu u pokretanju proinflamatornih signalnih puteva tokom aktivacije mikroglije (Park i sar., 2013). Mikroglija aktivirana LPS-om ima povećane energetske potrebe i sintetisuje veće koncentracije ATP-a, pri čemu dolazi i do povećane produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$ . MnSOD neutralisuje nastali  $\bullet\text{O}_2^-$ , čija se ekspresija i aktivnost povećava u uslovima aktivacije (Bordt i Polster, 2014). Rezultati naše studije pokazuju da već 4 h posle stimulacije LPS-om dolazi do značajnog povećanja koncentracije ATP-a u BV-2 ćelijama. Nivo ATP-a se zatim smanjuje 24 h posle stimulacije LPS-om, ali i dalje ostaje povišen u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, benfotiamin povećava unutarćelijsku koncentraciju ATP-a u aktiviranim ćelijama 1 h posle tretmana u odnosu na kontrolne i LPS-om stimulisane ćelije. Posle 4 h tretmana, nivo ATP-a u grupi tretiranoj benfotiaminom i dalje raste, dok se 24 h kasnije vraća na kontrolne vrednosti. Na osnovu ovih rezultata može da se pretpostavi da LPS i benfotiamin povećavaju aktivnost i/ili broj mitohondrija. Ipak, uzroci povećane koncentracije ATP-a u ćelijama mogu biti raznoliki, te su potrebni dodatni eksperimenti koji bi rasvetlili mehanizme koji su osnova ovog fenomena.

Benfotiamin u koncentraciji 250  $\mu\text{M}$  povećava gensku i proteinsku ekspresiju MnSOD. Ovaj rezultat ide u prilog hipotezi da benfotiamin utiče na broj i aktivnost mitohodrija, s obzirom da promene u ekspresiji nisu praćene promenama u aktivnosti. Sa druge strane, tretman benfotiaminom povećava aktivnost Cu,ZnSOD u ćelijama stimulisanim LPS-om, što dovodi do smanjene ROS koncentracije u citoplazmi, a posredno i do smanjenog nivoa proinflamatornih medijatora (Chang i sar., 2001). Povećana aktivnost Cu,ZnSOD može biti i posledica povećane ekspresije COX-2 u aktiviranoj mikrogliji, s obzirom da ovaj enzim dodatno dovodi do produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  u citoplazmi (Marnett i sar., 1999).

Iako nije slobodan radikal,  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastao u reakciji koju katalizuje SOD je izuzetno reaktivan molekul koji lako prolazi kroz membrane i oštećuje različite ćelijske komponente. Pored toga,  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktivira NF- $\kappa\text{B}$  što uzrokuje dalje širenje inflamacije (Morgan i Liu, 2011). CAT je jedan od enzima koji katalizuje redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  do vode i

ima važnu regulatornu ulogu u inflamaciji i borbi protiv oksidativnog stresa. Ekspresija i aktivnost ovog enzima raste u inflamatornim uslovima (Kunwar i sar., 2009). Egzozogena CAT smanjuje NO produkciju i oslobađanje proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 u kulturi aktiviranih mikroglijskih ćelija, verovatno putem inhibicije MAPK i NF- $\kappa$ B (Pawate i sar., 2004), a sprečava i proliferaciju mikroglije indukovanu tretmanom citokinima TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Mander i sar., 2006). U našem eksperimentalnom modelu LPS nije uticao na gensku ekspresiju, ali je zato povećao proteinsku ekspresiju CAT. Benfotaimin je dodatno povećao proteinsku ekspresiju CAT u aktiviranim BV-2 ćelijama. Međutim, aktivnost CAT je bila niža u ćelijama stimulisanim LPS-om u odnosu na kontrolu, što nagoveštava da je došlo do inhibicije ovog enzima. Naime, pokazano je da je NO inhibitor CAT (Brown, 1995). Benfotiamin smanjuje oslobađanje NO u aktiviranim ćelijama na dozno-zavisan način, pri čemu je ova zavisnost obrnuto proporcionalna povećanju CAT aktivnosti posle tretmana benfotiaminom. Stoga može da se pretpostavi da je ovo jedan od mehanizama povećanja CAT aktivnosti pod tretmanom benfotiaminom, pored uticaja koji ostvaruje na CAT ekspresiju. Benfotiamin na ovaj način smanjuje koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u mikrogliji, što posredno utiče na smanjenje aktivacije NF- $\kappa$ B i iNOS ekspresije. Tako benfotiamin dovodi do formiranja povratne sprege i daljeg smanjenja NO produkcije, a time i smanjene ROS/RNS produkcije i mikroglijske aktivacije.

Smanjenje parametara oksidativnog stresa kao što su •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i MDA posle tretmana benfotiaminom može da se dovede u vezu i sa uticajem benfotiamina na glutation, glavni neenzimski antioksidans u ćelijama mikroglije. Nedostatak glutaciona dovodi do pokretanja apoptoze u kulturi ćelija (Li i sar., 1997; Wullner i sar., 1999). Poremećaj u metabolizmu glutaciona doveden je u vezu sa različitim patologijama CNS-a kao što su MS, PB, AB, ALS i šizofrenija (Ferreira i sar., 2013; Shulz i sar., 2000). Prikazani rezultati pokazuju da benfotiamin indukuje značajno povećanje ukupnog glutaciona u ćelijama stimulisanim LPS-om, što je verovatno posledica *de novo* sinteze. Glavni transkripcioni faktori uključeni u sintezu glutaciona su NRF2, AP-1 i NF- $\kappa$ B (Lu, 2009). S obzirom da benfotiamin smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B, a može da se pretpostavi da smanjuje i aktivaciju AP-1 (jer smanjuje aktivaciju MAPK signalnih kaskada koje aktiviraju ovaj transkripcioni faktor), efekat benfotiamina može biti posredovan preko

NRF2. Imajući u vidu da je NRF2 glavni redoks transkripcioni faktor u mikrogliji bilo bi zanimljivo ispitati da li i kako benfotiamin utiče na njegovu aktivaciju, kao deo budućih istraživanja antioksidativnih svojstava ovog analoga vitamina B1.

Glavni enzimi uključeni u metabolizam glutaciona su GPx i GR. GPx katalizuje reakciju redukcije  $H_2O_2$  do  $H_2O$ , pri čemu koristi GSH kao donor elektrona koji se pri tome oksiduje do GSSG. Nastali GSSG se redukuje do GSH u reakciji koju katalizuje GR, što omogućuje regeneraciju GSH i održavanje ćelijskog odbrambenog sistema (Shulz i sar., 2000). Iako se pretpostavlja da je GPx glavni enzim u CNS-u uključen u detoksifikaciju  $H_2O_2$ , u BV-2 mikrogljijskoj ćelijskoj liniji koja je ispitivana u ovoj disertaciji nije zabeležena promena u ekspresiji ili aktivnosti ovog enzima, kako posle stimulacije LPS-om, tako ni u stimulisanim ćelijama tretiranim benfotiaminom. Sa druge strane, zabeleženo je smanjenje enzimske aktivnosti GR u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om, iako se ekspresija nije menjala pod tretmanima. Ovi rezultati nagoveštavaju da tokom aktivacije mikroglije dolazi do inhibicije GR, što je u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju da je  $ONOO^-$  moćan inhibitor GR aktivnosti (Francescutti i sar., 1996). Koncentracija  $ONOO^-$  raste u aktiviranoj mikrogliji, kao posledica povećane produkcije NO i  $\bullet O_2^-$ . Benfotiamin smanjuje produkciju NO i  $\bullet O_2^-$ , čime dolazi i do smanjenja koncentracije  $ONOO^-$  u aktiviranoj mikrogliji, što pak dovodi do povećanja aktivnosti GR. Povećana GR aktivnost omogućava regeneraciju GSH i bolju antioksidativnu odbranu.

Na osnovu navedenih rezultata može da se zaključi da benfotiamin smanjuje oksidativni stres u aktiviranoj mikrogliji. Svoj efekat benfotiamin ostvaruje direktno, neutralizacijom toksičnih vrsta kao što su  $\bullet O_2^-$  i MDA, ali i posredno, aktivacijom antioksidativnog sistema u ćeliji. Tretman benfotiaminom dovodi do povećanja genske i proteinske ekspresije SOD2 i CAT, kao i povećane aktivnosti SOD1, CAT i GR u aktiviranim BV-2 ćelijama. Takođe, benfotiamin povećava ukupnu unutarćelijsku koncentraciju glutaciona. Signalizacija koja dovodi do promena u antioksidativnom sistemu je veoma kompleksna. Benfotiamin utiče na više različitih učesnika u ovoj signalizaciji i dovodi do formiranja povratne sprege u kojoj smanjenje ROS i RNS doprinosi smanjenju inflamatornog odgovora mikroglije.

Nakon što smo utvrdili da benfotiamin pokazuje antiinflamatorna i antioksidativna svojstva, hteli smo da ispitamo da li je njegovo dejstvo posredovano uticajem na signalne mehanizme u osnovi aktivacije BV-2 ćelija, te je u sledećem segmentu studije ispitivan njegov efekat na MAPK i PI3K/Akt signalne kaskade, kao i NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor.

Prethodne studije su ukazale na značaj aktivacije MAPK signalnih kaskada u različitim neurodegenerativnim oboljenjima. Signalizacija posredovana ovim kinazama dovodi do produkcije proinflamatornih medijatora, a dovedena je u vezu i sa poremećenim redoks statusom aktivirane mikroglije (Pawate i sar., 2004). Stoga je ispitan direktan efekat benfotiamina na aktivaciju odnosno fosforilaciju tri signalne kaskade: ERK, JNK i p38.

Tretman LPS-om, A $\beta$  ili proinflamatornim citokinima indukuje neurotoksični fenotip mikroglije putem aktivacije ERK signalne kaskade (Koistinaho i Koistinaho, 2002), dok tretman antiinflamatornim jedinjenjima koja smanjuju ERK aktivaciju ujedno dovodi i do smanjenja mikroglijske aktivacije (Zhong i sar., 2012; Choi i sar., 2009; Choi i Park, 2012). ERK aktivacija utiče na reorganizaciju aktina i tubulina i tako dovodi do promene morfologije tokom aktivacije i uvećanja ćelijskog tela (Waetzig i sar., 2005; Houle i sar., 2003; Tong i sar., 2003). Reorganizacija citoskeleta je događaj koji prethodi i migraciji aktivirane mikroglije (Abd-El-Basset i Fedoroff, 1995). ERK signalizacija takođe indukuje brojne proinflamatorne medijatore kao što su COX-2 (Choi i sar., 2003), TNF- $\alpha$  (Pyo i sar., 1998), IL-6 (Leonard i sar., 1999), kao i antiinflamatorni IL-10 (Saraiva i O'Garra, 2010). Stoga može da se zaključi da aktivacija ERK signalne kaskade ima važnu ulogu u brojnim procesima koji se odvijaju tokom aktivacije mikroglije.

U ovoj disertaciji pokazano je da LPS dovodi do brze i kratkotrajne aktivacije ERK-a u BV-2 mikrogliji, što je ustanovljeno procenom ekspresije fosforilovanih p42 i p44 subjedinica. Benfotiamin efikasno inhibira ovu signalizaciju u trenutku kada je ERK na vrhuncu aktivacije. Povoljan efekat inhibicije ERK signalizacije pokazan je u daljim eksperimentima sa MAPK inhibitorima. Naime, tretman BV-2 ćelija inhibitorom ERK signalizacije U0126 doveo je do smanjenja genske ekspresije i oslobađanja

proinflammatory citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, kao i NO produkcije, iako nije uticao na ekspresiju iNOS-a. Benfotiamin nije pokazao aditivni efekat u ko-tretmanu sa U0126 inhibitorom. Inhibitorski efekat benfotiamina na ERK aktivaciju prethodno je pokazan u kulturi makrofaga (Shoeb i Ramana, 2012), kao i u ćelijama mijeloidne leukemije (Sugimori i sar., 2015). Rezultati koji su dobijeni u ovoj studiji ukazuju na to da se ovaj uticaj benfotiamina može dovesti u vezu sa njegovim direktnim efektom na neutralizaciju ROS, s obzirom da je pokazano da ove toksične vrste dovode do aktivacije ERK (Pawate i sar., 2004). Međutim, imajući u vidu da proinflammatory medijatori u aktiviranoj mikrogliji iniciraju dalju produkciju drugih proinflammatory medijatora, može da se pretpostavi da benfotiamin ostvaruje svoj uticaj na ERK signalizaciju i putem drugih mehanizama. Naši rezultati ukazuju da je smanjenje ERK aktivacije jedan od mehanizama putem kog benfotiamin menja morfologiju aktiviranih BV-2 ćelija i smanjuje produkciju proinflammatory medijatora NO, COX-2, TNF- $\alpha$  i IL-6, smanjujući tako aktivaciju mikroglije.

JNK je jedna od najznačajnijih signalnih kaskada koja se nalazi u osnovi različitih CNS patologija. Kao i druge kinaze, JNK se aktiviraju fosforilacijom, a potom fosforilišu širok spektar supstrata na nivou citoskeleta, mitohondrija i jedra (Waetzig i Herdegen, 2004). Aktivacija JNK signalizacije indukuje proinflammatory fenotip mikroglije (Waetzig i sar., 2005), dok agensi koji inhibiraju ovu signalnu kaskadu ostvaruju antiinflammatory i neuroprotektivni efekat (Maroney i sar., 1998; Bozyczko-Coyne i sar., 2001). Pored ERK i p38, JNK učestvuju u reorganizaciji citoskeleta i uvećanju ćelijskog tela tokom aktivacije mikroglije (Waetzig i sar., 2005). Pokazano je i da je aktivacija JNK povezana sa povećanom ekspresijom enzima i citokina uključenih u inflamaciju, kao što su iNOS (Svensson i sar., 2010; Kacimi i sar., 2011), TNF- $\alpha$  (Waetzig i sar., 2005), IL-6 (Waetzig i sar., 2005; Jang i sar., 2008; Lin i sar., 2011), COX-2 i MCP-1 (Waetzig i sar., 2005).

U našoj studiji, benfotiamin značajno inhibira aktivaciju p54 JNK subjednice izazvanu stimulacijom LPS-om, što je u skladu sa rezultatima Yadav i sar., koji su pokazali da benfotiamin smanjuje aktivaciju JNK u kulturi makrofaga stimuliranih LPS-om (Yadav i sar., 2010). Sa druge strane, benfotiamin aktivira JNK signalnu kaskadu u ćelijama mijeloidne leukemije (Sugimori i sar., 2015). Naši rezultati

pokazuju da tretman BV-2 ćelija inhibitorom JNK signalizacije SP600125 smanjuje gensku ekspresiju iNOS i oslobađanje NO u medijum, kao i gensku ekspresiju i oslobađanje TNF- $\alpha$  u ćelijama stimulisanim LPS-om. Tretman ovim inhibitorom povećava gensku ekspresiju IL-6, iako smanjuje oslobađanje IL-6 u medijum, što nagoveštava da je regulacija ekspresije IL-6 na translacionom nivou. Prethodne studije pokazuju kontradiktorne rezultate u vezi sa ulogom JNK u regulaciji ekspresije IL-6, s obzirom da je pokazano da inhibicija JNK kaskade može indukovati povećanje (Kondo i sar., 2013), ali i smanjenje genske ekspresije IL-6 (Jang i sar., 2008; Lin i sar., 2011). U našim eksperimentima, benfotiamin nije pokazao aditivni efekat u ko-tretmanu sa SP006125 inhibitorom. S obzirom na to da JNK signalizaciju mogu da aktiviraju različiti molekuli, potrebni su dodatni eksperimenti da bi se utvrdilo na koji način benfotiamin ostvaruje ovaj efekat. Imajući u vidu da smo nedvosmisleno pokazali da benfotiamin inhibira JNK signalnu kaskadu, može da se pretpostavi je smanjenje aktivacije mikroglije posle tretmana benfotiaminom posredovano upravo ovom signalnom kaskadom i da dovodi do morfoloških promena koje vraćaju BV-2 ćelije u stanje nalik kontrolnom, kao i do smanjenog oslobađanje NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, kao i smanjene ekspresije COX-2.

Signalizacija preko p38 kinaze, trećeg člana MAPK familije, je takođe dovedena u vezu sa aktivacijom mikroglije (Koistinaho i Koistinaho, 2002). Iako literaturni podaci pokazuju da LPS dovodi do aktivacije p38 (Lee i sar., 2000; Li i sar., 2001; Yoshino i sar., 2011), u našem eksperimentalnom modelu nije zabeležena povećana fosforilacija p38 posle stimulacije BV-2 ćelija LPS-om. Promena u aktivaciji nije primećena ni pod tretmanom benfotiaminom. Ipak, LPS je doveo do povećanja ekspresije IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 i iNOS koji se nalaze nishodno u p38 signalizaciji, verovatno putem aktivacije drugih MAPK kaskada. Stoga može da se zaključi da i pored izostanka efekta na aktivaciju p38 u našem modelu neuroinflamacije, LPS efikasno aktivira BV-2 ćelije. Dodatni eksperimenti u kojima bi se ispitala aktivnost ushodnih kinaza su potrebni da bi se utvrdili mehanizmi u osnovi ovog fenomena.

PI3K/Akt signalni put ima plejotropne funkcije i učestvuje u migraciji, fagocitozi i ćelijskom preživljavanju (Cantley, 2002). Njegova uloga u inflamatornom odgovoru zavisi od tipa ćelija. Tako je pokazano da aktivacija ovog signalnog puta dovodi do



smanjenja inflamacije u makrofagima aktiviranim LPS-om (Gunzl i sar., 2010), kao i povećane produkcije IL-10 (Lee i sar., 2009). Sa druge strane, aktivacija Akt kinaze je dovedena u vezu sa proinflamatornim fenotipom u mikrogliji (Lin i sar., 2010). LPS dovodi do aktivacije Akt kinaze koja dalje aktivira NF- $\kappa$ B što dovodi do sinteze brojnih proinflamatornih medijatora (Saponaro i sar., 2012; Yu i sar., 2015). Takođe je pokazano da je ekspresija iNOS-a i oslobađanje NO u LPS-om stimulisanim ćelijama u vezi sa aktivacijom Akt (Saponaro i sar., 2012). Akt može da utiče na MAPK signalizaciju i ove dve signalne kaskade su blisko povezane (Aksamitiene i sar., 2011).

U našoj studiji, LPS je doveo do kratkotrajne aktivacije PI3K/Akt signalnog puta 30 min posle tretmana, dok je benfotiamin značajno smanjio Akt fosforilaciju, što pokazuje da je ovaj signalni put jedan od mehanizama smanjenja proinflamatornog fenotipa mikroglije. Da bi ovo potvrdili uradili smo dodatne eksperimente sa inhibitorom PI3K, LY294002. Tretman inhibitorom doveo je do smanjenja genske ekspresije iNOS i NO produkcije, kao i smanjenja genske ekspresije i oslobađanja TNF- $\alpha$  i IL-6, čime je potvrđeno učešće Akt signalnog puta u produkciji ovih proinflamatornih medijatora. Imajući u vidu da Akt reguliše NF- $\kappa$ B aktivaciju, smanjena ekspresija proinflamatornih medijatora je verovatno posredovana ovim transkripcionim faktorom. Naši rezultati ukazuju da su pokazani antiinflamatorni efekti benfotiamina jednim delom posredovani njegovim dejstvom na PI3K/AKT signalnu kaskadu.

Uloga NF- $\kappa$ B u CNS-u je veoma kompleksna. Sa jedne strane, aktivacija NF- $\kappa$ B u neuronima promoviše preživljavanje, dok u mikrogliji indukuje proinflamatorni fenotip koji doprinosi neurodegeneraciji. Poznato je da NF- $\kappa$ B reguliše gotovo sve proinflamatorne medijatore. Naime, aktivacija NF- $\kappa$ B dovodi do ekspresije TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, iNOS, COX-2, CD40, NOX, kao i brojnih drugih učesnika u inflamatornom odgovoru (Rojo i sar., 2014; Wang i sar., 2002). Sa druge strane, NF- $\kappa$ B aktivira i antioksidativne enzime kao što su MnSOD, Cu,ZnSOD, HO-1, GPx i drugi (Morgan i Liu, 2011). Pretpostavlja se da ROS modulacija NF- $\kappa$ B ima ulogu u povećanju ekspresije antioksidativnih enzima i glutationa što dovodi do smanjenja oksidativnog stresa i preživljavanja ćelija. ROS aktiviraju i JNK signalnu kaskadu koja može da dovede do apoptoze. Međutim, putem povećanja ekspresije antioksidativnih

enzima, NF- $\kappa$ B smanjuje produkciju ROS, a time i aktivaciju JNK što sprečava ćelijsku smrt (Perkins, 2007). I pored antioksidativnih i antiapoptotskih efekata koje NF- $\kappa$ B ostvaruje, smanjenje NF- $\kappa$ B aktivacije ima povoljnu ulogu u mikrogliji s obzirom da dovodi do smanjenja produkcije proinflamatornih medijatora i tako sprečava formiranje začaranog kruga inflamacije (Wang i sar., 2011; Zhong i sar., 2012; Dang i sar., 2014).

Naši rezultati su pokazali da benfotiamin efikasno sprečava aktivaciju NF- $\kappa$ B, odnosno njegovu translokaciju u jedro izazvanu stimulacijom LPS-om. Imajući u vidu pomenutu ulogu NF- $\kappa$ B u indukciji proinflamatornog i prooksidativnog fenotipa, može da se zaključi da je inhibicija NF- $\kappa$ B aktivacije jedan od važnih signalnih mehanizama putem kojeg benfotiamin ostvaruje svoj antiinflamatorni i antioksidativni efekat. Inhibitorski efekat benfotiamina na NF- $\kappa$ B je pokazan prethodno u kulturi makrofaga (Yadav i sar., 2010; Shoeb i Ramana, 2012), kao i u retinama životinja obolelih od dijabetesa (Hammes i sar., 2003). U ovoj studiji, uticaj benfotiamina na NF- $\kappa$ B posredovan je delom njegovim direktnim efektom na smanjenje  $\bullet\text{O}_2^-$ , a time i ostalih reaktivnih vrsta. Takođe, PI3K/Akt signalizacija je jedan od mehanizama aktivacije NF- $\kappa$ B (Saponaro i sar., 2012). Pokazano je da TNF- $\alpha$  aktivira NF- $\kappa$ B preko aktivacije Akt-a koji aktivira IKK i tako omogućuje translokaciju NF- $\kappa$ B u jedro (Ozes i sar., 1999). Budući da je u našim eksperimentima pokazano da benfotiamin smanjuje aktivaciju Akt-a izazvanu stimulacijom LPS-om, može da se zaključi da benfotiamin na ovaj način smanjuje i aktivaciju NF- $\kappa$ B. Signalizacija putem CD40 receptora takođe dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B (Benveniste i sar., 2004). Imajući u vidu da benfotiamin smanjuje ekspresiju CD40, ovo može biti još jedan od mehanizama inhibicije NF- $\kappa$ B. Na osnovu svega navedenog može da se zaključi da benfotiamin smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B putem nekoliko različitih mehanizama i da tako narušava pozitivnu povratnu spregu koja se formira tokom aktivacije mikroglije i za posledicu ima brojne štetne efekte po okolno tkivo.

Generalni zaključak nakon razmatranja rezultata ove disertacije u celini je da benfotiamin ostvaruje antiinflamatorni i antioksidativni efekat u aktiviranim mikroglijskim ćelijama. Benfotiamin ne utiče na vijabilnost BV-2 ćelija, ali menja morfologiju mikroglije stimulisane LPS-om, vraćajući ih u stanje nalik kontrolnom. Benfotiamin smanjuje produkciju glavnih proinflamatornih medijatora kao što su NO,

•O<sub>2</sub><sup>-</sup>, TNF-α i IL-6, dok istovremeno povećava antioksidativni kapacitet aktivirane mikroglije. Proučavanjem signalnih puteva u osnovi aktivacije mikroglije zaključeno je da benfotiamin ostvaruje svoj efekat smanjujući aktivaciju ERK, JNK i Akt signalne kaskade, kao i NF-κB transkripcionog faktora. S obzirom da inhibira više signalnih kaskada, benfotiamin onemogućuje kompenzaciju od strane drugih signalnih mehanizama koji bi doveli do pojačanog inflamatornog odgovora. Benfotiamin na ovaj način sprečava prekomerni odgovor mikroglije koji u tkivu dovodi do hronične inflamacije i oštećenja tkiva. Stoga, rezultati ove studije pokazuju da je benfotiamin potencijalni terapeutik za neurodegenerativna oboljenja koja se odlikuju hroničnom inflamacijom i oksidativnim stresom, kao što su AB, PB, MS i ALS. U prilog ovoj tezi idu i rezultati kliničkih studija u kojima je ispitivan terapijski potencijal benfotiamina u lečenju dijabetesa, a koji pokazuju da je benfotiamin bezbedno jedinjenje čija upotreba ne dovodi do štetnih sporednih efekata. Ipak, dodatna istraživanja, prevashodno u animalnim modelima, su potrebna da bi se dalje proučio terapijski potencijal benfotiamina u oboljenjima CNS-a.

# **VI ZAKLJUČCI**

Na osnovu postavljenih ciljeva i analize rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Benfotiamin u koncentracijama 1-500  $\mu\text{M}$  ne utiče na vijabilnost nestimuliranih i LPS-om stimuliranih BV-2 mikroglialskih ćelija. Stimulacija LPS-om dovodi do umerene apoptoze i nekroze BV-2 ćelija.
2. Benfotiamin ne utiče na morfologiju nestimuliranih BV-2 ćelija koje su pretežno loptastog oblika sa F-aktinom difuzno raspoređenim uz membranu. Sa druge strane, BV-2 ćelije stimulirane LPS-om imaju uvećano ćelijsko telo i brojne mikroprojekcije i nastavke sa nagomilanim F-aktinom reorganizovanim u filamentozne snopove. Benfotiamin sprečava promene u morfologiji aktiviranih BV-2 ćelija. Ćelije tretirane benfotiaminom pre stimulacije LPS-om imaju oblik i veličinu kao u kontrolnim uslovima.
3. Benfotiamin smanjuje ekspresiju imunoregulatornog receptora CD40 u aktiviranim BV-2 ćelijama što je jedan od pokazatelja njegovog antiinflamatornog potencijala.
4. Benfotiamin dozno-zavisno smanjuje oslobađanje proinflamatornog medijatora NO u BV-2 ćelijama stimuliranim LPS-om. Ovaj efekat benfotiamin ostvaruje smanjujući gensku i proteinsku ekspresiju iNOS, enzima koji dovodi do povećane produkcije NO, čija je ekspresija indukovana stimulacijom LPS-om.
5. Benfotiamin smanjuje gensku i proteinsku ekspresiju inducibilnog enzima COX-2 u aktiviranim BV-2 ćelijama.
6. Benfotiamin u kontrolnim BV-2 kulturama ne utiče na gensku i proteinsku ekspresiju proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, kao ni antiinflamatornog IL-10. Sa druge strane, benfotiamin smanjuje gensku ekspresiju i oslobađanje TNF- $\alpha$  i IL-6 u BV-2 ćelijama stimuliranim LPS-om. Takođe, benfotiamin povećava oslobađanje IL-10.
7. Benfotiamin smanjuje LPS-om indukovano povećanje nivoa  $\bullet\text{O}_2^-$  i MDA u BV-2 ćelijama.

8. Benfotiamin povećava ekspresiju MnSOD i CAT, aktivnost Cu,ZnSOD, CAT i GR, kao i količinu ukupnog glutaciona, glavnog neenzimskog antioksidansa u mikrogliji. Uz to, benfotiamin povećava nivo ATP-a u aktiviranim ćelijama, što ukazuje na povećan broj i/ili aktivnost mitohondrija, kao i poboljšani energetska status ćelija.
9. Sumirajući efekte benfotiamina na morfološke i funkcijske karakteristike BV-2 ćelija stimuliranih LPS-om, i njegov uticaj na produkciju proinflammatoryh medijatora i citokina, kao i na ekspresiju i aktivnost enzima antioksidativne zaštite i koncentraciju ukupnog glutaciona, može da se zaključi da benfotiamin ispoljava snažan imunosupresivni i antioksidativni potencijal u aktiviranim BV-2 ćelijama.
10. Antiinflammatory i antioksidativni uticaj na aktivirane BV-2 ćelije benfotiamin ostvaruje delujući na ERK, JNK i Akt signlane kaskade, čija je aktivacija odgovorna za LPS-om indukovanu ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, i produkciju NO.
11. Benfotiamin smanjuje LPS-om indukovanu translokaciju NF- $\kappa$ B iz citoplazme u jedro, što je jedan od glavnih puteva antiinflammatorynog i antioksidativnog dejstva benfotiamina.

Na osnovu svega prethodnog, može da se izvede opšti zaključak da benfotiamin ostvaruje imunosupresivno i antioksidativno delovanje u aktiviranim BV-2 mikroglijskim ćelijama. To bi mogao biti osnov sprečavanja preterane i hronične aktivacije mikroglije, što je jedna od osnovnih karakteristika neurodegenerativnih oboljenja. Stoga rezultati ove disertacije upućuju na zaključak da benfotiamin može biti potencijalan agens za lečenje oboljenja CNS-a koja se odlikuju hroničnom neuroinflammatoryjom, kao što su MS, AB, PB, ALS i brojna druga.

## **VII LITERATURA**

- Abd-el-Basset E, Fedoroff S. Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res.* 1995, 41(2):222-37.
- Abd-El-Basset EM, Prashanth J, Ananth Lakshmi KV. Up-regulation of cytoskeletal proteins in activated microglia. *Med Princ Pract.* 2004, 13(6):325-33.
- Abd-El-Basset, E. Bacterial Endotoxin Induces Changes in the Organization and Expression of Actin and Modulation of the Cell Membrane of Microglia. *Med Princ Prac* 2000, 9(2), 81-90.
- Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Ichikawa H. Targeting Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 for Prevention and Therapy of Cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1091(1):151–169.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007, 10(12):1538-43.
- Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012, 40(1):139-46.
- Akundi RS, Candelario-Jalil E, Hess S, Hüll M, Lieb K, Gebicke-Haerter PJ, Fiebich BL. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Glia.* 2005, 51(3):199-208.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996, 15(23):6541-51.
- Alfadhli S, Mohammed EMA, Shubaili AAI. Association analysis of nitric oxide synthases: NOS1, NOS2A and NOS3 genes, with multiple sclerosis. *Ann Hum Biol.* 2013, 40(4):368–75.
- Alkhalaf A, Kleefstra N, Groenier KH, Bilo HJ, Gans RO, Heeringa P, Scheijen JL, Schalkwijk CG, Navis GJ, Bakker SJ. Effect of benfotiamine on advanced glycation endproducts and markers of endothelial dysfunction and inflammation in diabetic nephropathy. *PLoS One.* 2012, 7(7):e40427.
- Alkhalaf A, Klooster A, van Oeveren W, Achenbach U, Kleefstra N, Slingerland RJ, Mijnhout GS, Bilo HJ, Gans RO, Navis GJ, Bakker SJ. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on benfotiamine treatment in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2010, 33(7):1598-601.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia.* 2001, 36(2):165-79.



- Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, García-Fantini M, Aleixandre M. Serum TNF- $\alpha$  levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007, 28(4):533-6.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004, 10:S18–S25.
- Anderson ME. Tissue glutathione. U: Greenwald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press. 1986, 317-23.
- Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem*. 2006, 281(9):5657-67.
- Aoyama L, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*. 2008, 108(3):227–238.
- Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*. 1994, 302(Pt 3):723–727.
- Arimoto T, Choi DY, Lu X, Liu M, Nguyen XV, Zheng N, Stewart CA, Kim HC, Bing G. Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol Aging*. 2007, 28(6):894–906.
- Arulampalam V, Kolosenko I, Hjortsberg L, Björklund AC, Grandér D, Tamm KP. Activation of STAT1 is required for interferon- $\alpha$ -mediated cell death. *Exp Cell Res*. 2011, 317(1)9–19.
- Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol*. 2008, 28(7):923-31.
- Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998, 284(1):215-21.
- Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res*. 2010, 61(6):482-8.
- Balakumar P, Sharma R, Singh M. Benfotiamine attenuates nicotine and uric acid-induced vascular endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacol Res*. 2008, 58(5-6):356-63.
- Bal-Price A, Matthias A, Brown GC. Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem*. 2002, 80(1):73–80.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. 2004, 3(3):205–214.

- Bauer MK, Lieb K, Schulze-Osthoff K, Berger M, Gebicke-Haerter PJ, Bauer J, Fiebich BL. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur J Biochem.* 1997, 243(3):726-31.
- Baune BT, Wiede F, Braun A, Golledge J, Arolt V, Koerner H. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2008, 147B(7):1056–1064.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science.* 2002, 295(5563):2282–2285.
- Bellezza I, Mierla A, Grottelli S, Marcotullio MC, Messina F, Roscini L, Cardinali G, Curini M, Minelli A. Furanodien-6-one from *Commiphora erythraea* inhibits the NF- $\kappa$ B signalling and attenuates LPS-induced neuroinflammation. *Mol Immunol.* 2013, 54(3-4):347-54.
- Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jul-Aug;20(4):330-6.
- Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun.* 2004, 18(1):7-12.
- Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol.* 1992, 263:C1–C16.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci.* 1998, 18(5):1633-41.
- Bishopric NH, Jayasena V, Webster KA. Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1992, 267(35):25535-40.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol.* 1990, 27(2-3):229-37.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007, 8(1):57-69.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 1995, 202 (1–2):17–20.
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res.* 1992, 31(4):616-21.

- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013, 39(1):3-18.
- Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*. 1992, 587(2):250-6.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochem Res*. 2003, 28(5):699–703.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochem Res*. 2003, 28(5):699-703.
- Bonetti B, Stegagno C, Cannella B, Rizzuto N, Moretto G, Raine CS. Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol*. 1999, 155(5):1433-8.
- Bordt EA, Polster BM. NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radic Biol Med*. 2014, 76:34-46.
- Bozic I, Savic D, Laketa D, Bjelobaba I, Milenkovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I. Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. *PLoS One*. 2015a, 10(2):e0118372.
- Bozic I, Savic D, Stevanovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I. Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells. *Front Cell Neurosci*. 2015b, 9:351.
- Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem*. 2001, 77(3):849-63.
- Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2011, 50(5):633–40.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002, 33(11):1440–50.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002, 33(11):1440-50.
- Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1411(2-3):351-69.
- Brown GC. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem*. 1995, 232(1):188-91.

- Butterfield L, Zentrich E, Beekman A, Heasley LE. Stress- and cell type-dependent regulation of transfected c-Jun N-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase kinase isoforms. *Biochem J*. 1999, 338(Pt 3):681-6.
- Calingasan NY, Erdely HA, Altar CA. Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol Aging*. 2002, 23(1):31-9.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002, 296(5573):1655-7.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 2006, 9(7):917-24.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. 1975, 72(9):3666-70.
- Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol (1985)*. 2006, 100(1):150-6.
- Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell*. 2003, 4(4):521-33.
- Chang SC, Kao MC, Fu MT, Lin CT. Modulation of NO and cytokines in microglial cells by Cu/Zn-superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*. 2001, 31(9):1084-9.
- Chatterjee S, Noack H, Possel H, Wolf G. Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *Glia*. 2000, 29(1):98-101.
- Chen K, Huang J, Gong W, Zhang L, Yu P, Wang JM. CD40/CD40L dyad in the inflammatory and immune responses in the central nervous system. *Cell Mol Immunol*. 2006, 3(3):163-9.
- Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014, 30(2):271-281.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Are "resting" microglia more "m2"? *Front Immunol*. 2014, 5:594.
- Choi SH, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci*. 2003, 23(13):5877-86.
- Choi Y, Lee MK, Lim SY, Sung SH, Kim YC. Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1beta by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells. *Br J Pharmacol*. 2009, 156(6):933-40.

- Choi YH, Park HY. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *J Biomed Sci*. 2012, 19:31.
- Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010, 48(6):749–762.
- Clausen A, Xu X, Bi X, Baudry M. Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 in a mouse model of Alzheimer's disease: protection against and interruption of progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline. *J Alzheimers Dis*. 2012, 30(1):183-208.
- Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett*. 1987, 223(2):284-8.
- Cordle A, Landreth G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses. *J Neurosci*. 2005, 25(2):299-307.
- Crocker SJ, Lamba WR, Smith PD, Callaghan SM, Slack RS, Anisman H, Park DS. c-Jun mediates axotomy-induced dopamine neuron death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(23):13385–13390.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995, 378(6559):785-9.
- Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem*. 1997, 272(45):28373-80.
- Dang Y, Xu Y, Wu W, Li W, Sun Y, Yang J, Zhu Y, Zhang C. Tetrandrine suppresses lipopolysaccharide-induced microglial activation by inhibiting NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways in BV2 cells. *PLoS One*. 2014, 9(8):e102522.
- Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med*. 2013, 62:170–185.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005, 8(6):752-8.
- D'Aversa TG, Weidenheim KM, Berman JW. CD40-CD40L interactions induce chemokine expression by human microglia: implications for human immunodeficiency virus encephalitis and multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2002, 160(2):559-67.
- Davis RL, Sanchez AC, Lindley DJ, Williams SC, Syapin PJ. Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. *Nitric Oxide*. 2005, 12(4):200–9.

Ding Z, Mathur V, Ho PP, James ML, Lucin KM, Hoehne A, Alabsi H, Gambhir SS, Steinman L, Luo J, Wyss-Coray T. Antiviral drug ganciclovir is a potent inhibitor of microglial proliferation and neuroinflammation. *J Exp Med*. 2014, 211(2):189-98.

Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, Kraus D, Hlawatsch J, Walczak Y, Moehle C, Fuchshofer R, Langmann T. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation*. 2010, 7:3.

Doherty GH. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. *Neurosci Bull*. 2011, 27(6):366–82.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 2000, 267:4912–4916.

Dringen R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005, 7(9-10):1223-33.

Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW. Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013, 8(4):807-23.

Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*. 1997, 381(2):119–129.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012, 8(9):1254-66.

Eskes C, Honegger P, Juillerat-Jeanneret L, Monnet-Tschudi F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia*. 2002, 37(1):43–52.

Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 2007, 101(3):577-99.

Ferreira B, Mendes F, Osório N, Caseiro A, Gabriel A, Valado A. Glutathione in multiple sclerosis. *Br J Biomed Sci*. 2013, 70(2):75-9.

Figuroa S, Oset-Gasque MJ, Arce C, Martinez-Honduvilla CJ, González MP. Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J Neurosci Res*. 2006, 83(3):441-9.

Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1991, 129(2):318-20.

- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989, 170(6):2081–2095.
- Fischer HG, Reichmann G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol*. 2001, 166(4):2717-26.
- Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*. 2012,135(3):886–99.
- Fischer R, Kontermann R, Maier O. Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. *Antibodies*. 2015, 4(1):48–70.
- Forman HJ, Torres M. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life*. 2001, 51(6):365-71.
- Francescutti D, Baldwin J, Lee L, Mutus B. Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng*. 1996, 9(2):189-94.
- Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015, 131:65-86.
- Fraser DA, Hessvik NP, Nikolić N, Aas V, Hanssen KF, Bøhn SK, Thoresen GH, Rustan AC. Benfotiamine increases glucose oxidation and downregulates NADPH oxidase 4 expression in cultured human myotubes exposed to both normal and high glucose concentrations. *Genes Nutr*. 2012, 7(3):459-69.
- Frei K, Fredrikson S, Fontana A, Link H. Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1991, 31(2):147-53.
- Frick LR, Williams K, Pittenger C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*. 2013, 2013:608654.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997, 272(30):18515-7.
- Furtner T, Zierler S, Kerschbaum HH. Blockade of chloride channels suppresses engulfment of microspheres in the microglial cell line, BV-2. *Brain Res*. 2007, 1184:1-9.
- Gadau S, Emanuelli C, Van Linthout S, Graiani G, Todaro M, Meloni M, Campesi I, Invernici G, Spillmann F, Ward K, Madeddu P. Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia*. 2006, 49(2):405-20.
- Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *NeuroMolecular Med*. 16(2):217–230.

Gan L, Johnson JA. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1842(8):1208–1218.

Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundörfer B, Daniel WG. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke*. 2003, 34(6):1412-8.

Gelderblom M, Eminel S, Herdegen T, Waetzig V. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton--functions beyond neurodegeneration. *Int J Dev Neurosci*. 2004, 22(7):559-64.

Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93(6):2499-504.

Gertig U, Hanisch UK. Microglial diversity by responses and responders. *Front Cell Neurosci*. 2014, 8:101.

Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 1986, 6(8):2163-78.

Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010, 9(2):149-55.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010, 140(6):918-34.

Gobbel GT, Chan TY, Chan PH. Nitric oxide- and superoxide-mediated toxicity in cerebral endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997, 282(3):1600-7.

Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia*. 2013, 61(1):112-20.

González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. 2014, 274(1-2):1-13.

Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991, 196(2-3):143-51.

Greter M, Lelios I, Croxford AL. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol*. 2015, 6:249.

Günzl P, Bauer K, Hainzl E, Matt U, Dillinger B, Mahr B, Knapp S, Binder BR, Schabbauer G. Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation. *J Leukoc Biol*. 2010, 88(6):1259-69.

Hailer NP. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol*. 2008, 84(3):211-33.



Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2003, 9(3):294-9.

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007, 10(11):1387-94.

Hanisch UK. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci.* 2013, 7:65.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002, 40(2):140-55.

Harisa GI. Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013, 27(8):398-405.

Haupt E, Ledermann H, Köpcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy--a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2005, 43(2):71-7.

Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012, 26(3):203-34.

Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, 3(1):30-40.

Hegazy MEF, Hamed AR, Mohamed TA, Debbab A, Nakamura S, Matsudac H, Paré PW. Anti-inflammatory sesquiterpenes from the medicinal herb *Tanacetum sinaicum*. *RSC Adv.* 2015, 5:44895-44901.

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005, 115(1):1-20.

Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 2014, 14(7):463-77.

Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* 2009;26(2):83-94.

Heyen JR, Ye S, Finck BN, Johnson RW. Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000, 77(1):138-47.

Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem.* 2000, 75(3):965-972.

Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 2000, 19(21):2548–2556.

Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1985, 82(16):5490–4.

Hirohata S, Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum*. 1990, 33(5):644-9.

Hirrlinger J, Gutterer JM, Kussmaul L, Hamprecht B, Dringen R. Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev Neurosci*. 2000, 22 (5–6):384–92.

Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*. 2004, 279(31):32804-12.

Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*. 2001, 21(6):1975-82.

Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem*. 2008, 107(2):557-69.

Houle F, Rousseau S, Morrice N, Luc M, Mongrain S, Turner CE, Tanaka S, Moreau P, Huot J. Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress: impact on membrane blebbing. *Mol Biol Cell*. 2003, 14(4):1418-32.

Huang BR, Chang PC, Yeh WL, Lee CH, Tsai CF, Lin C, Lin HY, Liu YS, Wu CY, Ko PY, Huang SS, Hsu HC, Lu DY. Anti-neuroinflammatory effects of the calcium channel blocker nicardipine on microglial cells: implications for neuroprotection. *PLoS One*. 2014, 9(3):e91167.

Hüll M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J. The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 1996, 78(1):37-41.

Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(14):7531 -6.

Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*. 1998, 10(2):205-19.

Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI, Höjberg B, Müssener A, Olsson T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol.* 1996, 69(1–2):103–15.

Jana M, Dasgupta S, Liu X, Pahan K. Regulation of tumor necrosis factor-alpha expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J Neurochem.* 2002, 80(1):197-206.

Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K. Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J Biol Chem.* 2001, 276(48):44527-33.

Jang S, Kelley KW, Johnson RW. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105(21):7534-9.

Jayasooriya RG, Lee KT, Lee HJ, Choi YH, Jeong JW, Kim GY. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin in BV2 microglia are mediated through suppression of the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway and activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014, 65:82-9.

Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007, 83:507-20.

Jha SK, Jha NK, Kar R, Ambasta RK, Kumar P. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. *Int J Mol Cell Med.* 2015, 4(2):67-86.

Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem Int.* 2011, 58(3):248-60.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005, 26(4-5):340-52.

Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb J.* 2001, 15(1):43–58.

Kacimi R, Giffard RG, Yenari MA. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- $\kappa$ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm.* 2011, 8:7.

Kallapura G, Pumford NR, Hernandez-Velasco X, Hargis BM, Tellez G. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *Journal of Microbiology Research and Reviews.* 2014, 2(1):6-11.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1(3):a001271.

- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - From molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1754(1-2):253-262.
- Kaneko YS, Ota A, Nakashima A, Mori K, Nagatsu I, Nagatsu T. Regulation of oxidative stress in long-lived lipopolysaccharide-activated microglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012, 39(7):599-607.
- Katsumoto A, Lu H1, Miranda AS, Ransohoff RM. Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *J Immunol*. 2014, 193(6):2615-21.
- Ke ZJ, DeGiorgio LA, Volpe BT, Gibson GE. Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003, 62(2):195-207.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011, 91(2):461-553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013, 77(1):10-8.
- Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against beta-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res*. 2009, 32(6):869-81.
- Kim WK, Ganea D, Jonakait GM. Inhibition of microglial CD40 expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is mediated by interleukin-10. *J Neuroimmunol*. 2002, 126(1-2):16-24.
- Kim WK, Hwang SY, Oh ES, Piao HZ, Kim KW, Han IO. TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol*. 2004, 172(11):7015-23.
- Kingham PJ, Cuzner ML, Pocock JM. Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurones as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation. *J Neurochem*. 1999, 73(2):538-47.
- Kingham PJ, Pocock JM. Microglial apoptosis induced by chromogranin A is mediated by mitochondrial depolarisation and the permeability transition but not by cytochrome c release. *J Neurochem*. 2000, 74(4):1452-62.
- Kitagishi Y, Matsuda S. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury. *Alzheimers Res Ther*. 2013, 5(5):42.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther*. 2012, 19(7):724-33.

- Kloss CU, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol*. 2001, 168(1):32-46.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994, 298:249-58.
- Koistinaho M, Kettunen MI, Goldsteins G, Keinänen R, Salminen A, Ort M, Bures J, Liu D, Kauppinen RA, Higgins LS, Koistinaho J. Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(3):1610-5.
- Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*. 2002, 40(2):175-83.
- Kondo A, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H. Inhibition of SAPK/JNK leads to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2013, 535(2):227-33.
- Koppal T, Drake J, Yatin S, Jordan B, Varadarajan S, Bettenhausen L, Butterfield DA. Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1999, 72(1):310-7.
- Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock*. 1995, 4(5):311-7.
- Kothur K, Wienholt L, Brilot F, Dale RC. Cytokine Review article CSF cytokines / chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. *Cytokine*. 2015, u štampi.
- Kraft AD, Harry GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2011, 8(7):2980-3018.
- Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol*. 2005, 162(1-2):71-80.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996, 19(8):312-8.
- Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J Biol Chem*. 2001, 276(11):8445-52.
- Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des*. 2008, 14(32):3408-16.

Kumar A, Chen SH, Kadiiska MB, Hong JS, Zielonka J, Kalyanaraman B, Mason RP. Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic Biol Med.* 2014, 73:51-9.

Kunwar A, Sandur SK, Krishna M, Priyadarsini KI. Curcumin mediates time and concentration dependent regulation of redox homeostasis leading to cytotoxicity in macrophage cells. *Eur J Pharmacol.* 2009, 611(1-3):8-16.

Kwilasz AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology.* 2014, 2:55–69.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 2012, 92(2):689-737.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001, 81(2):807-69.

Lassmann H. Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. *Exp Neurol.* 2013, 262:2–7.

Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V. Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem Res.* 2001, 26(11):1209-16.

Laurenzi MA, Sidén A, Persson MA, Norkrans G, Hagberg L, Chiodi F. Cerebrospinal fluid interleukin-6 activity in HIV infection and inflammatory and noninflammatory diseases of the nervous system. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990, 57(2):233-41.

Lavrnja I, Parabucki A, Brkic P, Jovanovic T, Dacic S, Savic D, Pantic I, Stojiljkovic M, Pekovic S. Repetitive hyperbaric oxygenation attenuates reactive astrogliosis and suppresses expression of inflammatory mediators in the rat model of brain injury. *Mediators Inflamm.* 2015, 2015:498405.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990, 39(1):151-70.

Ledeboer A, Brevé JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci.* 2002, 16(7):1175-85.

Lee J, Hur J, Lee P, Kim JY, Cho N, Kim SY, Kim H, Lee MS, Suk K. Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *J Biol Chem.* 2001b, 276(35):32956-65.

Lee JA, Song HY, Ju SM, Lee SJ, Seo WY, Sin DH, Goh AR, Choi SY, Park J. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by cell-permeable

superoxide dismutase in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Mol Cells*. 2010c, 29(3):245-50.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994, 372(6508):739-46.

Lee M, Cho T, Jantarantoi N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J*. 2010a, 24(7):2533-45.

Lee M, Tazzari V, Giustarini D, Rossi R, Sparatore A, Del Soldato P, McGeer E, McGeer PL. Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation: potential for treating Parkinson disease. *J Biol Chem*. 2010b, 285(23):17318-28.

Lee P, Lee J, Kim S, Lee MS, Yagita H, Kim SY, Kim H, Suk K. NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. *Brain Res*. 2001a, 892(2):380-5.

Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol*. 1993, 150(7):2659-67.

Lee TP, Leu SJ, Huang JC, Song YC, Jhou RS, Tang SJ, Sun KH. Anti-ribosomal phosphoprotein autoantibody triggers interleukin-10 overproduction via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signalling pathways in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Immunology*. 2009, 127(1):91-102.

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*. 2002, 8(3):240-246.

Lee YB, Schrader JW, Kim SU. p38 map kinase regulates TNF-alpha production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine*. 2000, 12(7):874-80.

Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 2010, 58(3):253-63.

Leonard M, Ryan MP, Watson AJ, Schramek H, Healy E. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells. *Kidney Int*. 1999, 56(4):1366-77.

Li F, Calingasan NY, Yu F, Mauck WM, Toidze M, Almeida CG, Takahashi RH, Carlson GA, Flint Beal M, Lin MT, Gouras GK. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem*. 2004, 89(5):1308-12.

Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(28):9936-41.

- Li Y, Liu L, Barger SW, Mrak RE, Griffin WS. Vitamin E suppression of microglial activation is neuroprotective. *J Neurosci Res.* 2001, 66(2):163-70.
- Li Y, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 1997, 19(2):453-63.
- Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One.* 2012, 7(10):e46536.
- Lin HY, Tang CH, Chen JH, Chuang JY, Huang SM, Tan TW, Lai CH, Lu DY. Peptidoglycan induces interleukin-6 expression through the TLR2 receptor, JNK, c-Jun, and AP-1 pathways in microglia. *J Cell Physiol.* 2011, 226(6):1573-82.
- Lin HY, Tang CH, Chen YH, Wei IH, Chen JH, Lai CH, Lu DY. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. *Int Immunopharmacol.* 2010, 10(8):883-91.
- Lin W, Lin Y. Interferon- $\gamma$  inhibits central nervous system myelination through both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways. *J Neurosci Res.* 2010, 88(12):2569-77.
- Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem.* 2001, 77(1):182-9.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8(8):627-44.
- Liu PW, Chen MF, Tsai AP, Lee TJ. STAT1 mediates oroxylin A inhibition of iNOS and pro-inflammatory cytokines expression in microglial BV-2 cells. *PLoS One.* 2012, 7(12):e50363.
- Lo JY, Kamarudin MN, Hamdi OA, Awang K, Kadir HA. Curcumenol isolated from *Curcuma zedoaria* suppresses Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation and p38 MAPK signaling pathway in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *Food Funct.* 2015, 6(11):3550-9.
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009, 30(1-2):42-59.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008, 42(2):145-51.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006, 147 S1:S232-40.
- Lukiw WJ, Bazan NG. Strong nuclear factor-kappaB-DNA binding parallels cyclooxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporal lobe neocortex. *J Neurosci Res.* 1998, 53(5):583-92.



Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1991, 32(1):67-74.

Malmeström C, Andersson BA, Haghighi S, Lycke J. IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles. *J Neuroimmunol*. 2006, 175(1-2):176-82.

Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2005, 2:20.

Mander PK, Jekabsone A, Brown GC. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol*. 2006, 176(2):1046-52.

Manivannan J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST. Dihydropyrimidinase-like 3 regulates the inflammatory response of activated microglia. *Neuroscience*. 2013, 253:40-54.

Manzardo AM, He J, Poje A, Penick EC, Campbell J, Butler MG. Double-blind, randomized placebo-controlled clinical trial of benfotiamine for severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*. 2013, 133(2):562-70.

Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Lauro D, Fukamizu A, Lauro R, Federici M. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes*. 2006, 55(8):2231-7.

Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem*. 1999, 274(33):22903-6.

Marnett LJ, Wright TL, Crews BC, Tannenbaum SR, Morrow JD. Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2000, 275(18):13427-30.

Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E Jr, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci*. 1998, 18(1):104-11.

Masuda K, Shima H, Watanabe M, Kikuchi K. MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J Biol Chem*. 2001, 276(42):39002-11.

Matsui T, Svensson CI, Hirata Y, Mizobata K, Hua XY, Yaksh TL. Release of prostaglandin E2 and nitric oxide from spinal microglia is dependent on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Anesth Analg*. 2010, 111(2):554-560.

Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001, 107(3):247-54.

- Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: Helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 1996, 19(8):331–338.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol.* 1993, 151(4):2132–41.
- Meyer-Luehmann M, Prinz M. Myeloid Cells in Alzheimer's Disease: Culprits, Victims or Innocent Bystanders? *Trends Neurosci.* 2015, 38(10):659–68.
- Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain.* 2015, 138(Pt 5):1138–59.
- Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000, 61(1):45–60.
- Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia.* 2004, 48(3):197–206.
- Minghetti L, Levi G. Induction of prostanoid biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoproterenol in rat microglial cultures. *J Neurochem.* 1995, 65(6):2690–8.
- Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004, 63(9):901–910.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* 2001, 101(3):249–55.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 1994, 165(1–2):208–210.
- Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Rev.* 2005, 57(2):217–252.
- Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 2011, 21(1):103–115.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci.* 2001, 21(19):7551–7560.
- Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B. Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem.* 2013, 105:40–53.

- Moss DW, Bates TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci*. 2001, 13(3):529–538.
- Müller-Krebs S, Nissle K, Tsobaneli J, Zeier M, Kihm LP, Kender Z, Fleming T, Nawroth PP, Reiser J, Schwenger V. Effect of benfotiamine in podocyte damage induced by peritoneal dialysis fluid. *Front Med*. 2015, 2:10.
- Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2011, 286(52):44557-68.
- Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia*. 2000, 29(1):1–13.
- Nakagawa Y, Chiba K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2015, 154:21-35.
- Navikas V, Matusevicius D, Söderström M, Fredrikson S, Kivisäkk P, Ljungdahl A, Höjeberg B, Link H. Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1996, 64(1):63-9.
- Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2014, 20(17):2815–37.
- Netzel M, Ziemis M, Jung KH, Noll E, Borsch C, Bitsch I. Effect of high-dosed thiamine hydrochloride and S-benzoyl-thiamine-O-monophosphate on thiamine-status after chronic ethanol administration. *Biofactors*. 2000, 11(1-2):111-3.
- Neumann H, Wekerle H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat Neurosci*. 2013, 16(3):253-5.
- Nguyen VT, Benveniste EN. Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem*. 2002, 277(16):13796-803.
- Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1998, 28(8):2537-48.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005, 308(5726):1314-8.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*. 1997, 17(8):2746-55.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative

- damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001, 60(8):759-67.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997, 20(6):252–258.
- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011, 12(8):695–708.
- Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1999, 101(2):188-96.
- Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014, 2014:861231.
- Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. MAPKs ERK and p38, but not JNK phosphorylation, modulate IL-6 and TNF-α secretion following OK-432 in vitro stimulation of purified human monocytes. *Scand J Immunol.* 2011, 74(2):114-25.
- Ono S, Hu J, Shimizu N, Imai T, Nakagawa H. Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2001, 187(1–2):27–34.
- Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, Macias-Islas MA, Torres-Sánchez ED. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol.* 2013, 2013:708659.
- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci.* 1995, 15(2):1285-97.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2005, 57(2):168-75.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999, 401(6748):82-5.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007, 87(1):315-424.
- Padberg F, Feneberg W, Schmidt S, Schwarz MJ, Körschenhausen D, Greenberg BD, Nolde T, Müller N, Trapmann H, König N, Möller HJ, Hampel H. CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1999, 99(2):218-23.

Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic Biol Med*. 1998, 24(1):39-48.

Palumbo S, Bosetti F. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013, 89(5):273-8.

Pan X, Gong N, Zhao J, Yu Z, Gu F, Chen J, Sun X, Zhao L, Yu M, Xu Z, Dong W, Qin Y, Fei G, Zhong C, Xu TL. Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. *Brain*. 2010, 133(Pt 5):1342-51.

Park J, Choi H, Min JS, Park SJ, Kim JH, Park HJ, Kim B, Chae JI, Yim M, Lee DS. Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *J Neurochem*. 2013, 127(2):221-32.

Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal*. 2010, 22(7):977-83.

Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med*. 1997, 75(3):174-86.

Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*. 1998, 87(2):319-24.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*. 2010, 23(2):75-93.

Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology*. 2006, 66(11):1638-43.

Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Neurosci Res*. 2004, 77(4):540-51.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001, 22(2):153-83.

Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE2 biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol*. 1999, 65(6):792-799.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007, 8(1):49-62.

Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev*. 2006, 52(2):201-243.

- Plata-Salamán CR. Cytokines and feeding. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001, 25(S5):S48-52.
- Pollari E, Goldsteins G, Bart G, Koistinaho J, Giniatullin R. The role of oxidative stress in degeneration of the neuromuscular junction in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014, 8:131.
- Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015, 302:2–22.
- Pyo H, Jou I, Jung S, Hong S, Joe EH. Mitogen-activated protein kinases activated by lipopolysaccharide and beta-amyloid in cultured rat microglia. *Neuroreport*. 1998, 30;9(5):871-4.
- Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Zhao X, Benveniste EN. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*. 2005, 106(9):3114-22.
- Qin H, Wilson CA, Roberts KL, Baker BJ, Zhao X, Benveniste EN. IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced CD40 gene expression through induction of suppressor of cytokine signaling-3. *J Immunol*. 2006, 177(11):7761-71.
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*. 2004, 279(2):1415-21.
- Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, Bigio EH, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI. Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci*. 2006, 26(42):10636-45.
- Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol*. 1997, 158(7):3165-73.
- Rojo AI, McBean G, Cindric M, Egea J, López MG, Rada P, Zarkovic N, Cuadrado A. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Antioxid Redox Signal*. 2014, 21(12):1766–1801.
- Rojo AI, Salinas M, Martín D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci*. 2004, 24(33):7324-34.
- Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol*. 2004, 149(1-2):40-9.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993, 362(6415):59-62.

- Rosslenbroich V, Dai L, Baader SL, Noegel AA, Gieselmann V, Kappler J. Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Exp Cell Res*. 2005, 310(2):434-44.
- Ryu J, Pyo H, Jou I, Joe E. Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2000, 275(39):29955–29959.
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010, 21(5):331–344.
- Saha R, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Brain Behav Immun*. 2006, 49(2):154–163.
- Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia*. 2013, 61(1):104-11.
- Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2011, 11(11):775-87.
- Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Settle SL, Currie MG, Needleman P. Nitric Oxide Activates the Cyclooxygenase Pathway in Inflammation. *Am J Ther*. 1995, 2(9):616-619.
- Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, Vidal-Cantú GC, Medina-Santillán R, Reyes-García G, Granados-Soto V. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006, 530(1-2):48-53.
- Sanz E, Hofer MJ, Unzeta M, Campbell IL. Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain. *Glia*. 2008, 56(2):190-9.
- Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, Dragone T, Iacobazzi F, Panaro MA. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012, 34(5):858-65.
- Saporito MS, Thomas BA, Scott RW. MPTP activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem*. 2000, 75(3):1200–1208.
- Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010, 10(3):170–181.
- Savic D, Stojiljkovic M, Lavrnja I, Parabucki A, Bjelobaba I, Nedeljkovic N, Herdegen T, Pekovic S. Ribavirin shows immunomodulatory effects on activated microglia. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014, 36(6):433-41.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*. 1989, 491(2):394-7.

- Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem.* 1999, 72(4):1466-71.
- Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008, 24(5):371-7.
- Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med.* 1999, 5(5):554-9.
- Schreiber J, Jenner RG, Murray HL, Gerber GK, Gifford DK, Young RA. Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(15):5899–5904.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000, 267(16):4904-11.
- Schupp N, Dette EM, Schmid U, Bahner U, Winkler M, Heidland A, Stopper H. Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008, 378(3):283-91.
- Sekizawa T, Openshaw H, Ohbo K, Sugamura K, Itoyama Y, Niland JC. Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J Neurol Sci.* 1998, 154(2):194–9.
- Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 1988, 23(4):339-46.
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986, 46(5):705–716.
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012, 48(2):158–166.
- Shafer LL, McNulty JA, Young MR. Brain activation of monocyte-lineage cells: involvement of interleukin-6. *Neuroimmunomodulation.* 2002-2003, 10(5):295-304.
- Shi X, Zheng Z, Li J, Xiao Z, Qi W, Zhang A, Wu Q, Fang Y. Curcumin inhibits A $\beta$ -induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neurosci Lett.* 2015, 594:105–110.
- Shoeb M, Ramana KV. Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2012, 52(1):182-90.



- Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem*. 1991, 266(36):24398-403.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*. 2007, 55(4):412-24.
- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Rubio F, Szczudlik A, Gaffney J. Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke. *Neuroreport*. 2000, 11(12):2759-64.
- Sloane E, Ledeboer A, Seibert W, Coats B, van Strien M, Maier SF, Johnson KW, Chavez R, Watkins LR, Leinwand L, Milligan ED, Van Dam AM. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. *Brain Behav Immun*. 2009, 23(1):92-100.
- Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*. 2012, 87(1):10–20.
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol*. 1999, 9(1):69-92.
- Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev*. 2011, 67(1–2):157–183.
- Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012, 9:115.
- Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, Kleesiek K, Mueller-Roesel M, Koschinsky T, Uribarri J, Vlassara H, Tschöepe D. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006, 29(9):2064-71.
- Storz P, Döppler H, Toker A, Do H. Protein Kinase D Mediates Mitochondrion-to-Nucleus Signaling and Detoxification from Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol Cell Biol*. 2005, 25(19):8520–8530.
- Strachan-Whaley M, Rivest S, Yong VW. Interactions Between Microglia and T Cells in Multiple Sclerosis Pathobiology. *J Interferon Cytokine Res*. 2014, 34(8): 615–622.
- Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, Mavrakis K, Bitsch I, Netzel M, Geyer J, Köpcke W, Sauerland C, Bretzel RG, Federlin KF. Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001, 109(6):330-6.

Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL. Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuroglia signaling during regeneration. *J Neurosci Res*. 2000, 61(1):10-20.

Sugaya K, Chouinard ML, McKinney M. Induction of manganese superoxide dismutase in BV-2 microglial cells. *Neuroreport*. 1997, 8(16):3547–3551.

Sugimori N, Espinoza JL, Trung LQ, Takami A, Kondo Y, An DT, Sasaki M, Wakayama T, Nakao S. Paraptosis cell death induction by the thiamine analog benfotiamine in leukemia cells. *PLoS One*. 2015, 10(4):e0120709.

Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG, Christakos S, Clair DK, Mattson MP, Scheff SW. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 1999, 19(15):6248-56.

Sun XJ, Zhao L, Zhao N, Pan XL, Fei GQ, Jin LR, Zhong CJ. Benfotiamine prevents increased  $\beta$ -amyloid production in HEK cells induced by high glucose. *Neurosci Bull*. 2012, 28(5):561-6.

Svensson C, Fernaeus SZ, Part K, Reis K, Land T. LPS-induced iNOS expression in Bv-2 cells is suppressed by an oxidative mechanism acting on the JNK pathway--a potential role for neuroprotection. *Brain Res*. 2010, 1322:1-7.

Svensson C, Part K, Künnis-Beres K, Kaldmäe M, Fernaeus SZ, Land T. Pro-survival effects of JNK and p38 MAPK pathways in LPS-induced activation of BV-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011, 406(3):488–492.

Tan J, Town T, Mullan M. CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2000, 275(47):37224–37231.

Taylor DL, Diemel LT, Pocock JM. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci*. 2003, 23(6):2150-60.

Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100(9):5473-8.

Tong C, Fan HY, Chen DY, Song XF, Schatten H, Sun QY. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res*. 2003, 13(5):375-83.

Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res*. 2007, 76(1):81-90.

- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009, 7:65–74.
- Van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*. 1996, 47(6):1531-4.
- Verma S, Reddy K, Balakumar P. The defensive effect of benfotiamine in sodium arsenite-induced experimental vascular endothelial dysfunction. *Biol Trace Elem Res*. 2010, 137(1):96-109.
- Villacara A, Kumami K, Yamamoto T, Mrsulja BB, Spatz M. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible in vitro lipid peroxidation. *J Neurochem*. 1989, 53(2):595-601.
- Vladić A, Horvat G, Vukadin S, Sucić Z, Simaga S. Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R gp80) in multiple sclerosis patients. *Cytokine*. 2002, 20(2):86-9.
- Volvvert ML, Seyen S, Piette M, Evrard B, Gangolf M, Plumier JC, Bettendorff L. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol*. 2008, 8:10.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 2004, 50:235–246.
- Waetzig V, Herdegen T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett*. 2004, 361:64–67.
- Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci*. 2013, 36(4):209-17.
- Wang D, Hazell AS. Microglial activation is a major contributor to neurologic dysfunction in thiamine deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 402(1):123-8.
- Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol*. 2002, 2(11):1509-20.
- Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF-κB and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation*. 2011, 8:95.

Watters JJ, Sommer JA, Pfeiffer ZA, Prabhu U, Guerra AN, Bertics PJ. A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. *J Biol Chem.* 2002, 277(11):9077-87.

Weitz TM, Town T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis.* 2012, 2012:314185.

Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science.* 2002, 296(5577):2345-7.

Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2006, 3:30.

Winkler G, Pál B, Nagybégyani E, Ory I, Porochnavec M, Kempler P. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung.* 1999, 49(3):220-4.

Wu DC, Ré DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(32):12132-7.

Wu S, Ren J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci Lett.* 2006, 394(2):158-62.

Wüllner U1, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 1999, 826(1):53-62.

Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron.* 2002, 35(3):419-32.

Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV. Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2010, 48(10):1423-34.

Yadav UC, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, 50(5):2276-82.

Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor- interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem.* 1995, 270(52):31315-31320.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature.* 1997, 389(6653):865-70.

- Yang NC, Ho WM, Chen YH, Hu ML. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Anal Biochem.* 2002, 306(2):323-7.
- Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology.* 2001, 57(6):952-6.
- Yoshino Y, Yamamoto S, Kohsaka S, Oshiro S, Nakajima K. Superoxide anion contributes to the induction of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) through activation of the MKK3/6-p38 MAPK cascade in rat microglia. *Brain Res.* 2011, 1422:1-12.
- Yu DK, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim NG, Choi JS, Kim HR. Phlorofuocufuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor  $\kappa$ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells. *Int Immunopharmacol.* 2015, 28(2):1068-75.
- Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015, 9:322.
- Zhong LM, Zong Y, Sun L, Guo JZ, Zhang W, He Y, Song R, Wang WM, Xiao CJ, Lu D. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells. *PLoS One.* 2012, 7(2):e32195.
- Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1995, 270(21):12665-9.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001, 31(11):1405–1416.
- Zierler S, Frei E, Grissmer S, Kerschbaum HH. Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2008, 21(1-3):55-62.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Iva Božić je rođena 21.06.1985. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2004. godine, a završila 2010. godine na studijskoj grupi Biohemija sa opštim uspehom 9,03 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije upisala je 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijske grupe Biologija i modula Eksperimentalna neurobiologija od gena do ponašanja. Od 2011. do 2012. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a od 2012. godine je zaposlena na Odeljenju za Neurobiologiju, u Laboratoriji za neurohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Naučno-istraživački rad Ive Božić realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2011. godine učesnik je projekta „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014, rukovodilac prof dr Mirjana Stojiljković). U okviru ovog projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske disertacije pod mentorstvom dr Irene Lavrnje i prof dr Nadežde Nedeljković. Dobila je studentsku stipendiju od strane DAAD i na osnovu toga učila i usavršavala se na Institutu za biologiju, Fakulteta bioloških nauka, farmacije i psihologije, Univerziteta u Lajpcigu, u laboratoriji prof Rudolfa Rubzarena, u Lajpcigu, Nemačka. Takođe, učestvovala je u realizaciji dva bilateralna DAAD projekta sa Nemačkom (Academic Synapsing in the Balkans, 2013-2014 i Academic Reconstruction of South Eastern Europe, 2014-2015).

Od 2013. godine je saradnik Istraživačke stanice Petnica i aktivni učesnik manifestacija koje se bave popularizacijom nauke.

Autor je 3 i koautor 3 rada u međunarodnim vodećim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih saopštenja.