

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Milica N. Lazarević

**Uticaj donora vodonik-sulfida, morfolin-4-ium-
4-metoksifenil (morfolino)-fosfodionata, na
karakteristike imunskih ćelija uključenih u
patogenezu eksperimentalnog autoimunskog
encefalomijelitisa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milica N. Lazarević

Effects of hydrogen-sulfide donor, morpholin-4-ium 4-methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate, on immune cells involved in experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI:

dr Miljana Momčilović, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Đorđe Miljković, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Laketa, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Željka Stanojević, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Ćelijski i molekularni mehanizmi oporavka pacova od eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa” (173035) i projekata 451-03-68/2020-14/200007 i 451-03-9/2021-14/200007, finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se

dr Miljani Momčilović, svom mentoru, na pomoći i zalaganju tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala na uloženom vremenu i trudu, uvek prijateljskoj atmosferi i svim savetima kojima me je uvela u svet nauke.

dr Đorđu Miljkoviću, na prilici da radim i da se usavršavam u oblasti imunologije, kao i na ukazanom poverenju i prenetom znanju i iskustvu. Hvala na velikoj pomoći, strpljenju i razumevanju prilikom izrade ove doktorske disertacije.

dr Biljani Božić Nedeljković, na posvećenosti, zalaganju i konstruktivnim idejama i sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove doktorske disertacije.

dr Danijeli Laketi, na ukazanom vremenu, stručnim i konstruktivnim savetima koji su unapredili ovu disertaciju.

dr Željki Stanojević na ažurnosti, trudu i konstruktivnim sugestijama koje su unapredile ovu disertaciju.

Nedi, Suzi, Bokiju i Goranu na ogromnoj pomoći u eksperimentalnom radu, savetima i divnoj prijateljskoj atmosferi.

Dragici i Ivanu na savetima, smehu i drugarstvu.

Mojim dragim kolegama Ivani, Tamari, Miri, Nataliji, Milici Vujičić, Nadi i prof. Mariji Mostarici-Stojković na pomoći, sugestijama i druženju.

Svim članovima laboratorije 66 na kolegijalnosti, saradnji i druženju.

Svojim prijateljima i porodici na razumevanju i podršci.

Posebnu zahvalnost dugujem Anici i Sandri zbog ljubavi, podrške i prijateljstva, kojima su ulepšale proteklo vreme.

Uticaj donora vodonik-sulfida, morfolin-4-ium-4-metoksifenil (morfolino)-fosfoditionata, na karakteristike imunskih ćelija uključenih u patogenezu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Sažetak

Multipla skleroza (MS) je hronična, inflamacijska, demijelinizujuća, neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema. U cilju boljeg razumevanja faktora koji utiču na patogenezu MS-e, kao i definisanja novih potencijalnih terapeutika, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivan efekat sporooslobađajućeg donora vodonik-sulfida, GYY4137, na imunske ćelije uključene u patogenezu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE), najčešće korišćenog životinjskog modela MS-e. GYY4137 je ostvario jasan antiinflamacijski efekat na BV2 ćelije (ćelijska linija mikroglije), dok je njegov efekat na dendritske ćelije (DĆ) diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa bio ograničen. Takođe, GYY4137 nije uticao na procentualnu zastupljenost Th1 i Th17 limfocita, glavnih patogenih populacija T limfocita u patogenezi EAE-a, unutar populacije ćelija poplitealnih limfnih čvorova (PLČ) imunizovanih C57BL/6 miševa i/ili DA pacova, ali je doveo do smanjenja zastupljenosti Th17 limfocita unutar populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova. S druge strane, ovo jedinjenje je dovelo do smanjenja zastupljenosti regulatornih T limfocita (Treg) unutar populacije ćelija PLČ, ali nije uticalo na njihovu zastupljenost unutar populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine. Mehanizam kojim je GYY4137 ostvario efekat na zastupljenost Treg unutar populacije ćelija PLČ je obuhvatao smanjenje ekspresije transkripcionog faktora FoxP3, koje je najverovatnije bilo posredovano stimulacijom njegove proteazomalne degradacije. Pored toga, ovo jedinjenje je dovelo do povećanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika u BV2 ćelijama i CD4⁺ T limfocitima izolovanim iz PLČ imunizovanih miševa. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da GYY4137 ostvaruje imunomodulacijski efekat na imunske ćelije uključene u patogenezu EAE-a, pri čemu priroda i intenzitet ovog efekta zavise od ćelijske populacije na koju se dejstvo ostvaruje, kao i od miljea iz kojeg ćelije potiču. Takođe, ovi rezultati ukazuju na to da GYY4137 poseduje značajan antiencefalitogeni potencijal.

Ključne reči: eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, multipla skleroza, vodonik-sulfid, GYY4137, T limfociti, mikroglija, dendritske ćelije

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

Effects of hydrogen-sulfide donor, morpholin-4-ium 4-methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate, on immune cells involved in experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, demyelinating, neurodegenerative disease of the central nervous system. The aim of this doctoral dissertation has been to improve knowledge about factors that influence MS pathogenesis and to define new potential MS therapeutics by examination of the effects of slow-releasing hydrogen-sulfide donor, GYY4137, on immune cells involved in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), commonly used MS animal model. Immunomodulatory effect of *in vitro* treatment with GYY4137 was investigated on BV2 cells (microglial cell line) and dendritic cells (DC) differentiated from bone marrow precursors of C57BL/6 mice. GYY4137 exerted potent anti-inflammatory effects on BV2 cells, while its effects on DC were limited. Further, GYY4137 effect on the percentage of different T cell subpopulations among cells isolated from popliteal lymph nodes (PLN) or spinal cords of immunized C57BL/6 mice and/or DA rats was evaluated. The results showed that, despite having no effect on the percentage of two major pathogenic T helper (Th) cell populations in EAE (Th1 and Th17 cells) among cells from PLN, GYY4137 reduced the percentage of Th17 among immune cells isolated from spinal cords of immunized rats. In contrast to the effect on the percentage of Th17 cells, GYY4137 reduced the percentage of regulatory T cells (Treg) among PLN cells, but not among immune cells obtained from spinal cords of immunized rats. GYY4137 accomplished its effect on the Treg percentage by reducing the relative protein expression of FoxP3, which was probably mediated by stimulation of its proteasomal degradation. Furthermore, GYY4137 potentiated reactive oxygen species generation in BV2 cells and CD4⁺ T cells isolated from PLN of immunized mice. The results of this doctoral thesis indicate that GYY4137 exerts immunomodulatory effects on immune cells involved in EAE pathogenesis, while the nature and intensity of these effects depend on the cell type and the milieu of cellular origin. Also, these results suggest that GYY4137 has a significant anti-encephalitogenic potential.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, hydrogen-sulfide, GYY4137, T cells, microglia, dendritic cells

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunobiology

Lista skraćenica:

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

Arg-1 - arginaza-1

BAFF – faktor koji aktivira B ćelije (*engl.* B-cell activating factor)

BSA – goveđi albumin iz seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin)

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CBS - Cistationin β -sintaza

CD – *engl.* Cluster of Differentiation

CFA - kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's adjuvant)

CNS – centralni nervni sistem

CSE - cistationin γ -liaza

CTLA-4 – antigen koji je udružen sa citotoksičnim T limfocitima (*engl.* Cytotoxic T Lymphocyteassociated Antigen-4)

Ctrl – kontrola

DA - Dark Agouti

DCFDA – dihlorofluorescein diacetat

DĆ- dendritske ćelije

DHR – dihidrorodamin

d.p.i. – dan posle imunizacije

EAE –eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EBV - Epštajn-Barov virus

EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

ELISA – *engl.* Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ERK – kinaza regulisana ekstracelularnim signalima (*engl.* Extracellular signal-regulated kinase)

FCS – serum fetusa govečeta (*engl.* Fetal Calf Serum)

FoxP3 – *engl.* Forkhead box P3

GA - glatiramer-acetat

GM-CSF – *engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HKM – homogenat kičmene moždine

GY4137 - morfolin-4-ium-4-metoksifenil(morfolino)-fosfoditionat

HLA - humani leukocitni antigen

H₂S - Vodoni-k-sulfid

IDO - indolamin-dioksigenaza

IFN – interferon

IL – interleukin

LPS – lipopolisaharid

MAPK - mitogenom-aktivirana protein kinaza

MBP – bazni protein mijelina (*engl.* Myelin Basic Protein)

mfi – *engl.* mean fluorescence intensity

MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* Major Histocompatibility Complex)

MMP – matriksna metaloproteinaza

MOG – mijelin oligodendrocitni glikoprotein (*engl.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

MS – multipla skleroza

mTOR – mehanistička meta rapamicina (*engl.* mechanistic Target Of Rapamycin)

Myd88 – myeloid differentiation primary response 88

NaHS - natrijum-hidrogensulfid

NF-κB – nuklearni faktor κB

NLR - receptori slični NOD-u (*engl.* NOD-like receptors)

NO – azot-monoksid

PBS – *engl.* Phosphate Buffered Saline

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (*engl.* Polymerase Chain Reaction)

PD-1 – protein 1 programirane ćelijske smrti (*engl.* Programmed cell Death protein 1)

PE – fikoeritrin (*engl.* Phycoerythrin)

PE-Cy5 - PE-cijanin

PerCP-Cy5.5 - peridin hlorofil protein-cijaninom 5.5 (*engl.*, Peridin chlorophyll protein-Cyanine5.5)

PGE – prostaglandin E

PMA – forbol miristat acetata (*engl.* Phorbol Miristate Acetate)

PMČK - periferne mononuklearne ćelije krvi

PLČ - poplitealni limfni čvorovi

PLP – proteolipidni protein

PT – toksin pertuzisa (*engl.* Pertussis Toxin)

ROR α – *engl.* RAR-related Orphan Receptor α

ROR γ T – *engl.* RAR-related Orphan Receptor γ T

ROS – reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive Oxygen Species)

RPMI – *engl.* Roswell Park Memorial Institute

RRMS – relapsno-remitentna multipla skleroza

S6K – S6 kinaza

SNP - jednonukleotidni polimorfizam (*engl.* Single nucleotide polymorphism)

SPMS – sekundarno progresivna multipla skleroza

STAT – *engl.* Signal Transducer and Activator of Transcription

T-bet – *engl.* T-box transcription factor TBX21

TGF- β – faktor transformacije rasta β (*engl.* Transforming Growth Factor β)

Th – pomoćnički T limfociti (*engl.* T helper cells)

TLR - receptori slični Toll-u (*engl.* Toll-like receptors)

TNF – faktor nekroze tumora (*engl.* Tumour Necrosis Factor)

TNFR – receptor za TNF (*engl.* TNF receptor)

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg – regulatorne T ćelije

VCAM-1 – *engl.* vascular cell adhesion molecule 1

Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1. Multipla skleroza.....	2
1.2. Terapija multiple skleroze	4
1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis	5
1.4. Imunske ćelije od značaja za patogenezu EAE-a i MS-e.....	6
1.4.1. Dendritske ćelije	6
1.4.2. CD4 ⁺ T limfociti	8
1.4.3. Mikroglia i makrofagi.....	10
1.5. Imunomodulacijska svojstva vodonik-sulfida.....	12
1.6. Imunomodulacijska svojstva GYY4137	14
2. Ciljevi	17
3. Materijal i metode.....	19
3.1. Reagensi i rastvori	20
3.2. Eksperimentalne životinje	21
3.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis	21
3.3.1. Imunizacija životinja	21
3.3.2. Evaluacija kliničke slike.....	21
3.4. Metode izolovanja i kultivacija ćelija	22
3.4.1. Kultivacija BV2 ćelija	22
3.4.2. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka, dobijanje i kultivacija peritonealnih makrofaga	22
3.4.3. Dobijanje dendritskih ćelija iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa	22
3.4.4. Izolovanje i kultivacija ćelija poplitealnih limfnih čvorova DA pacova i C57BL/6 miševa	23
3.4.5. Izolacija i kultivacija imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova	24
3.4.6. Prečišćavanje CD4 ⁺ T limfocita magnetnom separacijom.....	24
3.4.7. Određivanje broja ćelija	25
3.5. Metode za ispitivanje funkcije ćelija imunskog sistema	25
3.5.1. Određivanje vijabilnosti ćelija testom Kristal violet.....	25
3.5.2. Određivanje vijabilnosti ćelija testom MTT	25
3.5.3. Merenje produkcije citokina metodom ELISA	26
3.5.4. Metoda reakcije lančanog umnožavanja	27
3.5.4.1. Izolovanje ukupne RNK.....	27

3.5.4.2. Reakcija reverzne transkripcije	27
3.5.4.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	27
3.5.5. Merenje produkcije azot-monoksida	29
3.5.6. Citofluorimetrija.....	29
3.5.6.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula	29
3.5.6.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula	29
3.5.6.3. Merenje nivoa fagocitoze	30
3.5.6.4. Merenje nivoa apoptoze	30
3.5.6.5. Merenje produkcije ROS.....	31
3.5.6.6. Detekcija fluorescencije	31
3.5.7. Analiza ćelija u realnom vremenu.....	31
3.5.6. Western blot	32
3.6. Statistička obrada rezultata.....	33
4. Rezultati	34
4.1. Imunomodulacijski efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na aktivirane BV2 ćelije.....	35
4.1.1. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija.....	35
4.1.2. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na funkcionalne karakteristike aktiviranih BV2 ćelija	36
4.1.3. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na fenotipske karakteristike i fagocitozu aktiviranih BV2 ćelija	37
4.1.4. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na produkciju ROS od strane aktiviranih BV2 ćelija	39
4.1.5. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na sposobnost adhezije aktiviranih BV2 ćelija.....	42
4.1.6. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na produkciju ROS od strane peritonealnih makrofaga C57BL/6 miša i DA pacova	43
4.2. Imunomodulacijski efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na dendritske ćelije diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša	44
4.2.1. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na vijabilnost dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša	44
4.2.2. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na fenotipske karakteristike i fagocitozu dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša	44
4.2.3. Efekat <i>in vitro</i> primene GYY4137 na funkcionalne karakteristike dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša	45
4.3. Imunomodulacijski efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na ćelije poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa i DA pacova.....	47

4.3.1. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa	47
4.3.2. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na Th1 i Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	48
4.3.3. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	50
4.3.4. Kinetika uticaja <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	53
4.3.5. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na produkciju ROS od strane CD4 ⁺ T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa	54
4.3.6. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova	56
4.3.7. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova.....	57
4.3.8. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova.....	58
4.4. Mehanizmi kojima GYY4137 ostvaruje svoj efekat na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa	59
4.4.1. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na apoptozu regulatornih T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	59
4.4.2. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na ferroptozu regulatornih T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	60
4.4.3. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na ekspresiju transkripcionog faktora FoxP3 u CD4 ⁺ T limfocitima poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa	62
4.4.4. Značaj proteazomalne degradacije za efekat koji GYY4137 ostvaruje na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa.....	63
4.4.5. Interakcija GYY4137 sa signalnim putevima u kojima učestvuju kinaze mTOR, ERK i Akt .	64
4.4.6. Efekat GYY4137 na aktivaciju kinaza Akt i S6 u CD4 ⁺ T limfocitima poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih miševa.....	66
4.5. Imunomodulacijski efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a	67
4.5.1. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na regulatorne T limfocite izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	67
4.5.2. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na Th17 limfocite izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	68

4.5.3. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na regulatorne T limfocite i Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova DA pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA	69
4.5.4. Efekat <i>ex vivo</i> primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a.....	71
5. Diskusija.....	72
6. Zaključci.....	84
7. Literatura	87

1. Uvod

1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je hronična, inflamacijska, demijelinizujuća, neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS), koja predstavlja najčešći uzrok netraumatskih oštećenja koja dovode do invaliditeta kod mladih ljudi (Kamm i sar., 2000). Ova bolest najčešće pogađa osobe starosti između 20 i 40 godina, pri čemu se češće javlja kod žena. Odnos učestalosti kod žena i muškaraca u zavisnosti od geografskog podneblja i pripadnosti specifičnoj etničkoj grupi varira između 1,5:1 i 2,5:1 (Koch-Henriksen i Sørensen, 2010). Takođe, bolest se kod žena javlja u proseku 2-5 godina ranije nego kod muškaraca (Confavreux i sar., 2006). Životni vek osoba obolelih od MS-e je 7-10 godina kraći od životnog veka opšte populacije, a mortalitet obolelih osoba je povećan tri puta u odnosu na mortalitet u opštoj populaciji (Grytten i sar., 2008). Trenutno u svetu od MS-e boluje oko 2,5 miliona ljudi, pri čemu se prevalenca ove bolesti u zavisnosti od posmatrane geografske regije kreće između 50 i 300 na 100 000 ljudi (Pugliatti i sar., 2002). Prevalenca MS-e varira u zavisnosti od geografskog podneblja: ova bolest se sa većom učestalošću javlja u severnoj Evropi, SAD, Kanadi, Novom Zelandu i južnoj Australiji, dok se znatno ređe javlja u Aziji, tropskim i subtropskim oblastima Afrike i Okeanije (Kurtzke, 1995). Ovakva nehomogena geografska distribucija MS-e može se objasniti higijenskom hipotezom, po kojoj su poboljšani sanitarni uslovi i smanjen broj infekcija tokom detinjstva u ekonomski razvijenijim zemljama povezani sa povećanom učestalošću autoimunskih bolesti i alergija (Conradi i sar., 2011). MS je bolest kompleksne etiologije i patogeneze i karakteriše se heterogenom ekspresijom simptoma i patoloških karakteristika. Iako se o njoj govori kao o jedinstvenom entitetu, u cilju razvijanja adekvatne terapije je neophodno razumeti specifičnosti patogeneze svakog podtipa MS-e i precizno definisati faktore rizika za razvoj ove bolesti (Kamm i sar., 2000).

Klinički tok MS-e se karakteriše relapsima i/ili progresijom bolesti. Relapsi podrazumevaju pojavu novih neuroloških simptoma kod obolelih od MS-e, koji se javljaju u odsustvu groznice i infekcije i traju najmanje 24 h. Relapsi se najčešće klinički manifestuju kao optički neuritis, senzorni deficit ili cerebrealna disfunkcija. Razvijaju se tokom nekoliko sati ili dana i dostižu plato koji najčešće traje nekoliko nedelja. Klinički oporavak od relapsa se često može činiti potpunim u ranim fazama bolesti, ali relapsi za sobom gotovo uvek ostavljaju oštećenje nervnog tkiva. Kako bolest napreduje, dolazi do akumulacije oštećenja i klinički oporavak od relapsa postaje nekompletan. Pod progresijom bolesti se podrazumeva konstantno pogoršanje simptoma (obično spinalnih simptoma kao što su ataksija, pareza i spastičnost) kod obolelih od MS-e u trajanju od najmanje šest meseci (Confavreux i sar., 2006).

Na osnovu kliničkog toka bolesti može se razlikovati nekoliko tipova MS-e. Relapsno-remitentni oblik (RRMS-e), koji se karakteriše smenom relapsa i remisije bolesti, razvija oko 85% obolelih. Ova forma MS-e kod 75% pacijanata prelazi u sekundarno progresivnu MS (SPMS), čiji klinički tok podrazumeva konstantno pogoršanje simptoma (Confavreux i sar., 2006). Primarno progresivna MS (PPMS) je progresivna od samog početka i javlja se kod 15% obolelih. Ovaj oblik se u proseku razvija oko 40 godine života, pri čemu oko 40% ovakvih pacijenata razvije bolest sa učestalim relapsima (progresivno-relapsna MS) (Lublin i Reingold, 1996).

Kada se govori o patogenezi MS-e, ona se uobičajeno smatra bolešću koja se dešava u dve faze. Prva faza je inflamacijska faza u kojoj rani inflamacijski procesi dovode do relapsno-remitentnog toka bolesti, dok druga faza podrazumeva neurodegeneraciju, koja je uzrok progresije bolesti u SPMS-u (Leray i sar., 2010). Ovakav sled događaja u patogenezi MS-e započinje aktivacijom T ćelija specifičnih za antigene CNS-a u sekundarnim limfnim organima, njihovom migracijom u CNS i reaktivacijom od strane lokalnih antigen-prezentujućih ćelija (APC). Reaktivirani T limfociti sekrecijom citokina omogućavaju regrutaciju i aktivaciju drugih ćelija imunskog sistema i astrocita, dovodeći do demijelinizacije, a kasnije i do oštećenja aksona i posledične neurodegeneracije (Lassman

i sar., 2007). Ovakvi inflamacijski i neurodegenerativni procesi u CNS-u se histološki manifestuju kao plake (perivenularne inflamacijske lezije, sklere), koje predstavljaju glavno histopatološko obeležje MS-e. Plake se karakterišu primarnom demijelinizacijom sa varijabilnim stepenom inflamacije i gubitka aksona i najčešće zahvataju belu masu mozga, kičmenu moždinu i optičke nerve (Popescu i Lucchinetti, 2012).

Iako etiologija MS-e do danas nije razjašnjena, poznati su brojni genetički i sredinski faktori za koje se smatra da doprinose gubitku autotolerance na antigene CNS-a. Precizan doprinos pojedinačnih faktora nije poznat, ali se pretpostavlja da različiti sredinski faktori i slučajni događaji utiču na penetrabilnost bolesti kod genetički predisponiranih pojedinaca (Dendrou i sar., 2015).

Jedan od sredinskih faktora za koji se uočava jasna i izražena pravilnost u povezanosti sa rizikom od MS-e je izloženost UV zracima. Naime, rizik od razvoja MS-e je u obrnutoj korelaciji sa stepenom izlaganja UV zracima, što je u skladu sa podatkom da se sa povećanjem geografske širine (i ujedno opadanjem UV zračenja) povećava prevalenca MS-e (Pierrot-Deseilligny i Souberbielle, 2017). U osnovi ove korelacije je neophodnost UV zraka za sintezu vitamina D u koži, za koji je pokazano da ostvaruje imunomodulacijske efekte kroz uticaj na dendritske ćelije, kao i na produkciju IL-17 i indukciju regulatornih T limfocita (Hayes i sar., 2015).

Pored izloženosti UV zracima, značajan sredinski faktor koji može uticati na patogenezu MS-e je konzumiranje cigareta. Konzumiranje cigareta povećava rizik od MS-e na dozno zavisani način, a takođe je u pozitivnoj korelaciji sa brzinom progresije bolesti i njenom ozbiljnošću. Veliki broj hipoteza predlaže objašnjenje za ovakav efekat konzumiranja cigareta: uticaj duvana na kardiovaskularni i imunski sistem, povećana produkcija azot-monoksida (NO), povećana frekvencija respiratornih infekcija, neurotoksični efekti cijanida i drugih komponenti duvanskog dima (Wingerchuk 2012).

Osim konzumiranja cigareta, bitan spoljašnji faktor koji može modulirati imunski odgovor u smeru gubitka autotolerance su infekcije. Postojanje jedinstvenog infektivnog agensa kao uzročnika MS-e je malo verovatno, ali se smatra da okidač za ovu autoimunsku bolest može biti infekcija različitim patogenima kod genetički predisponiranih osoba (Ascherio i sar., 2007). Na primer, pokazano je da je infekcija Epstein-Barr virusom (EBV) povezana sa MS. Tako simptomatska infekcija ovim virusom i razvoj infektivne mononukleoze udvostručava rizik od MS-e (Handel i sar., 2010). Najčešće se kao mehanizam kojim EBV može dovesti do narušavanja autotolerance navodi aktivacija unakrsno-reaktivnih T limfocita molekularnom mimikrijom. Molekularna mimikrija podrazumeva da se autoreaktivni T limfociti specifični za proteine CNS-a aktiviraju virusnim antigenima, usled sličnosti antigena virusa i antigena CNS-a. Nasuprot hipotezi molekularne mimikrije, neke od hipoteza pretpostavljaju da EBV indukuje MS-u direktnom infekcijom CNS-a, s obzirom na to da su neka novija istraživanja pokazala postojanje aktivnosti ovog virusa u MS plakama (Serafini i sar., 2007). Ova hipoteza pripada grupi hipoteza koje smatraju da se inicijalni događaji koji indukuju MS-u ne dešavaju na periferiji, već u samom CNS-u. Osim infekcija, uticaj na različite parametre bolesti mogu imati komensalni mikroorganizmi creva (Freedman i sar., 2018).

Kada se razmatraju genetički faktori koji su predisponirajući za MS-u, treba imati u vidu da se MS ne smatra naslednom bolešću. Genetička osnova MS-e se ogleda u tome što rizik od razvijanja ove bolesti među rođacima prvog stepena u proseku iznosi 2,77%, dok je u opštoj populaciji taj rizik 0,3% (Robertson i sar., 1996). Takođe, genetička osnova ove bolesti se ogleda i u tome što postoji 24-30% verovatnoće da će jedan monozigotni bliznac razviti bolest ukoliko je drugi već ima (Hansen i sar., 2005). Do danas je preko sto genskih lokusa povezano sa predispozicijom za MS-u, a genski lokus sa najsnažnijom povezanošću je lokus humanih leukocitnih antigena (HLA). Varijacije u ovom lokusu

mogu biti pozitivno ili negativno povezane sa rizikom za razvoj bolesti ili njenim tokom (Gourraud i sar., 2012). Najsnažniju pozitivnu korelaciju sa rizikom od MS-e ima alel HLA-DRB1*15, dok alel HLA-A*02:01 ima protektivni efekat (Hollenbach i sar., 2015). Pored toga, postoji preko 150 jednonukleotidnih polimorfizama (*engl.* Single nucleotide polymorphism, SNP), koji se dovode u vezu sa predispozicijom za MS-u. Veliki broj ovih SNP-ova nalazi se u blizini gena bitnih za funkcionisanje imunskog sistema (IL-7R, IL-25RA, TNFR1, BAFF, CYP2R1), i to najčešće u njihovim regulatornim regionima (Dobson i Giovannoni, 2018).

1.2. Terapija multiple skleroze

MS i dalje predstavlja neizlečivu bolest, ali je do danas razvijen znatan broj terapijskih pristupa koji se mogu podeliti u tri grupe: terapija relapsa, lekovi koji modifikuju bolest i simptomatska terapija (Kamm i sar., 2000).

Terapija relapsa uglavnom podrazumeva intravensku primenu metilprednizona u trajanju od tri do pet dana, pri čemu u slučaju perzistentnih ozbiljnih simptoma relapsa može biti primenjen sekundarni ciklus terapije sa povećanim dozama (Lattanzi i sar., 2017). Plazmafereza se koristi za terapiju relapsa ukoliko i drugi ciklus terapije metilprednizonom ne ostvari zadovoljavajući efekat (Cortese i sar., 2011).

U tretmane koji modifikuju bolest spada preko deset lekova koji su odobreni od strane Agencije za hranu i lekove SAD-a (*engl.* Food and Drug Administration, FDA), a čija primena zavisi od kliničkog toka, stadijuma bolesti i njene aktivnosti. Lekovi koji modifikuju bolest, koji su među prvima odobreni za tretman RRMS-e bili su IFN- β 1 (smanjuje zastupljenost Th17 i produkciju IL-17) i glatiramer-acetat (sprečava aktivaciju encefalitogenih T limfocita blokiranjem MHC molekula) (O'Connor i sar., 2011). S obzirom na to da se IFN- β 1 i glatiramer-acetat primenjuju intramuskularno ili subkutano, naredni napredak u razvoju terapije RRMS-e bili su lekovi koji se primenjuju oralno, kao što su: fingolimod (vezivanjem za sfingozin-1-fosfat receptor sprečava B i T limfocite da napuste limfne čvorove), teriflunomid (redukuje aktivnost mitohondrijskog enzima dihidrorotat dehidrogenaze, a samim tim i proliferaciju T i B limfocita), dimetil-fumarat (ostvaruje antiinflamacijsko, antioksidativno i neuroprotektivno dejstvo), mitoksantron (inhibira sintezu DNK i suprimira T, B limfocite i makrofage) (Gold i sar., 2012; Kappos i sar., 2010; Dargahi i sar. 2017). Najnovijoj generaciji lekova koji modifikuju bolest pripadaju humanizovana monoklonska antitela: natalizumab (antitelo na adhezivni molekul α 4-integrin, koje blokira transendotelnu migraciju limfocita u CNS), okrelizumab (antitelo na CD20 koje dovodi do deplecije B limfocita), alemtuzumab (antitelo na CD52 koje dovodi do dugotrajne deplecije T i B limfocita), daklizumab (antitelo na IL-2R koje sprečava aktivaciju T limfocita) (Polman i sar., 2006; Cohen i sar., 2012; Dargahi i sar. 2017).

Simptomatska terapija ima za cilj da poveća kvalitet života obolelih od MS-e. Osobe obolele od MS-e pate od brojnih neuroloških posledica koje uključuju nesvesticu, depresiju, spastičnost, tremor, ataksiju, napade, bol, poremećaj sna, urogenitalne i crevne poremećaje, seksualnu disfunkciju, koji se tretiraju različitim lekovima ili fizikalnom terapijom (de Sa i sar., 2011).

Iako MS predstavlja neizlečivu bolest, u poslednjih 20 godina je napravljen veliki pomak u razvoju njene terapije, koja, kao što je prethodno navedeno, uključuje primenu imunomodulacijskih lekova koji mogu usporiti njenu progresiju (Dargahi i sar. 2017). Razvoj ovih terapeutika omogućen je zahvaljujući napretku u razumevanju patogeneze MS-e, koji je velikim delom proizašao iz podataka dobijenih na životinjskim modelima bolesti, a pre svega na eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

(EAE) (Friese i sar., 2006). Ipak, terapije koje se danas primenjuju su često povezane sa različitim neželjenim efektima i nisu uvek efikasne u modulaciji bolesti, a naročito u tretmanu njenih progresivnih formi. Zbog toga je neophodan dalji razvoj terapija za MS-u, koji je dodatno stimulisan obimom individualnih i socioekonomskih posledica ove bolesti, naročito kada se ima u vidu da se njena učestalost u mnogim zemljama povećava. U ispunjavanju ovog cilja takođe će veliki značaj imati životinjski modeli (Lassman i Bradl, 2017).

1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EAE je najčešće korišćeni životinjski model MS-e, koji u mnogim aspektima verno oslikava patogenezu ove bolesti (Gold i sar., 2006). EAE je prvi put opisan pre više od 80 godina, i danas predstavlja set heterogenih modela koji se razlikuju u načinu indukcije bolesti, kliničkim i patološkim karakteristikama, kao i odgovoru na različite tretmane (Rivers i sar., 1933; Constantinescu i sar., 2011). Na osnovu toga, EAE modeli mogu biti klasifikovani u nekoliko tipova. Aktivni EAE model podrazumeva imunizaciju životinja homogenatom tkiva CNS-a, proteinima mijelina ili njihovim peptidima u prisustvu adjuvansa (Stromnes i Goverman, 2006a). Pasivni EAE se indukuje adoptivnim transferom mijelin-specifičnih CD4⁺ T limfocita, generisanim u životinjama donorima prethodnom aktivnom imunizacijom (Stromnes i Goverman, 2006b). Spontani transgeni EAE modeli razvijeni su transgenom prekomernom ekspresijom T i/ili B ćelijskog receptora specifičnog za antigen mijelina u odgovarajućim eksperimentalnim životinjama, što dovodi do spontane pojave neuroloških simptoma sa varijabilnom incidencom i kliničkim obrascem (Bettelli i sar., 2003; Lassman i Bradl, 2017). Pored EAE-a, u upotrebi su i modeli toksične demijelinizacije indukovane sistemskim izlaganjem kuprizonu ili fokalnom injekcijom lizolecitina ili etidijum-bromida (Blakemore, 1982; Jeffery i Blakemore, 1995; Praet i sar., 2014), kao i modeli inflamacijske demijelinizacije indukovane virusnom infekcijom (hronični demijelinizirajući encefalomijelitis indukovan Tajlerovim virusom ili mišjim virusom hepatitisa) (Lassman i Bradl, 2017).

Klinički tok aktivno indukovanog EAE-a zavisi od vrste i soja eksperimentalne životinje, kao i od antigena korišćenog za imunizaciju, a klinička manifestacija bolesti podrazumeva klasične simptome kao što su pareza ili paraliza, koje počinju od repa, a zatim se šire na zadnje i prednje udove, ili atipične simptome kao što su vrtenje obolele životinje i ataksija. EAE se najčešće indukuje u miševima i pacovima, a znatno ređe zamorcima i primatima. Indukcijom EAE-a u C57BL/6 miševima peptidom MOG₃₅₋₅₅ u emulziji sa kompletnim Freundovim adjuvansom (*engl.* Complete Freund's adjuvant, CFA) razvija se hronični, progresivni tok bolesti (Lassman i Bradl, 2017). Kod ovako indukovanog EAE-a dolazi do pojave multifokalnih, konfluentnih oblasti mononuklearnih infiltrata i demijelinizacije u perifernoj beloj masi kičmene moždine (Day, 2005). S druge strane, u SJL soju miševa moguće je indukovati EAE primenom različitih antigena mijelina (uključujući PLP, MBP, različite peptide PLP, MBP, MOG i homogenatom CNS) u emulziji sa CFA. EAE koji razvijaju SJL miševi karakteriše se relapsno-remitentim tokom. EAE može biti indukovan i u drugim sojevima miševa, pri čemu PL/j i B10P razvijaju akutnu formu bolesti, dok NOD miševi nakon imunizacije peptidom MOG₃₅₋₅₅ razvijaju hroničnu formu bolesti (Dang i sar., 2015; Robinson i sar., 2014).

Pacovski model EAE-a najčešće se indukuje u Lewis i Dark Agouti (DA) pacovima. U Lewis pacovima EAE se indukuje imunizacijom MBP-om u emulziji sa CFA, što obično dovodi do jake inflamacije u CNS-u, bez ili sa jako malim stepenom demijelinizacije. Ovakva indukcija EAE-a u Lewis pacovima dovodi do akutnog oblika bolesti (Constantinescu i sar., 2011). U pacovima DA soja indukcija EAE-a singenim tkivom kičmene moždine ili rekombinantnim pacovskim MOG proteinom

dovodi do demijelinizacije i lezija u kičmenoj moždini sa perivaskularnim i subpialnim inflamacijskim infiltratima (Tanuma i sar., 2000). Imunizacijom homogenatom kičmene moždine u DA pacovima se može indukovati relapsno-remitentna forma EAE-a (Lassman i Bradl, 2017; Miljković i sar., 2015).

Ni jedan od navedenih modela ne oslikava u potpunosti sve kliničke, patološke i imunološke odlike MS-e. Zbog toga je potrebno odabrati model čije će karakteristike omogućiti najvernije izučavanje određenog aspekta ove složene bolesti: inflamaciju, demijelinizaciju, remijelinizaciju i/ili neurodegeneraciju. Najveći broj EAE modela se zasniva na inflamaciji indukovanoj autoreaktivnim CD4⁺ T limfocitima. Osnovni nedostatak ovakvih modela je u tome što oni ne pružaju pogodan milje za izučavanje uloge CD8⁺ T limfocita i B limfocita, za koje je histopatološkom analizom plaka i podacima iz kliničkih studija pokazano da imaju značajnu ulogu u propagaciji inflamacije u MS-i (Lassman i Bradl, 2017). Još jedan bitan nedostatak velikog broja EAE modela je u tome što je, za razliku od MS-e, patologija ograničena na kičmenu moždinu i u maloj meri moždano stablo i cerebelum, dok je zahvaćenost drugih regija mozga minimalna (Lassman i Bradl, 2017; Storch i sar., 2006).

Iako indukcija bolesti imunizacijom životinja ne reprodukuje nužno sve patogenetske mehanizme koji se nalaze u osnovi bolesti kod ljudi, značaj EAE-a u razumevanju MS-e je nepobitan. Korišćenjem ovog modela rasvetljeni su ćelijski i molekularni mehanizmi MS-e, a zahvaljujući tome, razvijene i testirane nove terapije za ovu bolest. Neki od visokoefikasnih terapeutika koji su razvijeni na osnovu konceptata dobijenih iz studija na EAE-u su glatiramer-acetat, natalizumab i fingolimod. Ipak, ekstrapolaciji rezultata dobijenih na EAE-u treba pristupiti s dozom opreza, imajući u vidu da određeni tretmani, koji su se pokazali efikasnim u prekliničkim studijama na EAE-u, nisu ostvarili željeni efekat nakon primene kod obolelih od MS-e. Ovakav ishod je posledica genetičkih i sredinskih razlika koje postoje između čoveka i eksperimentalnih životinja, ali ukazuje i na to da je naše razumevanje patogeneze EAE-a još uvek nepotpuno i da zahteva detaljnije izučavanje (Friese i sar., 2006).

Patogeneza aktivno indukovanog EAE-a započinje preuzimanjem antigena CNS-a od strane dendritskih ćelija (DĆ) na mestu imunizacije, koje zatim sazrevaju i migriraju u limfne čvorove koji dreniraju mesto imunizacije. Ukoliko se imunizacija životinja vrši u zadnje šape, onda su limfni čvorovi koji dreniraju mesto imunizacije poplitealni limfni čvorovi (PLČ). DĆ u PLČ prezentuju antigene naivnim mijelin-specifičnim CD4⁺ T limfocitima, dovodeći do njihove aktivacije i usmeravanja diferencijacije ka odgovarajućoj subpopulaciji. Aktivirani CD4⁺ T limfociti migriraju u CNS, gde dolazi do njihove reaktivacije od strane lokalnih APC. Reaktivirani CD4⁺ T limfociti sekretuju citokine koji stimulišu sekreciju sekundarnih citokina, hemokina i matriksnih metaloproteinaza, koji zatim posreduju u narušavanju krvno-moždane barijere i regrutaciji makrofaga i neutrofila (Kurschus 2015). Citokini i reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive Oxygen Species, ROS) produkovani od strane imunskih ćelija u CNS-u ostvaruju toksičan efekat na astrocite i oligodendrocite, a negativno deluju i na njihovu proliferaciju i diferencijaciju (Wennström i sar., 2017). B limfociti doprinose patogenezi EAE-a produkcijom mijelin-specifičnih antitela, dok CD8⁺ T limfociti sekretuju perforin, granzime i IFN- γ i direktno oštećuju oligodendrocite (Neumann i sar., 2002).

1.4. Imunske ćelije od značaja za patogenezu EAE-a i MS-e

1.4.1. Dendritske ćelije

DĆ predstavljaju ontogenetski i fenotipski heterogenu grupu profesionalnih APC-a, koje imaju jedinstvenu sposobnost da aktiviraju naivne antigen-specifične T ćelije i na taj način pokrenu imunski

odgovor (Bachereau i Steinman, 1998). Pored uloge u započinjanju imunskog odgovora, DC imaju ključnu ulogu u održavanju imunološke tolerance. Faza sazrevanja (nezrele ili zrele DC) i funkcionalni kapacitet (imunogene ili tolerogene DC) DC-a predstavljaju kritične faktore koji određuju prirodu imunskog odgovora (Kim i Diamond, 2015). Naime, nakon razvića, nezrele DC migriraju u tkiva, a njihovo sazrevanje je indukovano različitim agensima, uključujući infekciju. Sazrevanje DC-a se pokreće aktivacijom receptora koji prepoznaju molekulske obrasce patogena, kao što su receptori slični Toll-u (*engl.* Toll-like receptors, TLR) i receptori slični NOD-u (*engl.* NOD-like receptors, NLR) (Zozulya i sar., 2010). Samo zrele DC imaju sposobnost da aktiviraju efektorske funkcije T limfocita. Za razliku od njih, tolerogene DC suprimiraju imunski odgovor na specifične antigene (Domogalla i sar., 2017).

Kada se DC razmatraju u kontekstu patogeneze EAE-a, smatra se da one imaju primarnu ulogu u započinjanju imunskog odgovora na sopstvene antigene. Naime, prvim korakom u indukciji EAE-a smatra se preuzimanje antigena mijelina od strane lokalnih nezrelih DC-a nakon imunizacije. Preuzimanjem antigena započinje proces sazrevanja DC-a, koji podrazumeva migraciju u sekundarne limfne organe, povećanje i stabilizaciju ekspresije MHC molekula II klase i povećanje površinske ekspresije kostimulatornih molekula (CD40, CD80 i CD86). Po dospevanju u PLČ, DC prezentuju antigene mijelina naivnim, antigen-specifičnim CD4⁺ T limfocitima u sklopu MHC molekula II klase. Aktivacija i preživljavanje T limfocita zahteva dva signala od DC: prezentaciju antigena u sklopu MHC molekula (prvi signal) i interakciju kostimulatornih molekula CD80 i CD86 sa CD28 molekulom na T limfocitima (drugi signal) (Zozulya i sar., 2010). Tokom aktivacije citokini produkovani od strane DC-a stimulišu diferencijaciju T limfocita u efektorske Th1 i Th17 subpopulacije, koje imaju ključnu ulogu u patogenezi EAE-a i MS-e. Produkcijom citokina IL-6, TGF- β , IL-23 i IL-1 β DC stimulišu diferencijaciju Th17 limfocita, dok produkcijom citokina IL-12 polarizuju diferencijaciju T limfocita ka Th1 subpopulaciji (Bailey i sar., 2007; Zhu i Paul, 2010).

Za razliku od imunogenih zrelih DC-a koje imaju ulogu u inicijaciji imunskog odgovora, tolerogene DC učestvuju u uspostavljanju i održavanju centralne i periferne imunološke tolerance. Fenotip tolerogenih DC-a je sličan fenotipu nezrelih DC-a i karakteriše se niskom ekspresijom MHC molekula i kostimulatornih molekula, kao i izmenjenim citokinskim profilom. Tolerogene DC na različite načine utiču na aktivaciju T limfocita. Prezentacija niskih nivoa antigena u odsustvu kostimulacije od strane tolerogenih DC-a dovodi do anergije T limfocita. Tolerogene DC mogu sekretovati antiinflamacijske citokine IL-10 i TGF- β , uz smanjenu produkciju proinflamacijskih citokina, doprinoseći indukciji tolerance (Domogalla i sar., 2017). Tolerogene DC takođe indukuju apoptozu T limfocita koja se zasniva na interakciji Fas receptora smrti i Fas liganda ili liganda koji indukuje apoptozu povezanog sa TNF (*engl.* TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) i receptora TRAIL (Izawa i sar., 2012; Kurts i sar., 1998). Ove ćelije mogu ekspimirati različite inhibitorne receptore kao što su PDL-1, PDL-2 i CTLA-4 (Keir i sar., 2007; Laurent i sar., 2010). Pored navedenih mehanizama, tolerogene DC mogu smanjiti proliferaciju T limfocita uticajem na njihov metabolizam. Naime, tolerogene DC oslobađaju indolamin-dioksidogenazu (IDO), koja olakšava degradaciju triptofana neophodnog za proliferaciju T limfocita (Mellor i Munn, 2004). Još jedan enzim od značaja za tolerogenu funkciju DC je arginaza-1 (Arg-1), čija ekspresija od strane DC-a omogućava degradaciju arginina i učestvuje u produkciji poliamina, koji posreduju u aktivaciji IDO, čime se inhibira proliferacija T limfocita (Mondanelli i sar., 2017). Takođe, tolerogene DC produkcijom citokina IL-10, TGF- β i IL-27 stimulišu diferencijaciju Treg u sekundarnim limfnim organima (Domogalla i sar., 2017).

1.4.2. CD4⁺ T limfociti

Kao što je prethodno navedeno, EAE indukovana klasičnom imunizacijom antigenom mijelina u emulziji sa CFA je bolest posredovana CD4⁺ T limfocitima. Prisustvo *Mycobacterium tuberculosis* u adjuvansu usmerava diferencijaciju aktiviranih antigen-specifičnih CD4⁺ T limfocita ka Th1 i Th17 subpopulacijama (Kurschus 2015). Obe navedene subpopulacije T limfocita se smatraju encefalitogenima i imaju sposobnost da indukuju autoimunski odgovor usmeren prema antigenima CNS-a. Međutim, Th1 i Th17 limfociti funkcionišu komplementarno i karakterišu se različitim patogenetskim mehanizmima (Domingues i sar., 2010). Naime, u zavisnosti od odnosa zastupljenosti Th1 i Th17 limfocita kod miševa nakon aktivne indukcije EAE-a zavisi i regionalna lokalizacija lezija CNS-a. Tako kada broj Th17 limfocita prevazilazi broj Th1 limfocita dolazi do inflamacije u mozgu, dok veći broj Th1 limfocita dovodi do inflamacije u kičmenoj moždini životinja u kojima je indukovana EAE (Stromnes i sar., 2008). Takođe, inflamacija u CNS-u posredovana dominantno Th1 limfocitima se karakteriše infiltracijom makrofaga, dok se inflamacija indukovana Th17 limfocitima odlikuje predominantom infiltracijom neutrofila (Kroenke i sar., 2008). Pored toga, kada broj Th1 limfocita prevazilazi broj Th17 limfocita EAE se odlikuje progresivnom paralizom, dok se EAE u čijoj patogenezi dominiraju Th17 limfociti karakteriše vrtenjem, ataksijom i proprioceptivnim defektima eksperimentalnih životinja (Stromnes i sar., 2008).

Diferencijaciju aktiviranih CD4⁺ T limfocita ka Th1 subpopulaciji, stimuliše citokin IL-12 produkovan od strane DC-a. Diferencijacija Th1 subpopulacije podrazumeva ekspresiju transkripcionog faktora Tbet, pri čemu ova subpopulacija predominantno proizvodi citokin IFN- γ (El-behi i sar., 2010). S druge strane, transkripcioni faktori ROR γ t i ROR α usmeravaju diferencijaciju CD4⁺ T limfocita ka Th17 subpopulaciji, koja je stimulirana citokinima TGF- β , IL-6 i IL-21. Stimulaciji procesa diferencijacije Th17 limfocita doprinose i citokini IL-1 β i TNF, dok je IL-23 neophodan u završnim fazama diferencijacije ovih ćelija, a citokini IFN- γ i IL-4 suprimiraju njihovu diferencijaciju (McGeachy i sar., 2007; Stockinger i Veldhoen, 2007). Nakon stimulacije ekspresije transkripcionih faktora ROR γ t i ROR α dolazi do produkcije efektorskih citokina ove ćelijske subpopulacije: IL-17A, IL-17F i IL-22 (Cua i sar., 2003; Langrish i sar., 2005). U homeostatskim uslovima Th17 limfociti su pre svega prisutni u mukoznim tkivima i imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze i odbrani od patogenih mikroorganizama (Ivanov i sar., 2009). Ovakvi Th17 limfociti u crevima posredstvom svojih citokina stimulišu oslobađanje antimikrobnih peptida od strane epitelnih ćelija i regrutuju neutrofile u uslovima inflamacije (Littman i Rudensky, 2010). Th17 limfociti prisutni u crevima u homeostazi se označavaju kao nepatogeni Th17 limfociti i nisu povezani sa autoimunskim odgovorom na sopstvene antigene (Yasuda i sar., 2019).

Kao što je prethodno objašnjeno, diferencijacija T limfocita nakon aktivacije specifičnim antigenom je zavisna od citokinskog miljea prisutnog u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije. Na sličan način i patogenost Th17 limfocita zavisi od prisustva specifičnih citokina tokom njihove diferencijacije. Naime, *in vitro* polarizacijom Th17 limfocita u prisustvu citokina IL-6 i TGF- β dolazi do nastanka Th17 limfocita, koji nemaju kapacitet da indukuju EAE nakon pasivnog transfera u naivne miševe. S druge strane, Th17 limfociti polarizovani u prisustvu IL-23, IL-1 β i IL-6 imaju sposobnost indukcije EAE-a i označeni su kao patogena Th17 ćelijska subpopulacija (Ghoreschi i sar., 2010). Iako je IL-23 neophodan za indukciju EAE-a i diferencijaciju patogenih Th17 limfocita, sam citokin IL-17 nije neophodan za indukciju EAE-a. Naime, miševi sa delecijom gena za IL-17 su podložni EAE-u, ali se bolest koju oni razvijaju karakteriše slabijim kliničkim tokom. Na osnovu toga se može zaključiti da IL-17 doprinosi patogenezi EAE-a, ali nije neophodan za njegovu indukciju. Citokini IL-23 i IL-1 β indukuju i nastanak visoko patogenih IL-17⁺IFN- γ ⁺ i IL-17⁺GM-CSF⁺ T limfocita (Basu i sar., 2015; Hasan i sar., 2017). S obzirom na to da delecija gena za citokin GM-CSF sprečava indukciju EAE-a,

jasno je da je to jedan citokin neophodan za indukciju EAE-a (McQualter i sar., 2001). Produkcija citokina GM-CSF u T limfocitima takođe je indukovana citokinom IL-23. Pretpostavlja se da je mehanizam kojim GM-CSF ostvaruje patogenu ulogu u EAE-u stimulacija produkcije IL-6, koji inhibira Treg, kao i usmeravanje polarizacionog kapaciteta DC ka indukciji Th17 limfocita (Ko i sar., 2014; Sonderegger i sar., 2008).

Kada se govori o ulozi Th1 i Th17 limfocita u patogenezi EAE-a, ističu se njihove sledeće funkcije: oslobađanje proinflamacijskih medijatora, stimulisanje infiltracije i aktivacije drugih ćelija imunskog sistema i direktan uticaj na vijabilnost i funkciju lokalnih ćelija u CNS-u (Kaskow i sar., 2018). Infiltracija T limfocita u CNS dešava se najčešće sedmog ili osmog dana posle imunizacije, pri čemu najveći broj rano infiltriranih T limfocita produkuje IL-17 (Kurschus, 2015). Citokin IL-17 ostvaruje plejotropno dejstvo indukujući produkciju velikog broja matriksnih metaloproteinaza (MMP1, 3, 9, 12, 13), hemokina (CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL5) i citokina kao što su GM-CSF i IL-6. Ovi hemokini i citokini imaju ulogu da regrutuju i aktiviraju druge ćelije imunskog sistema. Interakcija CXCL1/2 sa glavnim hemokinskim receptorom na neutrofilima (CXCR2) indukuje ranu infiltraciju ovih ćelija u CNS, koja prati infiltraciju Th17 limfocita (Souluka i sar., 2009; Zehntner i sar., 2005). Smatra se da IL-17 doprinosi narušavanju integriteta krvno-moždane barijere indukcijom produkcije ROS u endotelnim ćelijama krvnih sudova (Huppert i sar., 2010). Th1 limfociti doprinose patogenezi EAE-a kroz produkciju citokina IFN- γ i TNF. Citokin IFN- γ produkovan od strane Th1 limfocita stimuliše ekspresiju MHC molekula u ćelijama u CNS-u i direktno utiče na aktivacioni status i vijabilnost rezidentnih ćelija CNS-a (Ottum i sar., 2015). Th1 limfociti indukuju produkciju hemokina CXCL9, CXCL10 i CXCL11 koji posreduju u regrutovanju makrofaga na mesto inflamacije (Lovett-Racke i sar., 2010).

Pored Th1 i Th17 limfocita, ulogu u patogenezi EAE-a imaju i regulatorni T limfociti (Treg). Oni učestvuju u održavanju autotolerance na sopstvene antigene, usled čijeg gubitka dolazi do razvoja autoimunskih bolesti (Jadidi-Niaragh i Mirshafiey, 2011). Samim tim, smatra se da jedan od uzroka autoimunskih bolesti, uključujući i MS-u, može biti poremećaj na nivou Treg koji se ogleda u redukciji broja Treg, poremećaju u njihovoj funkciji i konverziji, inhibiciji supresivne funkcije Treg usled hronične inflamacije i/ili rezistenciji efektorskih T limfocita na supresiju od strane Treg (Korn i sar., 2007; Liu i sar., 2006). Prvi put je značaj Treg u patogenezi EAE-a pokazan u studiji Adda i saradnika, kada je transferom Treg postignuta otpornost na indukciju bolesti (Adda i sar., 1977). Takođe, ova studija je pokazala da je broj Treg povećan u fazi oporavka od EAE-a. Međutim, Treg su okarakterisani tek deceniju kasnije, kada je pokazano da oni pripadaju CD4⁺ T limfocitima i kada su ujedno i dobili naziv Treg (Karpus i Swanborg, 1989). Kasnija istraživanja su pokazala da se transferom velikog broja Treg iz naivnih miševa može sprečiti pojava i progresija pasivnog ili aktivnog EAE-a (Khm i sar., 2002). Takođe, transfer Treg izolovanih iz CNS-a miševa u fazi oporavka od EAE-a sprečava razvoj aktivnog EAE-a kod miševa recipijenata (McGeachy i sar., 2005). S druge strane, deplecija Treg dovodi do intenzivnije progresije bolesti i odsustva remisije (Oh i sar., 2009).

Sakaguchi i saradnici su 1995. godine prvi okarakterisali regulatornu populaciju T limfocita kao CD4⁺CD25^{high} limfocite (Sakaguchi i sar., 1995). Kasnije otkriće transkripcionog faktora FoxP3 kao fundamentalnog transkripcionog faktora za razvoj CD4⁺CD25⁺ regulatornih T limfocita u timusu omogućilo je istraživačima da preciznije definišu fenotip jednog dela Treg kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ limfocite (Fontenot i sar., 2003). Diferencijacija i proliferacija Treg stimulisana je citokinima IL-2, IL-4, IL-7 i IL-15 i oni se mogu podeliti u dve grupe: prirodne i inducibilne Treg (Yates i sar., 2007). Prirodni Treg nastaju u timusu, karakterišu se stabilnom ekspresijom FoxP3, odgovorni su za održavanje tolerance na sopstvene antigene i upravo se ovi limfociti definišu kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Miyara i sar., 2009). Prirodni Treg čine 5-10% ukupne populacije perifernih CD4⁺ T limfocita kod

miša i čoveka (Jadidi-Niaragh i Mirshafiey, 2011). Iako se ovi limfociti karakterišu visokom ekspresijom CD25, ovaj molekul se ne može sa apsolutnom sigurnošću koristiti kao marker za razlikovanje prirodnih Treg od konvencionalnih T limfocita. Aktivirani T limfociti takođe mogu eksprimirati visoke nivoe ovog molekula, čineći oko 50 % populacije CD25^{high} ćelija. Zbog toga otkriće FoxP3 transkripcionog faktora omogućava uspešniju detekciju prirodnih Treg. Međutim, iako je FoxP3 neophodan za funkciju prirodnih Treg, pokazano je da je ovaj transkripcioni faktor eksprimiran i u aktiviranim T limfocitima (Janson i sar., 2008; Roncarolo i Gregori, 2008). S druge strane, inducibilni Treg nastaju na periferiji od konvencionalnih naivnih CD4⁺ T limfocita, u prisustvu TGF- β ili retinoične kiseline, proizvode citokin IL-10 i značajno se razlikuju u stabilnosti i genskoj ekspresiji od prirodnih Treg (Kanamori i sar., 2016). Za razliku od prirodnih Treg koji se često definišu kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, inducibilni Treg eksprimiraju različite markere i obično ne eksprimiraju FoxP3. Inducibilnim Treg pripada nekoliko podgrupa ćelija: Tr1, koji proizvode IL-10 i TGF- β i ostvaruju značajan immunosupresivni efekat, CD8⁺ Treg, Treg tipa 3 koji eksprimiraju transkripcioni faktor ROR γ t i proizvode TGF- β (Vasileiadis i sar., 2018; Park i Eberl, 2018). Treg ostvaruju svoju regulatornu funkciju posredstvom različitih mehanizama koji se mogu podeliti u četiri kategorije: immunosupresija posredstvom inhibitornih citokina (Bettini i Vignali, 2009), citoliza (Gondek i sar., 2005), uticaj na metabolizam (Deaglio i sar., 2007) i modulacija funkcije APC-a (Oderup i sar., 2006).

Iako su CD8⁺ T limfociti dominantna populacija T limfocita zastupljena u lezijama CNS-a osoba obolelih od MS-e, CD4⁺ T limfociti se smatraju inicijatorima bolesti (Garg i Smith, 2015). Značaj CD4⁺ T limfocita u patogenezi MS-e pokazan je u rezultatima studija koje su obuhvatale analizu uzoraka krvi i cerebrospinalne tečnosti pacijenata obolelih od ove bolesti. Naime, mijelin-specifični T limfociti detektovani su i kod zdravih osoba i kod osoba obolelih od MS-e. Međutim, ovi T limfociti kod zdravih osoba imaju fenotip naivnih, dok mijelin-specifični T limfociti kod obolelih imaju fenotip aktiviranih ili memorijskih limfocita (Lovett-Racke i sar., 1998). Uz to, pokazano je da je nivo iRNK za citokin IL-17 povećan u cerebrospinalnoj tečnosti i krvi obolelih od MS-e (Matusevicius i sar., 1999). Nivo efektorskih citokina Th1 ćelijske subpopulacije, IFN- γ i TNF, je takođe povećan u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od MS-e, pri čemu je ovo povećanje statistički značajno samo za TNF (Lock i sar., 2002). Istraživanja koja se odnose na upoređivanje broja prirodnih Treg kod obolelih od MS-e i zdravih osoba daju suprotstavljene podatke. Iako neka od njih pokazuju smanjenje broja ovih limfocita kod osoba obolelih od MS-e (Venken i sar., 2007), najveći broj njih nije utvrdio postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti ovih ćelija kod zdravih i obolelih osoba (Feger i sar., 2007). S druge strane, funkcionalne studije koje su koristile *in vitro* testove supresije su pokazale postojanje funkcionalnog deficita Treg osoba obolelih od MS-e (Haas i sar., 2005).

1.4.3. Mikroglia i makrofagi

Mikroglia predstavlja rezidentne ćelije CNS-a i razvija se rano tokom embriogeneze od mijeloidnih prekursora, koji iz žumančane kese embriona migriraju u CNS (Ginhoux i sar., 2013). U uslovima odsusva inflamacije, mikroglia konstantno nadgleda mikrosredinu CNS-a, omogućava uklanjanje debrisu u zdravom mozgu i doprinosi sinaptičkoj plastičnosti. Samim tim, mikroglia je veoma bitna za održavanje homeostaze CNS-a (Chu i sar., 2018). Makrofagi su ćelije imunskog sistema koje mogu imati različito poreklo: oni nastaju od hematopoetskih stem ćelija, ali i od monocita plazme ili embrionskih progenitora iz žumančane kese, kada dele poreklo sa mikroglijom (Ginhoux i Williams, 2016; Hashimoto i sar., 2013). U zdravom CNS-u makrofagi se uglavnom nalaze u formi perivaskularnih makrofaga (Fabriek i sar., 2005). Mikroglia i makrofagi dele mnoge funkcije kao što su prezentacija antigena, produkcija citokina, ROS, hemokina i NO. Međutim, između njih postoje i

značajne razlike. Tokom ranih faza imunskog odgovora u CNS-u rezidentna mikroglia eksprimira niske nivoe CD45, CCR1, CCR5, ali visoke nivoe TGF- β . Za razliku od mikroglie, makrofagi koji infiltriraju u CNS sa periferije ekspimiraju visoke nivoe CD45, CCR1 i CCR5, ali pokazuju znatno niži nivo ekspresije TGF- β (Chu i sar., 2018). Novijim istraživanjima je pokazano da se kao specifični marker za razlikovanje mikroglie od makrofaga može koristiti transmembranski protein 119 (Tmem119), koji je ekspimiran samo u mikrogliji (Bennett i sar., 2016).

U odgovoru na različite signale, mikroglia i makrofagi mogu biti polarizovani u smeru M1 ili M2 mikroglie i makrofaga. M1 mikroglia i makrofagi se odlikuju proinflamacijskim fenotipom koji nastaje u odgovoru na klasičnu aktivaciju TLR receptora. Polarizacija ovih ćelija ka M1 fenotipu podrazumeva povećanu ekspresiju molekula MHC II, CD40, CD80, CD86, CD45, oslobađanje proinflamacijskih citokina (TNF, IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-23), hemokina (CCL4, CCL5, CCL8, CXCL9, CXCL2, CXCL10, CXCL4), produkciju NO i ROS, kao i povećani kapacitet fagocitoze (Juhas i sar., 2015; Kapelos i Iqbal, 2016). Zahvaljujući navedenim fenotipskim i funkcionalnim promenama povećava se antigen-prezentujuća sposobnost M1 makrofaga i mikroglie (Chu i sar., 2018). Za razliku od M1 fenotipa, M2 mikroglia i makrofagi doprinose reparaciji tkiva. Polarizacija ka M2 fenotipu indukovana je citokinima IL-3, IL-4, IL-13, IL-21, IL-33 (Gordon i Martinez, 2010). M2 makrofagi proizvode anti-inflamacijske citokine (IL-10, IL-13, TGF- β), neurotrofne faktore, epidermalni faktor rasta, vaskularni endotelni faktor rasta i antagoniste receptora za IL-1 β (Locati i sar., 2013). Treba istaći da su makrofagi i mikroglia multifunkcionalne ćelije, koje prelaze iz jednog fenotipa u drugi, u zavisnosti od mikrosredine u kojoj se nalaze (Chu i sar., 2018). Zastupljenost M2 makrofaga i mikroglie se tokom procesa inflamacije u CNS-u postepeno povećava do pika EAE-a, dok se zastupljenost M1 makrofaga smanjuje (Shin i sar., 2012). U kasnijim fazama EAE-a M2 mikroglia i makrofagi postaju najzastupljenije ćelije u CNS-u, koje posreduju u supresiji EAE-a kroz produkciju antiinflamacijskih citokina, rezoluciju inflamacije i reparaciju tkiva (Jiang i sar., 2012).

Reaktivna mikroglia i makrofagi imaju složenu ulogu u patogenezi EAE-a i MS-e. Ove ćelije posreduju u oštećenju tkiva CNS-a, ali mogu ostvariti i neuroprotektivne efekte. Tokom akutne faze bolesti, mikroglia i makrofagi razvijaju M1 fenotip i oslobađaju velike količine proinflamacijskih citokina koji indukuju oštećenje tkiva, demijelinizaciju i smrt neurona u CNS-u (Shemer i Jung, 2015). Pored toga, produkcijom hemokina mikroglia i makrofagi stimulišu dalju infiltraciju leukocita. Pored produkcije citokina, mikroglia i makrofagi, uz astrocite, predstavljaju glavne ćelijske izvore ROS u EAE-u i MS-i. ROS doprinose patogenezi EAE-a i MS-e na nekoliko načina. Oni dovode do promena u čvrstim vezama i citosketu endotelskih ćelija mozga, olakšavajući transendotelnu migraciju monocita (Schreibelt i sar., 2006). ROS negativno deluju i na progenitore oligodendrocita inhibirajući ekspresiju gena koji promovišu maturaciju (French i sar., 2009). Osim što deluju kao štetni produkti metabolizma, ROS doprinose patogenezi EAE-a i MS-e i kao signalni glasnici u velikom broju signalnih puteva. Tako, ROS stimulišu infiltraciju ćelija imunskog sistema kroz stimulaciju ekspresije VCAM-1 i hemokina CCL-2 u endotelskim ćelijama (Marui i sar., 1993). ROS kao signalni molekuli posreduju i u ćelijskoj smrti indukovanoj aktivacijom T limfocita, a uključeni su i u regulaciju diferencijacije T limfocita (Belikov i sar., 2015). ROS takođe stimulišu ekspresiju površinskih molekula, bitnih za interakciju sa T limfocitima (MHC II, CD40 CD86), na DĆ-a (Rutault i sar., 1999). Uz to, oni učestvuju u regulaciji komunikacije između DĆ-a i T ćelija tokom prezentacije antigena (Matsue i sar., 2003). Još jedna bitna uloga mikroglie i makrofaga u patogenezi EAE-a i MS-e je prezentacija antigena T limfocitima koje infiltriraju CNS. Ipak, smatra se da su mikroglia i makrofagi slabi aktivatori naivnih T limfocita i da je njihova glavna uloga u reaktivaciji ovih ćelija nakon njihovog ulaska u CNS (Bailey i sar., 2006; Carson i sar., 1998).

Značaj mikroglije i makrofaga u patogenezi EAE-a može se videti u studijama koje su obuhvatile depleciju ovih ćelija ili inhibiciju njihove infiltracije u CNS. Tako je pokazano da deplecija mikroglije remeti produkciju NO i TNF u CNS-u i dovodi do redukcije aktivacije i regrutovanja leukocita tokom EAE-a (Heppner i sar., 2005). Takođe, inhibicija infiltracije makrofaga u CNS deplecijom hemokina CCL22 ili hemokinskog receptora CCR4, koji posreduju u regrutaciji makrofaga u CNS, dovodi do slabljenja simptoma EAE-a (Dogan i sar., 2011).

1.5. Imunomodulacijska svojstva vodonik-sulfida

Vodonik-sulfid (H_2S) je otrovni gas i industrijski zagađivač, zbog čega se smatralo da on ispoljava isključivo štetne efekte u biološkim sistemima. Međutim, postalo je jasno da se biološki aktivne količine ovog gasa prirodno sintetišu od strane velikog broja ćelijskih tipova u tkivima sisarskih, nesisarskih i biljnih vrsta, a dalja istraživanja su pokazala da H_2S ostvaruje fiziološku ulogu kao signalni molekul i da doprinosi održanju homeostaze u organizmu (Whiteman i Winyard, 2011). Zato se danas H_2S ubraja u gasotransmitere, zajedno sa druga dva od ranije poznata gasovita signalna molekula – ugljen-monoksidom (CO) i azot-monoksidom (NO) (Li i sar., 2006).

Svoju biološku aktivnost H_2S ostvaruje u različitim organima i sistemima organa: kardiovaskularnom, nervnom, imunskom, reproduktivnom, mišićnom (Whiteman i Winyard, 2011). H_2S je u sisarskim tkivima uglavnom zastupljen u nanomolarnim koncentracijama, a u endogenu produkciju ovog gasa uključena su tri enzima. Cistationin β -sintaza (*engl.*, cystathionine β -synthase, CBS) i cistationin γ -liaza (*engl.*, cystathionine γ -lyase, CSE) su piridoksal-5-fosfat zavisni enzimi koji H_2S proizvode direktnom desulfhidracijom cisteina, dok 3-merkaptopiruvat-sulfurtransferaza (MPST) proizvodi H_2S indirektnom desulfhidracijom cisteina uz pomoć enzima cistein aminotransferaze (Kabil i Banerjee, 2010). Pretpostavlja se da svoje biološke efekte H_2S ostvaruje interakcijom sa različitim signalnim putevima u ćelijama, uključujući signalni put cAMP/protein kinaze A, zatim uticajem na tirozin kinazne receptore (receptor epidermalnog faktora rasta), uticajem na aktivnost p38 mitogenom-aktiviranu protein kinazu (p38 MAPK) ili delovanjem na jonske kanale za kalijum i hlor (Hu i sar., 2007; Kimura, 2000; Tan i sar., 2010; Dawe i sar., 2008).

Sve je veći broj podataka koji govore o H_2S kao fiziološkom medijatoru inflamacije, ali ne postoji jasan stav povodom prirode njegove uloge u inflamaciji (Whiteman i Winyard, 2011). U različitim životinjskim modelima bolesti i različitim sistemima ćelijskih kultura pokazano je da endogeni ili egzogeni H_2S može imati i pro- i antiinflamacijsku ulogu. Tip efekta koji H_2S ostvaruje u velikoj meri zavisi od konteksta istraživanja. Na primer, efekat H_2S može se značajno razlikovati u fiziološkim i patofiziološkim uslovima, a može varirati i u zavisnosti od doze primenjenog egzogenog gasa (Wallace i sar., 2015).

Tako tretman mišjih makrofaga stimulisanih LPS-om niskim koncentracijama donora H_2S , natrijum-hidrogensulfida (NaHS), inhibira sintezu NO, IL-6 i IL-1 β , dok visoke koncentracije NaHS stimulišu produkciju proinflamacijskih medijatora u makrofagima (Whiteman i sar., 2010a). Izlaganje humanih neutrofila mikromolarnim koncentracijama H_2S redukuje adheziju i migraciju neutrofila indukovanu citokinom IL-1 β . H_2S takođe indukuje apoptozu neutrofila, što je kritičan korak u rezoluciji inflamacije (Brancaleone i sar., 2014; Mariggio i sar., 1998). Primenom inhibitora sinteze H_2S pokazano da ovaj gas stimuliše *in vitro* diferencijaciju Treg, dok je tretman miševa ovim inhibitorom doveo do smanjenja zastupljenosti Treg u slezini i limfnim čvorovima. Takođe, pokazano je da H_2S stimuliše diferencijaciju i stabilnost Treg kroz promociju ekspresije enzima Tet1 i Tet2, koji vrše demetilaciju *FoxP3* gena

(Yang i sar., 2015). Na osnovu navedenih podataka se može zaključiti da H₂S moduliše funkcije različitih ćelija imunskog sistema.

Pored efekta na pojedinačne populacije ćelija imunskog sistema, efekat H₂S ispitan je i u različitim modelima inflamacije. U modelu sepse indukovane punkcijom i ligacijom cekuma ili LPS-om pokazana je povišena ekspresija enzima CBS i CSE, kao i povećana koncentracija H₂S u serumu, plućima, bubrezima i pankreasu obolelih životinja (Hui i sar., 2003; Li i sar., 2005). Slični rezultati dobijeni su analizom nivoa H₂S u plazmi pacijenata sa septičkim šokom (Whiteman i Winyard, 2011). S druge strane, primena inhibitora enzima CSE dovela je do smanjenja nivoa ekspresije i aktivnosti mijeloperoksidaze u plućima, kao i redukcije nivoa TNF i NO u serumu životinja kojima je indukovana sepsa. Takođe, tretman životinja inhibitorom ovog enzima pre indukcije sepse doveo je do smanjenja nivoa TNF i IL-6 u plućima i serumu, kao i do smanjenja akumulacije neutrofila (Collin i sar., 2005).

Antiinflamacijska svojstva H₂S pokazana su i na modelu kolitisa indukovanog 2,4,6-trinitrobenzen sulfonskom kiselinom. Naime, farmakološka inhibicija enzima CBS i CSE je dovela do pogoršanja simptoma kolitisa u eksperimentalnim životinjama, dok je tretman životinja NaHS doveo do smanjenja oštećenja tkiva kolona i redukcije nivoa ekspresije TNF (Wallacw i sar., 2009).

Na modelu inflamacije kože izazvane opekotinom, inhibicija enzima CSE je dovela do smanjenja akumulacije neutrofila povezane sa opekotinom, kao i promene na plućima i jetri. U skladu sa tim, primena NaHS paralelno sa indukcijom opekotine je intenzivirala inflamaciju indukovanu opekotinom (Zhang i sar., 2010). S druge strane, primena sličnog donora H₂S, natrijum-sulfida (Na₂S), odmah nakon indukcije inflamacije kože opekotinom dovela je do povećanog preživljavanja životinja i redukcije nivoa IL-1 β , a povećanja nivoa IL-10 u plućima tretiranih životinja. Dakle, na modelu inflamacije kože H₂S može ostvariti i pro- i antiinflamacijsku ulogu (Esechie i sar., 2008).

Efekat H₂S na inflamaciju u plućima varira u zavisnosti od tipa inflamacije i analiziranog modela. Poznato je da udisanje H₂S dovodi do edema pluća, koji se karakteriše ekstravazacijom eozinofila u bronhoalveolarni prostor (Lopez i sar., 1989). Kod obolelih od hronične obstruktivne bolesti pluća (HOBP) pokazani su znatno viši nivoi H₂S u serumu u odnosu na osobe koje ne boluju od ovog oboljenja ili obolele sa akutnim pogoršanjem ove bolesti. Takođe, kod ovakvih pacijenata dolazi do smanjenja nivoa H₂S u serumu, paralelno sa pogoršanjem bolesti. Nivo H₂S u serumu je u negativnoj korelaciji sa brojem neutrofila u sputumu, ali u pozitivnoj korelaciji sa brojem limfocita i makrofaga u sputumu, poboljšanom funkcijom pluća i nivoom NO u serumu (Chen i sar., 2005). Na osnovu ovih podataka pretpostavljeno je da indukcija sinteze H₂S tokom HOBP ima ulogu u promociji dilatacije glatkih mišića pluća i ograničavanju inflamacijske signalizacije. Na mišjem modelu astme indukovane ovalbuminom pokazano je da je ekspresija enzima CSE, kao i sinteza H₂S, smanjena u plućima obolelih miševa u odnosu na zdrave kontrole. Uz to, primena NaHS redukuje inflamaciju u plućima, smanjući infiltraciju neutrofila i eozinofila (Chen i sar., 2009).

Ukoliko se analizira značaj H₂S u patogenezi reumatoidnog artritisa, pokazano je da je koncentracija ovog gasa četiri puta povećana u sinovijalnoj tečnosti pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa u odnosu na odgovarajuće uzorke plazme, a duplo u odnosu na koncentraciju u sinovijalnoj tečnosti pacijenata obolelih od neinflamacijskih tipova artritisa (Whiteman i sar., 2010b). Takođe, primena NaHS na stimulisane sinoviocyte, izolovane iz pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa, dovela je do povećanja produkcije IL-6 (Kloesch i sar., 2010).

Kada se H₂S razmatra u kontekstu neuroinflamacije, njegova uloga je do danas ispitivana u svega nekoliko studija koje su uglavnom pokazale antiinflamacijsko dejstvo ovog gasa. Tako primena NaHS na primarnu mikrogliju ili ćelijsku liniju mišje imortalizovane mikroglije ostvaruje antiinflamacijsko

dejstvo na ove ćelije. Takođe, primena različitih donora H₂S favorizuje polarizaciju BV2 ćelijske linije mikroglije ka M2 fenotipu, kroz aktivaciju protein kinaze aktivirane AMP-om (AMPK) (Zhou i sar., 2014). U studiji sprovedenoj 2015. godine ispitan je *in vitro* efekat NaHS na ćelije od značaja za patogenezu MS-e: mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz zdravih donora, endotelske ćelije izolovane iz humane pupčane vene, ćelije prekursore oligodendrocita i astrocite poreklom iz pacova. H₂S je u ovoj studiji doveo do smanjenja ekspresije adhezivnih molekula LFA-1 i VCAM-1 na mononuklearnim ćelijama periferne krvi i endotelskim ćelijama, redukovao produkciju fibronektina u astrocitima i usporio diferencijaciju prekursora oligodendrocita (Talaie, 2016). Pored toga, uporedna analiza ekspresije enzima MPST u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata obolelih od MS-e i zdravih osoba pokazala je sniženu ekspresiju ovog enzima u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, kao i inverznu korelaciju između ekspresije MPST i nekoliko proinflamacijskih medijatora (Lazarević i sar., 2020).

Pored toga što poseduje svojstva medijatora inflamacije, antioksidativna svojstva H₂S su takođe pokazana u brojnim studijama. U ovim studijama je primena NaHS kao donora H₂S dovela do smanjenja produkcije ROS i povećanog preživljavanja neurona u različitim modelima oksidativnog stresa (Lan i sar., 2011; Luo i sar., 2013; Kumar i Sandhir, 2018). Takođe, antioksidativna uloga H₂S pokazana je i na kardiomiocitima (Dong i sar., 2012). Ipak, postoje podaci koji ukazuju na to da H₂S može ostvariti i suprotan efekat na produkciju ROS. Tako je sposobnost H₂S da stimuliše produkciju ROS pokazana na različitim, evolutivno udaljenim organizmima. Naime, oštećenje do koga H₂S dovodi u hepatocitima pacova je posredovano povećanom produkcijom ROS (Eghbal i sar., 2004). Takođe, stimulacijom produkcije ROS H₂S ostvaruje genotoksične efekte u jajnim ćelijama hrčka, celomocitima morskih invertibrata i bakterijskim ćelijama *E. coli* (Attene-Ramos i sar. 2007; Joyner-Matos i sar., 2010; Fu i sar., 2018). Efekat stimulacije produkcije ROS zabeležen je i u biljci *Arabidopsis thaliana*, u kojoj je ovaj fenomen povezan sa procesom zatvaranja stoma (Scuffi i sar., 2018).

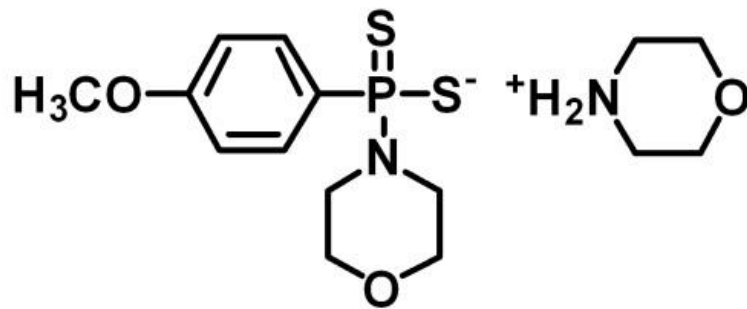
1.6. Imunomodulacijska svojstva GYY4137

GY4137 (morfolin-4-ium-4-metoksifenil(morfolino)-fosfodionat) (Slika 1) je derivat Lawesson-ovog reagensa koji hidrolizom oslobađa H₂S i predstavlja sporooslobađajući donor H₂S (Li i sar., 2008). GYY4137 je prvobitno korišćen kao katalizator u vulkanizaciji gume, a njegova biološka aktivnost otkrivena je 2008. godine, kada je pokazano da ovo jedinjenje ostvaruje vazorelaksacionu aktivnost kako *in vitro*, tako i *in vivo*. On je ujedno i prvi mali organski molekul za koji je utvrđeno da predstavlja sporooslobađajući donor H₂S (Li i sar., 2008).

Za ispitivanje biološke uloge H₂S koriste se različiti donori ovog gasa, koji se po načinu oslobađanja mogu okarakterisati kao brzooslobađajući ili sporooslobađajući donori. Brzooslobađajuće donore H₂S predstavljaju sulfidne soli (Na₂S, NaHS), dok sporooslobađajuće donore predstavljaju sintetički derivati Lawesson-ovog reagensa. S druge strane, različita jedinjenja poreklom iz belog luka mogu biti sporooslobađajući ili brzooslobađajući donori (npr. alicin) (Beltowski, 2015; Corvino i sar., 2021). Takođe, donori H₂S se na osnovu mehanizma kojim dolazi do oslobađanja ovog gasa mogu podeliti u nekoliko grupa: donori koji oslobađaju H₂S hidrolizom, donori kod kojih je oslobađanje H₂S stimulirano promenom pH, ćelijskim tiolima, fotoaktivacijom ili enzimskom reakcijom (Corvino i sar., 2021).

Osnovna prednost GYY4137 kao donora H₂S, u odnosu na sulfidne soli (NaHS, Na₂S), je upravo sporo oslobađanje ovog gasa tokom produženog vremenskog perioda. Tako je upoređivanjem brzine oslobađanja H₂S od strane GYY4137 i NaHS u uslovima pH=7,4, pokazano da se pik oslobađanja H₂S

od strane GYY4137 postiže nakon 10 min, dok se ovaj pik u slučaju NaHS postiže posle samo 10s. Takođe, koncentracija H₂S u pik u oslobađanja od strane GYY4137 u poređenju sa NaHS je bila 40 puta niža, pri čemu je početna koncentracija GYY4137 u ovoj studiji bila 10 puta niža od koncentracije NaHS (Lee i sar., 2011). Iz navedenog se vidi da sulfidne soli trenutno oslobađaju velike količine H₂S, što onemogućava imitiranje fizioloških uslova endogene enzimske produkcije ovog gasa. Iz tog razloga je GYY4137 mnogo pogodniji za ispitivanje fiziološke uloge H₂S u ćelijama i tkivima (Rose i sar., 2015).



Slika 1. Shematski prikaz strukture GYY4137.

Među do sada potvrđenim biološkim efektima koje GYY4137 ostvaruje nalazi se i njegovo imunomodulacijsko svojstvo. Imunomodulacijska svojstva GYY4137 do danas su ispitana u relativno malom broju studija u *in vitro* i *in vivo* modelima inflamacije. Iako većinu svojih efekata GYY4137 ostvaruje posredstvom oslobođenog H₂S, za koji je utvrđeno da ostvaruje efekte i pro- i antiinflamacijskog karaktera, najveći broj dosadašnjih studija je pokazao antiinflamacijsko dejstvo GYY4137. Kada se radi o antiinflamacijskoj ulozi ovog jedinjenja, pokazano je da primena GYY4137 smanjuje sekreciju proinflamacijskih medijatora u različitim tipovima ćelija. Tako je pokazano da GYY4137 utiče na smanjenje produkcije IL-1 β , IL-6, TNF, NO i prostaglandina E2 (PGE2) u mišjim makrofagima stimulisanim LPS-om (Whiteman i sar., 2010a). Takođe, GYY4137 ostvaruje antiinflamacijsko dejstvo na stimulisane humane glatke mišićne ćelije, redukujući produkciju citokina IL-8 (Perry i sar., 2011). Ovo jedinjenje dovodi do smanjenja produkcije IL-6, TNF, PGE2 i NO i nakon tretmana humanih sinoviocita i hondrocita stimulisanih LPS-om (Li i sar., 2013). Negativan efekat na produkciju proinflamacijskih medijatora GYY437 ostvaruje i kroz stimulaciju aktivnosti AMPK, smanjujući produkciju NO u BV2 ćelijama mikroglije (Zhou i sar., 2014). Antiinflamacijsko dejstvo GYY4137 pokazano je i na pacovskom modelu endotoksičnog šoka indukovano LPS-om. Tako primena GYY4137 pre indukcije septičkog šoka dovodi do smanjenja produkcije proinflamacijskih citokina i NO (Li i sar., 2009). Slične efekte na inflamaciju GYY4137 je ostvario na modelu artritisa indukovano intraartikularnom injekcijom CFA, kada je primenjen nakon indukcije artritisa (Li i sar., 2013). Nasuprot tome, kada se radi o proinflamacijskoj ulozi GYY417 do sada je pokazano da primena GYY4137 pre indukcije artritisa dovodi do intenzivnijih simptoma inflamacije (Li i sar., 2013).

U kontekstu neurodegenerativnih oboljenja do danas je uticaj GYY4137 testiran u životinjskim modelima Parkinsonove i Alchajmerove bolesti. Naime, na mišjem modelu Parkinsonove bolesti GYY4137 je ostvario neuroprotektivni efekat umanjujući gubitak dopaminergičkih neurona i smanjujući produkciju NO, što je rezultovalo u pozitivnom efektu na motoričke simptome bolesti (Hou i sar., 2017). Takođe, neuroprotektivni efekti GYY4137 pokazani su i na mišjem modelu Alchajmerove bolesti, gde je tretman ovim jedinjenjem umanjio motorne i kognitivne deficite (Giovinazzo i sar., 2021). S druge strane, efekat GYY4137 na modelima MS-e do danas nije ispitan.

Takođe, do istraživanja opisanog u ovoj doktorskoj disertaciji, efekat GYY4137 u kontekstu neuroinflamacije je ispitan samo u istraživanju Zhou i saradnika, kojim je pokazano da ovo jedinjenje suprimira produkciju medijatora inflamacije NO u BV2 ćelijama mikroglije (Zhou i sar., 2014). S obzirom na to da mikroglija kroz prezentaciju antigena i produkciju proinflamacijskih citokina doprinosi patogenezi EAE-a, bilo bi korisno ispitati uticaj GYY4137 i na ove funkcije mikroglije. Interesovanje za ispitivanje efekta GYY4137 na navedene funkcije mikroglije proizilazi i iz činjenice da GYY4137 smanjuje produkciju proinflamacijskih citokina u makrofagima, imunskim ćelijama koje su srodne mikrogliji (Whiteman i sar., 2010a). Pored toga, primena NaHS kao donora H₂S stimuliše diferencijaciju Treg, koje su ključne u ograničavanju autoimunske reakcije (Yang i sar., 2015). Ovaj podatak sugerše da bi GYY4137 mogao da ostvari imunomodulacijske efekte i na Treg u EAE-u. Na osnovu ovih i prethodno navedenih podataka o imunomodulacijskom efektu GYY4137 i drugih donora H₂S, može se pretpostaviti da GYY4137 poseduje potencijal modulacije fenotipa i funkcije ćelija imunskog sistema uključenih u patogenezu EAE-a. Shodno tome, predmet ove doktorske disertacije bio je ispitivanje efekta GYY4137 na BV2 mikroglijalne ćelije, DĆ diferentovane iz kostne srži C57BL/6 miševa, CD4⁺ T limfocite izolovane iz PLČ-a C57BL/6 miševa i DA pacova, imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, i CD4⁺ T limfocite izolovane iz kičmenih moždina DA pacova obolelih od EAE-a.

2. Ciljevi

Na osnovu dosadašnjih podataka o imunomodulacijskom, antioksidativnom i neuroprotektivnom dejstvu H₂S, postavljen je osnovni cilj ovog istraživanja – da se ispita imunomodulacijsko dejstvo sporooslobađajućeg donora H₂S, GYY4137, na ćelije imunskog sistema uključene u patogenezu EAE-a, kao i da se kroz utvrđivanje efekta GYY4137 ispita doprinos H₂S patogenezi EAE-a i razmotri eventualna mogućnost korišćenja modulacije nivoa H₂S u terapiji MS-e. Iz navedenog osnovnog cilja proizašli su sledeći specifični ciljevi:

1. Da se u *in vitro* uslovima ispita uticaj GYY4137 na sledeće APC-e:
 - i) Aktivirane BV2 mikroglijske ćelije, i to određivanjem:
 - Vijabilnosti aktiviranih BV2 ćelija
 - Adhezivnih svojstava i sposobnosti fagocitoze aktiviranih BV2 ćelija
 - Produkcije NO, ROS i proinflamacijskih citokina u ovim ćelijama
 - Fenotipskih karakteristika aktiviranih BV2 ćelija
 - ii) DC diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa određivanjem:
 - Vijabilnosti DC-a
 - Produkcije ROS, proinflamacijskih citokina i antiinflamacijskog citokina TGF-β u ovim ćelijama
 - Sposobnosti fagocitoze DC-a
 - Fenotipskih karakteristika DC-a
2. Da se u *ex vivo* uslovima ispita uticaj GYY4137 na imunske ćelije PLČ C57BL/6 miševa i DA pacova, imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, određivanjem:
 - Vijabilnosti ukupnih imunskih ćelija PLČ
 - Produkcije encefalitogenih citokina IFN-γ i IL-17 u ovim ćelijama
 - Zastupljenosti Th17 i Treg limfocita među ćelijama PLČ pacova
 - Zastupljenosti Th1, Th17 i Treg limfocita među ćelijama PLČ miševa
 - Mehanizama kojima GYY4137 ostvaruje efekat na zastupljenost Treg među ćelijama PLČ miševa
 - Produkcije ROS u CD4⁺ T limfocitima PLČ miševa
3. Da se u *ex vivo* uslovima ispita uticaj GYY4137 na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a određivanjem:
 - Produkcije encefalitogenih citokina IFN-γ i IL-17 u ovim ćelijama
 - Zastupljenosti Th17 i Treg limfocita među imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi i rastvori

Za izradu ove doktorske disertacije su korišćeni sledeći reagensi i rastvori:

- PBS (*engl.* Phosphate Buffer Saline) koji je dobijen rastvaranjem sledećih soli u vodi u navedenim koncentracijama: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄ (svi iz Lachner, Neratovice, Češka), pH 7,4;
- Serum fetusa govečeta (FCS, *engl.* Fetal Calf Serum, PAA Laboratories, Pašing, Austrija), u kome su komponente komplementa inaktivirane inkubacijom na 56°C tokom 30 min;
- Goveđi albumin iz seruma (BSA, *engl.* Bovine Serum Albumin, frakcija V, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD);
- Pufer za magnetne kuglice koji predstavlja 0,5% rastvor BSA i 2 mM rastvor etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA, Sigma-Aldrich) u PBS-u;
- Magnetne kuglice obeležene streptavidinom (ImagSAv kuglice, BD Biosciences, San Dijego, SAD);
- Pufer za lizu za Western blot koji je dobijen rastvaranjem sledećih supstanci u vodi u nevedenim koncentracijama: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 50 mM ditiotreitol (DTT) i 10% glicerol (Sigma-Aldrich);
- 4x koncentrovani SDS Pufer za nalivanje na gel za elektroforezu koji je dobijen rastvaranjem sledećih supstanci u vodi u nevedenim koncentracijama: 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% SDS, 20% glicerol, 0,2 M β-merkaptioetanol i 0,004% bromfenol plavo;
- Faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF; Peprotech, Roki Hil, SAD);
- Osnovni ćelijski medijum koji predstavlja RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute) sa 25 mM-HEPES i 2 mM-L glutaminom (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Izrael), uz dodatak 5% FCS, 1% Pen/Strep koktela antibiotika (Biological Industries) i 0,001% gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija);
- Medijum za imunske ćelije poplitealnih limfnih čvorova koji sadrži: RPMI-1640 (sa 25 mM-HEPES i 2 mM-L glutaminom), uz dodatak 2% pacovskog (*engl.* Rat Serum, RS) ili mišjeg seruma (*engl.* Mouse Serum, MS-e), 1% Pen/Strep koktela antibiotika i 0,001% gentamicina
- Medijum za dendritske ćelije koji sadrži: RPMI-1640 (25 mM-HEPES i 2 mM-L glutamin) sa dodatkom 1% Pen/Strep koktela antibiotika i 0,001% gentamicina, koji je suplementiran sa 1 mM natrijum piruvatom i 2 mM glutaminom (oba nabavljena od SigmaAldrich) i 20 % FCS
- Kompletni Frojndov adjuvans (*engl.* Complete Freund's Adjuvant – CFA; Difco, Detroit, MI, USA); *M.tuberculosis* H37Ra (Difco)
- Bazni protein mijelina (MBP, *engl.* Myelin Basic Protein, dobijen ljubaznošću prof. Aleksandra Flugela, Univerzitet u Getingenu, Nemačka)
- Puferi za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija - Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience)
- Pufer za vezivanje aneksina V (*engl.* Anxin binding buffer, ABB, Biotium, Hayward, SAD)
- Koktel za stimulaciju ćelija koji sadrži i inhibitore unutarćelijskog transporta proteina i sastoji se od: forbol-miristat-acetata (*engl.* Phorbol Miristate Acetate - PMA), jonomicina, brefeldina A i monensina (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich); lipopolisaharid (LPS, Sigma Aldrich); akutaza (*engl.* Accutase; Invitrogen); perkol (Sigma-Aldrich); pufer za lizu eritrocita (eBioscience, San Dijego, SAD); tripan plavo (BDSL, Velika Britanija); supstrat za peroksidazu 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB, eBioscience); Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD); reagens za izolovanje RNK

(TRIZol, Invitrogen); hlorovodonična kiselina (HCl), vodonik peroksid, rastvor Kristal violeta (*engl.* Crystal Violet -CV); sirćetna kiselina (CH₃COOH, svi dobavljeni od Zorka, Šabac, Srbija); Dihidrorodamin 123 (DHR, Sigma-Aldrich); 2',7'-dihlorofluorescein-diacetat (DCFDA, Sigma-Aldrich), koktel inhibitora proteaza (Sigma-Aldrich); natrijum dodecil sulfat (SDS, Applichem, Darmstadt, Nemačka), Tris-HCl, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (svi iz Serva, Hajdelberg, Nemačka), pufer za vezivanje aneksina V (5 x ABB, 5 x Annexin V Binding Buffer, Biotium, Hayward, SAD), NaHS (Lachner, Neratovice, Češka); (3-4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT, Sigma Aldrich)

3.2. Eksperimentalne životinje

Za izradu ove doktorske disertacije korišćene su ženke pacova visokorodnog soja Dark Aguti (DA) i mužjaci i ženke miševa visokorodnog soja C57BL/6, svi starosti 2-3 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, i čuvane pod standardnim uslovima uz neograničen pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (rešenje br. 4-10/19, veza 01-2279 od 11.10.2019.), u skladu sa direktivom 2010/63/EU.

3.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

3.3.1. Imunizacija životinja

Za imunizaciju miševa i pacova za potrebe izolovanja ćelija poplitealnih limfnih čvorova je korišćen MOG₃₅₋₅₅ (0,5 mg/ml) emulgovan istom količinom CFA, koji je sadržao 5 mg/ml toplotom ubijenih i liofilizovanih bakterija M. Tuberculosis H37 Ra. Za indukciju EAE-a u pacova je korišćen homogenat kičmene moždine (HKM) u puferisanom fiziološkom rastvoru (PBS, 50% w/v), emulgovan jednakom zapreminom CFA. Imunizacija je izvršena intradermalnom injekcijom 20 µl ili 100 µl emulzije u zadnje šape miševa ili pacova, respektivno.

3.3.2. Evaluacija kliničke slike

Nakon imunizacije emulzijom HKM u CFA vršeno je svakodnevno posmatranje pacova radi utvrđivanja početka i praćenja toka bolesti. Stepent težine bolesti je određivan pomoću skale od 0 do 4 na sledeći način: 0 – bez kliničkih simptoma bolesti; 1 – atonija repa; 2 – pareza zadnjih ekstremiteta; 3 – paraliza zadnjih ekstremiteta; 4 – moribundo stanje ili smrt životinje. U ovom modelu razlikuje se nekoliko faza bolesti: početak bolesti sa kliničkim skorom 1 (8-10 dan posle imunizacije (d.p.i.)); vrhunac bolesti sa kliničkim skorom 2 - 4 (12 - 14 d.p.i.); oporavak sa kliničkim skorom 1 ili manje (18 - 20 d.p.i.); ponovno pogoršanje bolesti (relaps) oko 21 d.p.i.

3.4. Metode izolovanja i kultivacija ćelija

3.4.1. Kultivacija BV2 ćelija

BV2 ćelije su dobijene ljubaznošću dr. Alba Minelli, Univerzitet u Peruđi, Italija. Ćelije su propagirane u medijumu RPMI suplementiranom sa 5% FCS. Za potrebe eksperimenata ćelije su postavljane u koncentraciji 5×10^5 ćelija/ml u ploče sa 24 bunara (osim ako nije drugačije naglašeno zbog specifičnosti metode) i kultivisane na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi pri koncentraciji CO₂ od 5% (u daljem tekstu označeno kao inkubacija). Kako bi se omogućilo da se ćelije zalepe za podlogu pre primene GYY4137, inkubacija sa 200 µM GYY4137 vršena je 90 min nakon postavljanja kulture. Paralelno sa primenom GYY4137, ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml). Kao kontrolni rastvarač korišćen je DMSO, u kome je inicijalno rastvoren GYY4137. Nakon inkubacije od 24 h supernatanti su iskorišćeni za određivanje nivoa produkcije citokina ili produkcije NO, a ćelije za merenje vijabiliteta, nivoa ekspresije površinskih molekula, fagocitoze, ili izolaciju RNK. Za potrebe određivanja produkcije ROS, inkubacija BV2 ćelija sa GYY4137 ili DMSO je vršena u različitim vremenskim intervalima (10 min, 30 min, 60 min, 24 h), u prisustvu ili odsustvu stimulacije LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml).

3.4.2. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka, dobijanje i kultivacija peritonealnih makrofaga

Ćelije peritonealnog ispirka (PEC, od *engl.* Peritoneal Exudate Cells) su dobijene ubrizgavanjem po 5 ml ili 10 ml sterilnog hladnog PBS-a u telesnu duplju miševa, odnosno pacova, i sakupljanjem peritonealne tečnosti u sterilne epruvete. Peritonealni ispirak je zatim centrifugiran na 500 g 5 min, a ćelije su resuspendovane u 5% FCS RPMI i prebrojane. Dobijene ćelije su kultivisane u ploči sa 24 bunara, u koncentraciji od 2×10^6 ćelija/ml u svakom bunaru. Nakon 2 h inkubacije, ćelije su isprane sa 3 x 1 ml sterilnog PBS, kako bi se uklonile ćelije koje nisu adherirale za podlogu. Preostale adherentne ćelije smatrane su peritonealnim makrofagima i korišćene su za tretman GYY4137 u trajanju od 60 min. Ćelije su inkubirane u prisustvu GYY4137 (200 µM) ili odgovarajućeg kontrolnog rastvarača DMSO (u kome je inicijalno rastvoren GYY4137), u prisustvu ili odsustvu stimulacije LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml). Nakon inkubacije ćelije su korišćene za određivanje produkcije ROS.

3.4.3. Dobijanje dendritiskih ćelija iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa

DC su diferencirane od ćelija dobijenih iz kostne srži C57BL/6 miševa. U tu svrhu su femuri, izolovani iz miševa, otvoreni na oba kraja i ćelije kostne srži oslobođene ispiranjem unutrašnjosti kosti sa 10 ml RPMI 10% FCS. Krvave trake razbijene su pipetiranjem i nakon toga je suspenzija ćelija centrifugirana na 500 g, 5 min. Talog ćelija je resuspendovan u 1 ml pufera za lizu eritrocita. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, reakcija liziranja je prekinuta sa 9 ml RPMI 10% FCS i suspenzija ćelija propuštena kroz konusnu najlonsku mrežicu promera 70 µm. Usledilo je ponovno centrifugiranje na 500 g, 5 min, resuspendovanje u medijumu za gajenje DC i brojenje ćelija. Ćelije su kultivisane u ploči sa 24 bunara u koncentraciji 1×10^6 ćelija/ml u svakom bunaru, u prisustvu 20 ng/ml GM-CSF. Kultivacija je trajala 8 dana, a neophodno je bilo vršiti promenu medijuma svakog 2., 4. i 6. dana kultivacije. Promena medijuma podrazumevala je uklanjanje polovine (500 µl) starog medijuma i dodavanje 500 µl svežeg medijuma, uz obogaćivanje koncentracije GM-CSF. S obzirom da se do 4.

dana kultivacije ćelije prenamnože, vršeno je razdvajanje ćelija datog dana. Za razdvajanje ćelija neophodno je bilo odvojiti ćelije od podloge, što se postiže blagim pipetiranjem. Nakon što se ćelije na ovaj način odlepe od podloge, 500 µl medijuma sa ćelijama je prenoseno u novi bunar, dok se ostatak medijuma nadoknadi sa 500 µl svežeg medijuma i odgovarajućom količinom GM-CSF. Kao maturacioni stimulus, koji će omogućiti sazrevanje dendritskih ćelija, korišćen je LPS (100 ng/ml). LPS je dodavan 7. dana kultivacije, a istovremeno sa LPS-om je primenjivan GYY4137 (200 µg/ml). Supernatanti i ćelije su sakupljeni 8. dana kultivacije. Pri sakupljanju ćelija korišćen je enzim akutaza, koji omogućava odlepljivanje ćelija od podloge bez njihovog oštećivanja. Ovako dobijene ćelije su korišćene za procenu vijabiliteta, izolaciju RNK, određivanje nivoa ekspresije površinskih molekula, fagocitoze i produkcije ROS, dok su supernatanti korišćeni za određivanje nivoa produkcije citokina.

3.4.4. Izolovanje i kultivacija ćelija poplitealnih limfnih čvorova DA pacova i C57BL/6 miševa

PLČ su izolovani iz DA pacova i C57BL/6 miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Životinje su žrtvovane 7. d.p.i. (u induktivnoj fazi bolesti) i ćelije su izolovane iz PLČ mehaničkom homogenizacijom tkiva. Homogenizacija je vršena protiskivanjem ćelija kroz konusnu najlonsku mrežicu promera 70 µm. Nakon centrifugiranja ovako dobijene ćelijske suspenzije (500g, 5 min), ćelije su resuspendovane u 2% RS RPMI ili 2% MS-e RPMI (medijum za kultivaciju pacovskih ili mišjih ćelija PLČ) i prebrojane. Za potrebe određivanja nivoa produkcije citokina, ćelije su kultivisane u ploči sa 24 bunara u koncentraciji 5×10^6 ćelija/ml u svakom bunaru. Ćelije su restimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ i inkubirane sa GYY4137 (200 µM), dok je kao kontrolni rastvarač korišćen DMSO. Nakon inkubacije od 24 h sakupljeni su supernatanti, koji su korišćeni za određivanje nivoa produkcije citokina, a ćelije su iskorišćene za procenu vijabiliteta. U nekim eksperimentima, ćelije izolovane iz limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije su iskorišćene za izolaciju CD4⁺ T limfocita. Za određen broj kontrolnih eksperimenata korišćeni su PLČ izolovani iz pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA. Za potrebe određivanja procenta Treg ili apoptoze citofluorimetrijom, ćelije PLČ su kultivisane u epruvetama za protočnu citofluorimetriju u koncentraciji 1×10^6 ćelija/0,5ml i inkubirane sa GYY4137 (200 µM) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Za potrebe određivanja kinetike efekta GYY4137 na procenat Treg mišje ćelije PLČ su inkubirane sa GYY4137 (200 µM) u trajanju od 40 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h. U nekim eksperimentima su mišje ćelije PLČ tretirane Na₂S (200 µM) ili "istrošenim" rastvorom GYY4137 (koji je dobijen inkubacijom standardnog rastvora GYY4137 u medijumu 7 dana na 37°C), u trajanju od 40 min. Za potrebe pojedinih eksperimenata su mišje ćelije PLČ, 15 min pre izlaganja GYY4137 (200 µM), tretirane vitaminom E (100 µM) ili deferoksaminom (100 µM), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 55 min. Mišje ćelije PLČ su takođe tretirane GYY4137 (200 µM) u prisustvu ili odsustvu MG132 (10µM), u trajanju od 4h. U nekim eksperimentima su ćelije PLČ 15 min pre izlaganja GYY4137 (200 µM) tretirane PD98059 (40 µM), Ly294002 (40 µM) ili rapamicinom (100 ng/ml) do isteka ukupnog vremena inkubacije od 2h. Mišje ćelije PLČ su takođe tretirane SB203580 (40 µM), bez prisustva GYY4137 u trajanju od 2h. Za potrebe određivanja procenta Th1 i/ili Th17 limfocita citofluorimetrijom, ćelije PLČ su kultivisane u epruvetama za protočnu citofluorimetriju u koncentraciji 1×10^6 ćelija/0,5ml i inkubirane sa GYY4137 (200 µM) u trajanju od 40 min, a zatim stimulisane koktelom za stimulaciju ćelija koji sadrži jonomicin (1,3 µM), PMA (81 nM), brefeldin A (10,6 µM) i monensin (2 µM), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 4,5h ili 16h. U nekim eksperimentima ćelije PLČ su kultivisane u odsustvu DMSO (0), kako bi se odredilo da li sam DMSO ostvaruje neki efekat na ćelije.

3.4.5. Izolacija i kultivacija imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova

Imunske ćelije su izolovane iz kičmenih moždina pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA. Životinje su žrtvovane na piku bolesti (12-14 d.p.i.) i perfundovane hladnim fiziološkim rastvorom, kako bi se uklonile ćelije prisutne u krvnim sudovima kičmene moždine. Nakon perfuzije, iz životinja su izolovane kičmene moždine i homogenizovane u rastvoru 3% FCS PBS, protiskivanjem kroz metalne mrežice. Dobijena suspenzija je centrifugirana (800 g, 3 min), supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 3 ml 30% Perkola i pažljivo naliven na 2,5 ml 70% Perkola. Za pravljenje izotoničnih koncentracija Perkola je korišćen početni koncentrovani rastvor Perkola, koji je dobijen mešanjem 9 zapremina Perkola i 1 zapremina 10 x koncentrovanog PBS. Nakon centrifugiranja u trajanju od 50 min na 850 g, uočavaju se imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine u vidu belog prstena na površini dodira dva perkola različitih gustina. Ćelije iz prstena su pažljivo sakupljene, a zatim oprane od ostatka perkola u PBS. Nakon centrifugiranja na 900 g, 10 min, ćelije su resuspendovane u 5% FCS RPMI i prebrojane. Za potrebe određivanja nivoa produkcije citokina, ćelije su kultivisane u ploči sa 24 bunara, u koncentraciji $2,5 \times 10^6$ ćelija/ml u svakom bunaru i tretirane GYY4137 (200 μ M), a kao kontrolni rastvarač korišćen je DMSO. Nakon inkubacije od 24 h, sakupljeni su supernatanti, koji su iskorišćeni za određivanje nivoa produkcije citokina. U nekim eksperimentima, izolovane imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine su iskorišćene za izolaciju CD4⁺ T limfocita. Za potrebe određivanja procenta Treg citofluorimetrijom, imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine su kultivisane u epruветama za protočnu citofluorimetriju u koncentraciji 1×10^6 ćelija/0,5ml i inkubirane sa GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Za potrebe određivanja procenta Th17 limfocita citofluorimetrijom, imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine su kultivisane u epruветama za protočnu citofluorimetriju u koncentraciji 1×10^6 ćelija/0,5ml i inkubirane sa GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 40 min, a zatim stimulisane koktelom za stimulaciju ćelija koji sadrži jonomicin (1,3 μ M), PMA (81 nM), brefeldin A (10,6 μ M) i monensin (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 4,5h. U nekim eksperimentima ove ćelije su kultivisane u odsustvu DMSO (0), kako bi se odredilo da li sam DMSO ostvaruje neki efekat.

3.4.6. Prečišćavanje CD4⁺ T limfocita magnetnom separacijom

Za potrebe nekih eksperimenata iz populacije imunskih ćelija izolovanih iz PLČ ili kičmenih moždina pacova su prečišćeni CD4⁺ T limfociti metodom magnetne separacije. Izolovane imunske ćelije su nakon brojanja prebačene u plastične tube od 2 ml (Sarstedt, Numbreht, Nemačka), oprane u PBS i resuspendovane u hladnom puferu za obeležavanje ćelija antitelima (3% FCS PBS). Ukoliko je bilo dovoljno ćelija, 70×10^6 ćelija je resuspendovano u 800 μ l pufera za obeležavanje ćelija antitelima i dodato je 10 μ l anti-CD4 antitela obeleženog biotinom (eBioscience, San Dijego, SAD). Ako je izolovano manje od 70×10^6 ćelija, zapremina pufera i antitela je proporcionalno prilagođena broju ćelija. Ćelije su inkubirane 15 min na ledu uz povremeno mućkanje. Nakon toga, ćelije su jednom oprane sa 1 ml hladnog PBS i jednom sa 1 ml hladnog pufera za magnetne kuglice (0,5% BSA, 2 mM EDTA PBS). Ćelije su potom finalno resuspendovane u 800 μ l pufera za magnetne kuglice i dodato im je 40 μ l magnetnih kuglica obeleženih streptavidinom (ukoliko je početni broj ćelija bio manji od 70×10^6 , zapremina pufera i magnetnih kuglica je proporcionalno prilagođena). Ćelije su inkubirane sa magnetnim kuglicama 30 min, na ledu, uz povremeno mućkanje. Potom je ćelijska suspenzija izlagana magnetnom polju u trajanju od 8 min. Nakon isteka ovog vremena, magnetne kuglice se, usled delovanja magnetnog polja, prilepljuju za zidove plastične tube, povlačeći sa sobom i CD4⁺ limfocite obeležene antitelom, koje su vezane za kuglice interakcijom streptavidin-biotin. Rastvor iz plastične tube se pažljivo odstrani dok je tuba još u magnetnom polju, a magnetne kuglice koje se nalaze

prilepljene uz zidove tube se ponovo resuspenduju u 800 μ l pufera za magnetne kuglice. Inkubacija u magnetnom polju je ponavljana još dva puta u trajanju od 6 min, kako bi se dobio veći stepen čistoće CD4⁺ T limfocita. Čelije su zatim oprane jednom u 5% FCS RPMI, finalno resuspendovane u istom medijumu i prebrojane. CD4⁺ T limfociti su potom kultivisani u prisustvu GYY4137 (200 μ M) i korišćeni za fenotipsku karakterizaciju, određivanje nivoa produkcije ROS i izolaciju ukupnih protein za analizu Western Blot-om. Za potrebe određivanja procenta Treg citofluorimetrijom, određivanja produkcije ROS i izolacije ukupnih proteina CD4⁺ T limfociti su kultivisani u epruветama za protočnu citofluorimetriju ili tubama od 2ml, u koncentraciji 1 x 10⁶ ćelija/0,5ml i inkubirani sa GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Za potrebe određivanja procenta Th17 limfocita citofluorimetrijom, CD4⁺ T limfociti su kultivisani u epruветama za protočnu citofluorimetriju u koncentraciji 1 x 10⁶ ćelija/0,5ml i inkubirani sa GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 40 min, a zatim stimulisani koktelom za stimulaciju ćelija koji sadrži jonomicin (1,3 μ M), PMA (81 nM), brefeldin A (10,6 μ M) i monensin (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 4,5 h.

3.4.7. Određivanje broja ćelija

Broj ćelija je određivan brojanjem živih ćelija pod mikroskopom. Izolovane ćelije su resuspendovane u rastvoru PBS sa 0,1% tripan plavog u odnosu 1:10, nanesene na komoru po Burker-Turk-u i brojane pod mikroskopom. Žive ćelije su od mrtvih razlikovane na osnovu toga što tripan plavo prolazi kroz ćelijsku membranu narušenog integriteta, na taj način bojeći mrtve ćelije u plavo. Broj živih ćelija je određivan po sledećoj formuli: broj ćelija/broj polja x 2,5, koja daje broj ćelija po ml suspenzije.

3.5. Metode za ispitivanje funkcije ćelija imunskog sistema

3.5.1. Određivanje vijabilnosti ćelija testom Kristal violet

Vijabilnost adherentnih BV2 ćelija je određivana testom Kristal violet (od *engl.* Crisatl Violet, CV). Test je rađen u ploči sa 24 bunara u kojoj su gajene ćelije, nakon završetka tretmana od 24 h. Posle sakupljanja supernatanta, bunari su jednom oprani sa po 1 ml PBS, u cilju uklanjanja mrtvih, neadheriranih ćelija. Kako bi se ćelije fiksirale za dno bunara, u bunare je dodato po 300 μ l 100% metanola. Nakon 10 min, metanol je odlivan, a ploča ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Zatim je u bunare dodavano po 300 μ l 0,1% rastvora CV i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi. Ploča je potom dobro isprana od viška boje u hladnoj vodi i ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Boja je rastvorena dodavanjem 300 μ l 33% rastvora sirćetne kiseline u svaki bunar. Iz svakog bunara je potom u triplicatima razliveno po 70 μ l u mikrotitar ploču. Apsorbanca je očitana na spektrofotometru (LKB 5060-006, LKB, Vienna, Austria), na talasnoj dužini 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Izmerene apsorbance su odgovarale intenzitetu boje, a intenzitet boje je odgovarao relativnom broju živih ćelija koje su adherirane za podlogu, odnosno vijabilitetu ćelija. Na taj način se na osnovu očitanih apsorbanci može zaključiti o vijabilitetu ćelija.

3.5.2. Određivanje vijabilnosti ćelija testom MTT

Određivanje vijabiliteta ćelija kolorimetrijskim MTT testom se zasniva na proceni metaboličkog vijabiliteta koji odgovara intenzitetu boje nerastvornih ljubičastih kristala formazana, nastalih

redukcijom tetrazolijumove soli MTT delovanjem mitohondrijskih oksidoreduktaza. Za potrebe određivanja metaboličke vijabilnosti testom MTT, BV2 ćelije su kultivisane u pločama sa 96 bunara i inkubirane sa GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 24h. MTT test rađen je u ploči u kojoj su BV2 ćelije gajene. Nakon 24h tretmana, odlivan je supernatant, a na ćelije u ploči je dodavano 100 μ l 0,5 mg/ml rastvora MTT u medijumu za kultivisanje ćelija. Ploče su inkubirane 30min – 1h na 37°C, odnosno do formiranja ljubičaste boje. Nakon toga je preostali rastvor MTT odliven, a kristali formazana su rastvoreni dodavanjem 100 μ l DMSO. Apsorbanca rastvora je očitana na spektrofotomeru na talasnoj dužini od 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao A_{540} .

Adherentne dendritske ćelije i neadherentne ćelije PLČ su za potrebe testa MTT sakupljene u plastične tube od 1,5 ml i centrifugirane (500 g, 3min). Supernatant je potom odliven, a ćelije resuspendovane u 300 μ l 0,5 mg/ml rastvora MTT u medijumu za kultivisanje ćelija. Nakon inkubacije na 37°C i formiranja kristala formazana, ćelijska suspenzija je ponovo centrifugirana (500 g, 3 min), supernatant odliven, a obojeni ćelijski talog resuspendovan u 200 μ l DMSO i razliven u triplikatima (po 50 μ l) u mikrotitar ploče. Apsorbanca rastvora je očitana na spektrofotomeru na talasnoj dužini od 540 nm, uz korekciju na 690 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao A_{540} .

3.5.3. Merenje produkcije citokina metodom ELISA

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura je određivana metodom ELISA. ELISA je rađena u mikrotitar MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska) pločama sa 96 bunara, a za određivanje koncentracije citokina su korišćeni komercijalni parovi sledećih antitela: mišjeg IL-6 (dobavljen od Abcam, Kembridž, Masačusets, SAD), mišjeg TNF (eBioscience), mišjeg TGF- β (eBioscience) mišjeg/pacovskog IL-17 (eBioscience), mišjeg IFN- γ (eBioscience) i pacovskog IFN- γ (R&D Systems, Mineapolis, SAD). Prvi korak je podrazumevao oblaganje bunarića ploča primarnim antitelom rastvorenim u PBS, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača. Nakon prekonoćne inkubacije u primarnom antitelu, bunarići ploča su tri puta ispirani sa 0,05% rastvorom Tween 20 u PBS (tPBS). Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela za ploču postignuto je inkubacijom bunarića u sledećim rastvorima: PBS 10% FCS (TNF, IL-17, mišji IFN- γ), PBS 5% Tween 20 (TGF- β), tPBS 1% BSA (IL-6) ili PBS 1% BSA, 5% saharoza (pacovski IFN- γ). Inkubacija u rastvorima za blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela trajala je 1h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja ploča 3 x tPBS, u bunariće su u duplikatima nalivani supernatanti ćelijskih kultura i standardi (50 μ l po bunariću) i inkubirani 2h na sobnoj temperaturi. Supernatanti u kojima je određivana koncentracija TGF- β zahtevali su posebnu pripremu pre nalivanja u ploču. Ova priprema je podrazumevala inkubaciju sa 1M rastvorom HCl u odnosu 5:1 u trajanju od 10 min, a zatim mešanje ovako dobijenog rastvora sa rastvorom 1,2 M NaOH, 0,5 M Hepes u odnosu 6:1. Po isteku inkubacije uzoraka, ploče su oprane (3 x tPBS), a zatim je naliveno sekundarno antitelo obeleženo biotinom, rastvoreno u odgovarajućem rastvoru za blokiranje, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača. Inkubacija u rastvoru sekundarnog antitela je trajala 1h, nakon čega su bunarići ponovo ispirani (3 x tPBS). Sledeći korak je podrazumevao dodavanje avidina konjugovanog HRP, rastvorenog u odgovarajućem rastvoru za blokiranje. Posle inkubacije od 30 min u rastvoru avidina, ploče su ponovo oprane (3 x tPBS), a zatim je u bunariće dodato po 50 μ l TMB, supstrata peroksidaze. Enzimaska reakcija transformacije supstrata dovodi do formiranja plave boje, koja je predstavljala signal za prekid reakcije dodavanjem po 50 μ l 1 M rastvora HCl u bunariće. Dodavanjem HCl dolazi do formiranja žute boje. Apsorbanca rastvora je očitava na spektrofotomeru na talasnoj dužini od 450 nm, uz korekciju na 690 nm. Koncentracija citokina (ng/ml) u supernatantima je izračunata pomoću standardnih krivi koje su konstruisane na

osnovu rastvora poznatih koncentracija odgovarajućih rekombinantnih citokina (standarda). Donji limit detekcije je bio 30 pg/ml, dok je gornji limit bio 10 ng/ml.

3.5.4. Metoda reakcije lančanog umnožavanja

3.5.4.1. Izolovanje ukupne RNK

Uzorci koji su bili namenjeni za izolaciju ukupne RNK su resuspendovani u 500 μ l trizola i čuvani na -20°C do izolacije. Prvi korak u izolaciji ukupne RNK podrazumevao je dodavanje 100 μ l hladnog hloroforma u svaki uzorak, vorteksiranje do formiranja mlečne suspenzije i sledstveno centrifugiranje (12 000 g, 20 min, +4°C). Od ovog koraka uzorci su sve vreme držani na ledu. Nakon centrifugiranja su se mogle uočiti tri faze: donja organska koja je sadržala proteine uzorka, srednji beličasti prsten koji je sadržao DNK uzorka i gornja bezbojna faza u kojoj se nalazila ukupna RNK uzorka. Ova bezbojna faza je sakupljena i prebačena u plastične tube od 1,5 ml, u koje je prethodno dodato 250 μ l izopropanola. Nakon inkubacije na -20°C, 30 min, uzorci su ponovo centrifugirani (12 000 g, 20 min, +4°C), supernatant odliven, a precipitirani talog RNK rastvoren u 500 μ l 70% etanola. Usledilo je centrifugiranje na 12 000 g, 5 min i odlivanje etanola, dok je talog RNK sušen i finalno resuspendovan u 11 μ l vode bez nukleaza (*engl.* RNase-Free Water). Koncentracija RNK (μ g/ μ l) u uzorcima je određivana očitavanjem na spektrofotomeru (Nanophotometer, IMPLEN, SAD) Nanodrop, a na osnovu ove koncentracije je određivana ukupna količina (μ g) RNK u uzorcima. Takođe, meren je i odnos apsorbanca A260/A280, koji govori o čistoći uzoraka.

3.5.4.2. Reakcija reverzne transkripcije

Reakcijom reverzne transkripcije se izolovana RNK prevodi u cDNK. Za ovu reakciju su korišćene jednake količine RNK (1-3 μ g) iz svakog uzorka, koje su rastvorene u finalnoj zapremini od 11,5 μ l. U svaki uzorak je zatim dodat po 1 μ l nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Viljus, Litvanija) i inkubiran 5 min na 70°C. Nakon toga su uzorci 2 min držani na ledu, a potom je u svaki uzorak dodavano po 7,5 μ l rastvora koji je po uzorku sadržao: 4 μ l koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju, 0,5 μ l inhibitora RNaza, 2 μ l smeše dNPT (10 mM) i 1 μ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (svi dobavljeni od Fermentas). Finalna zapremina smeše je bila 20 μ l. Reakcija reverzne transkripcije je nastavljena inkubacijom 10 min na 25°C, a potom 60 min na 42°C. Reakcija je prekinuta inkubacijom 10 min na 70°C i 3 min na 95°C. Uzorci cDNK su do dalje upotrebe čuvani na +4°C.

3.5.4.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-time qPCR, *engl.* Real-time Polymerase Chain Reaction) omogućava analizu relativne promene nivoa transkripcije iRNK gena od interesa. U ploče sa 96 bunarića za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, SAD) je nalivano po 8 μ l reakcione smeše za PCR. Reakcione smeše su nalivane u duplikatu za svaki uzorak, pri čemu su postojale dve različite reakcione smeše za svaki uzorak: jedna za gen od interesa, a druga za referentni gen (β -aktin). Reakcione smeše za kvantitativni PCR su po uzorku sadržale: 5 μ L

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 1 μ l specifičnih prajmera za gen od interesa ili za referentni gen (Forward i Reverse, Metabion, Štajnkirhen, Nemačka, sekvence prikazane u Tabeli 1) i 2 μ l dejonizovane vode. Nakon nalivanja reakcionih smeša, u svaki bunarić je naliveno po 2 μ l odgovarajućeg uzorka cDNK, koji je prethodno razblažen 5 x u dejonizovanoj vodi. Ploča je zatim pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, SAD), centrifugirana (1 min, 1000 g) i prenošena u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije su bili sledeći: 10 min na 95°C, a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali korake od 15s na 95°C i 60s na 60°C. Analiza dobijenih rezultata vršena je pomoću odgovarajućeg kompjuterskog programa (7500 System software), obezbeđenog od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Vrednosti relativnih promena ekspresije gena su određivane u odnosu na referentni gen β -aktin i iskazane kao $2^{-\Delta C_t}$, gde je ΔC_t razlika između C_t vrednosti gena od interesa i referentnog gena.

Tabela 1. Sekvence prajmera korišćenih u kvantitativnoj reakciji lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Sekvenca (5'-3')
β-aktin
5'-CCA GCG CAG CGA TAT CG-3'
5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT-3'
TNF
5'-CCA CGT AGC AAA CCA C-3'
5'-TGG GTG AGG AGC ACG TAG T-3'
iNOS
5'-CTG CAG CAC TTG GAT CAG GA-3'
5'-GCC AGA AAC TTG GGA AGG GA-3'
Arg1
5'-CCT GCT GTC CTG TGA TAC CC-3'
5'-CGG CTG TGC ATC ATA CAA CG-3'
IDO
5'-TGG GCT TTG CTC TAC CAC AT-3'
5'-GGC AGC ACC TTT CGA ACA TC-3'
IL-27
5'-GCC AGG ACA CTT GGG ATG AC-3'
5'-GCC AGG ACA CTT GGG ATG AC-3'
IL-10
5'-TGT GAA AAT AAG AGC AAG GCA GTG-3'
5'-CAT TCA TGG CCT TGT AGA CAC C-3'
TGFβ
5'-GAC CCT GCC CCT ATA TTT GGA-3'
5'-CGC CCG GGT TGT GTT G-3'

3.5.5. Merenje produkcije azot-monoksida

Nivo produkovanog azot-monoksida (NO) u supernatantima ćelijskih kultura je određivan Grisovom reakcijom, koja se zasniva na određivanju koncentracije nitrita (NO_2^-) kao indikatora produkcije NO. Supernatanti ćelijskih kultura su naliveni u triplikatima u mikrotitar ploče sa 96 bunara (50 μl po bunaru) i pomešani sa jednakom zapreminom Grisovog reagensa (1:1 rastvor 0.1% naftiletildiamin dihidrohlorida i 1% sulfanilamida u 5% H_3PO_4). Apsorbanca dobijenog rastvora je merena na spektrofotometru na talasnoj dužini 570 nm, uz korekciju na 690 nm. Koncentracija nitrita je izračunata na osnovu standardne krive, dobijene očitavanjem apsorbanci rastvora nitrita poznate koncentracije.

3.5.6. Citofluorimetrija

3.5.6.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula

Ekspresija površinskih molekula na BV2 ćelijama, dendritskim ćelijama i ćelijama izolovanim iz PLČ i kičmenih moždina je određivana metodom imunofluorescencije pomoću protočnog citofluorimetra. Na BV2 ćelijama je ispitivana ekspresija CD40 i CD86, na dendritskim ćelijama ekspresija MHC II, CD40 i CD80, a na ćelijama izolovanim iz PLČ i kičmenih moždina ekspresija CD4 i CD25. Nakon 24h inkubacije sa GYY4137, BV2 ćelije i dendritske ćelije su sakupljene i 5×10^5 ćelija je raspoređeno u epruvete za protočnu citofluorimetriju, dok su ćelije izolovane iz PLČ i kičmenih moždina prethodno kultivisane u epruvetama za protočnu citofluorimetriju. Ćelijska suspenzija je centrifugirana (800g, 3 min) i resuspendovana u 50 μl rastvora antitela, koncentracije preporučene od strane proizvođača. (korišćena antitela su prikazana u Tabeli 2). Antitela su rastvarana u 1% BSA PBS. Nakon inkubacije 45 min na $+4^\circ\text{C}$, ćelije su dva puta oprane u PBS-u. BV2 ćelije i dendritske ćelije su centrifugirane (800 g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 ml PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru. Ćelije izolovane iz poplitealnih limfnih čvorova i kičmenih moždina su dalje imunofluorescentno bojene na unutarćelijske molekule, po protokolu opisanom u nastavku.

3.5.6.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula

U imunskim ćelijama izolovanim iz PLČ i kičmenih moždina je određivana ekspresija sledećih unutarćelijskih molekula: transkripcionog faktora FoxP3 i citokina IL-17 i IFN- γ . Ukoliko je određivana ekspresija FoxP3 transkripcionog faktora, ćelije su nakon imunofluorescentnog bojenja na površinske molekule, oprane 2 x PBS i preko noći inkubirane u 100 μl komercijalnog rastvora za fiksaciju i permeabilizaciju. Usledilo je ispiranje dva puta u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju i inkubacija 1h na $+4^\circ\text{C}$ u rastvoru FoxP3 antitela odgovarajuće koncentracije. Potom su ćelije ponovo isprane dva puta u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju, centrifugirane (800g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Ukoliko je određivana ekspresija IL-17 ili IFN- γ , ćelije su nakon imunofluorescentnog bojenja na površinske molekule, oprane 2 x PBS i inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi u komercijalnom puferu za fiksaciju ćelija. Usledilo je pranje 1 x PBS i finalno resuspendovanje u 1 ml PBS. Narednog dana ćelije su centrifugirane (800g, 3min) i resuspendovane u 50 μl rastvora IL-17 ili IFN- γ antitela odgovarajuće koncentracije. Nakon inkubacije 1h na $+4^\circ\text{C}$, ćelije su isprane dva puta u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju, centrifugirane (800g, 3 min), finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na

protočnom citofluorimetru. Za imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula korišćena antitela prikazana u Tabeli 2, koja su rastvarana u u komercijalnom rastvoru za permeabilizaciju.

Tabela 2. Antitela korišćenja u imunofluorescentnom bojenju površinskih i unutarćelijskih molekula

Specifičnost antitela	Fluorescentna boja s kojom je konjugovano antitelo	Proizvođač	Tip bojenja
Anti-mišje CD40	FITC	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje MHC II	PE	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje CD86	PE-Cy5	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje CD80	PE-Cy5	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje CD4	FITC	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje CD25	PE	eBioscience	Površinsko
Anti-pacovsko CD4	FITC	eBioscience	Površinsko
Anti-pacovsko CD25	PE	eBioscience	Površinsko
Anti-mišje/pacovsko FoxP3	PerCP-Cy5.5	eBioscience	Unutarćelijsko
Anti-mišje IFN- γ	PerCP-Cy5.5	eBioscience	Unutarćelijsko
Anti-mišje/pacovsko IL-17	PerCP-Cy5.5	eBioscience	Unutarćelijsko

3.5.6.3. Merenje nivoa fagocitoze

Nivo fagocitoze određivan je metodom protočne citofluorimetrije u BV2 ćelijama i DC nakon 24h inkubacije sa GYY4137. Ćelijama je u ploče sa 24 bunarića dodavano 500 μ l rastvora fluorescentno obeleženih kuglica za fagocitozu u odgovarajućoj koncentraciji, nakon čega su ćelije inkubirane 1h u ovom rastvoru. Pre dodavanja ćelijama, fluorescentno obeležene kuglice su preopsonizovane inkubacijom u 50% FCS PBS, 1h na 37°C. Nakon isteka inkubacije ćelija sa rastvorom kuglica za fagocitozu, ovaj rastvor je uklonjen, a ćelije su oprane 2 x PBS i inkubirane sa 300 μ l dva puta razblaženog rastvora tripan plavog u cilju gašenja fluorescence koja potiče od kuglica koje su se zalepile na površinu samih ćelija. Nakon 2 min inkubacije u rastvoru tripan plavog, ćelije su oprane 2 x PBS, skinute s podloge, finalno resuspendovane u 2 ml PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

3.5.6.4. Merenje nivoa apoptoze

Nivo apoptoze određivan je u BV2 ćelijama, ćelijama PLČ i CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz populacije ćelija PLČ metodom protočne citofluorimetrije pomoću proteina aneksina V konjugovanog FITC-om, koji se vezuje za fosfatidilserin na površini membrane ćelija u apoptozi. BV2 ćelije su nakon 24h inkubacije sa GYY4137 skinute s podloge, prebačene u epruvete za protočnu citofluorimetriju (1 x 10⁶ ćelija/epruveti), centrifugirane (600g, 3 min) i resuspendovane u 100 μ l ABB, u koji je dodat aneksin V-FITC u odgovarajućoj koncentraciji. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodato još 900 μ l ABB, i zatim su analizirani na protočnom citofluorimetru. Ćelije PLČ i CD4⁺ T limfociti prečišćeni iz populacije ćelija PLČ su nakon 40 min inkubacije sa GYY4137 i

površinskog bojenja na CD4 i CD25, oprani 2 x PBS i resuspendovani u 100 µl ABB sa odgovarajućom koncentracijom aneksina V-FITC. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodato još 900 µl ABB, i zatim su analizirani na protočnom citofluorimetru.

3.5.6.5. Merenje produkcije ROS

Nivo produkcije ROS određivan je u BV2 ćelijama, DC i CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz populacije ćelija PLČ metodom protočne citofluorimetrije pomoću dihidrorodamina 123 (DHR), koji oksidacijom prelazi u fluorescentni oblik rodamin 123. BV2 ćelije su u trajanju od 10 min, 30 min, 60 min ili 24h inkubirane sa GYY4137 u prisustvu stimulacije LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml), a zatim inkubirane sa rastvorom DHR odgovarajuće koncentracije 20 min i stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min. Alternativno, BV2 ćelije su tretirane GYY4137 u trajanju od 10 min, 30 min, 60 min ili 24h bez prisustva stimulacije, inkubirane sa rastvorom DHR odgovarajuće koncentracije 20 min i stimulisane PMA-om (100ng/ml) ili LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml) narednih 90 min. DC su nakon 24h inkubacije sa GYY417 inkubirane sa rastvorom DHR odgovarajuće koncentracije 20 min i stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min. CD4⁺ T limfociti prečišćeni iz populacije ćelija PLČ su tretirane GYY4137 u ukupnom trajanju od 60 min, pri čemu je poslednjih 40 min tretmana ćelijama dodat DHR i stimulacija u vidu PMA (100 ng/ml). Nakon toga, CD4⁺ T limfociti su inkubirani sa fluorescento obeleženim antitelima na CD25 u trajanju od 45 min. Nakon isteka inkubacije, BV2 ćelije, DC i CD4⁺ T limfociti su oprani 2 x PBS, finalno resuspendovani u 2 ml PBS i analizirani na protočnom citofluorimetru. U nekim kontrolnim eksperimentima umesto DHR je kao detektor ROS korišćen 2',7'-dihlorofluorescein-diacetat (DCFDA). DHR i DCFDA su rastvarani u odgovarajućem medijumu za kultivaciju ćelija u koncentraciji od 5 µM.

3.5.6.6. Detekcija fluorescencije

Intenzitet fluorescencije je detektovan na CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analiziran programom FlowMax (Partec, GmbH, Münster, Nemačka). U cilju razlikovanja živih od mrtvih ćelija i debrisa dobijeni signal je ograničavan korišćenjem Forward scatter - FSC i Side scatter – SSC, a u cilju isključivanja dubleta i multiplleta iz analize korišćen je FSC-W. Granice pozitivnosti ćelijskih markera su određivane na osnovu odgovarajućih izotipskih kontrola, kao i negativnih kontrola, koje su predstavljale odgovarajuće ćelije inkubirane bez prisustva antitela. Procenat ćelija koje su bile obojene antitelima izotipske kontrole bio je manji od 1%. Rezultati su prikazivani kao procenat pozitivnih ćelija ili srednji intenzitet fluorescencije (*engl.* mean fluorescence intensity, mfi).

3.5.7. Analiza ćelija u realnom vremenu

Promena u interakciji ćelija s podlogom, koja odražava promene u aktivacionom statusu, morfologiji, proliferaciji i vijabilnosti ćelija, može biti detektovana kao promena otpora pomoću xCELLigence RTCA DP analizatora (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Za potrebe ovakve analize ćelija u realnom vremenu (*engl.* Real-time cell analysis, RTCA), BV2 ćelije su postavljene u koncentraciji od $2,5 \times 10^4$ ćelija/bunaru u ploče E-Plate 16 (Roche Diagnostics) i nakon 24h inicijalne adherencije, inkubirane sa GYY4137 (200 µM) ili odgovarajućim kontrolnim rastvaračem (DMSO) i stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN-γ (10 ng/ml). Nakon dodavanja GYY4137 u kulturu, merenje otpora vršeno

je na svakih 15s tokom prvih 2h kultivacije i zatim na svakih 15 min preko noći. Detektovane promene otpora su izražene kao kombinovani ćelijski indeks.

3.5.6. Western blot

Relativni nivo ekspresije ili relativni nivo aktivacije proteina je određivan u CD4⁺ T limfocitima, koji su magentnom separacijom prečišćeni iz populacije ćelija PLČ, metodom Western blot. CD4⁺ T limfociti su nakon 40 min tretmana GYY4137 centrifugirani (2000g, 3 min) i iz njih su izolovani ukupni proteini liziranjem ćelija u 100 µl pufera za lizu za Western blot, kome je prethodno dodat koktel inhibitora proteaza. Ovako dobijeni uzorci proteina su mešani u odnosu 3:1 sa 4x koncentrovanim SDS puferom za nalivanje na gel za elektroforezu, a zatim inkubirani 5 min na 95°C. Nakon toga uzorci su nanošeni na 12% SDS poliakrilamidni gel za elektroforezu, postavljen u sistemu za elektroforezu (Biometra). Razdvajanje proteina uzoraka elektroforezom je vršeno pri jačini struje od 25 mA u koncentrujućem gelu i 30 mA u gelu za razdvajanje. Pored uzoraka na gel su nalivani i proteinski markeri poznatih molekulskih masa (PageRuler, Termo Fisher Scientific). Po završenoj elektroforezi, izvršen je transfer proteina sa gela na polivinildifluoridnu membranu pomoću polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka), pri jačini struje od 5 mA/cm² gela. Radi detekcije proteina od interesa, nespecifično vezivanje antitela za membranu je sprečeno blokiranjem membrane PBS-om sa 0,1% Tween-20 (PBSTw), 5% BSA ili TBS-om sa 0,1% Tween-20 (TBSTw), 5% BSA, u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi. Zatim je membrana preko noći inkubirana na +4°C sa odgovarajućim primarnim antitelima, rastvorenim u PBSTw 1% BSA ili TBSTw 1% BSA, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača. Sledećeg dana je membrana oprana 5 x 5 min u rastvoru PBSTw ili TBSTw i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom specifičnim za konstantni region primarnog antitela i konjugovanim peroksidazom poreklom iz rena (*engl.* Horse radish peroxidase, HRP). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrana je ponovo ispirana 5 x 5 min u rastvoru PBSTw ili TBSTw. Usledila je inkubacija membrane sa Immobilon hemiluminiscentnim supstratom za HRP (Millipore, Bilerika, Masačusets, SAD), nakon čega je vizuelizacija specifičnih proteinskih traka izvođena upotrebom fotografskog filma (Kodak, Ročester, Njujork, SAD). Količina proteina je određivana denzitometrijski pomoću softverskog programa ImageJ. Relativni nivo ekspresije proteina je određivan u odnosu na nivo ekspresije β-aktina, a relativni nivo aktivacije proteina kao odnos ukupne i fosforilisane forme ispitivanog proteina. Za detekciju proteina su korišćena primarna antitela i sekundarna antitela prikazana u Tabeli 3.

Tabela 3. Antitela korišćena za detekciju proteina u metodi Western blot

Primarno antitelo	Poreklo	Razblažnje	Proizvođač
Anti-S6K	Zec	1:600	Cell Signaling Technology, Denvers, Masačusets, SAD
Anti-pS6K	Zec	1:600	Cell Signaling Technology
Anti-Akt	Zec	1:600	Cell Signaling Technology
Anti-pAKt	Zec	1.600	Cell Signaling Technology
Anti-β-aktin	Miš	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-FoxP3	Zec	1:600	eBioscience
Sekundarno antitelo	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
Anti-mišje, obeleženo	Koza	1:5000	Invitrogen

peroksidazom rena

Anti-zečje, obeleženo

Magarac

1:3000

Cell Signaling Technology

peroksidazom rena

3.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati su u ovoj doktorskoj disertaciji prikazani kao srednje vredosti + standardna devijacija (SD), dobijene iz više nezavisnih eksperimenata. Analiza statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti vršena je pomoću Studentovog t-testa i two-way ANOVA testa sa Tukey testom višestrukog poređenja. Svi testovi su urađeni pomoću softverskog paketa Graphpad Prism 7 (Graphpad, San Diego, SAD). Vrednost parametra p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

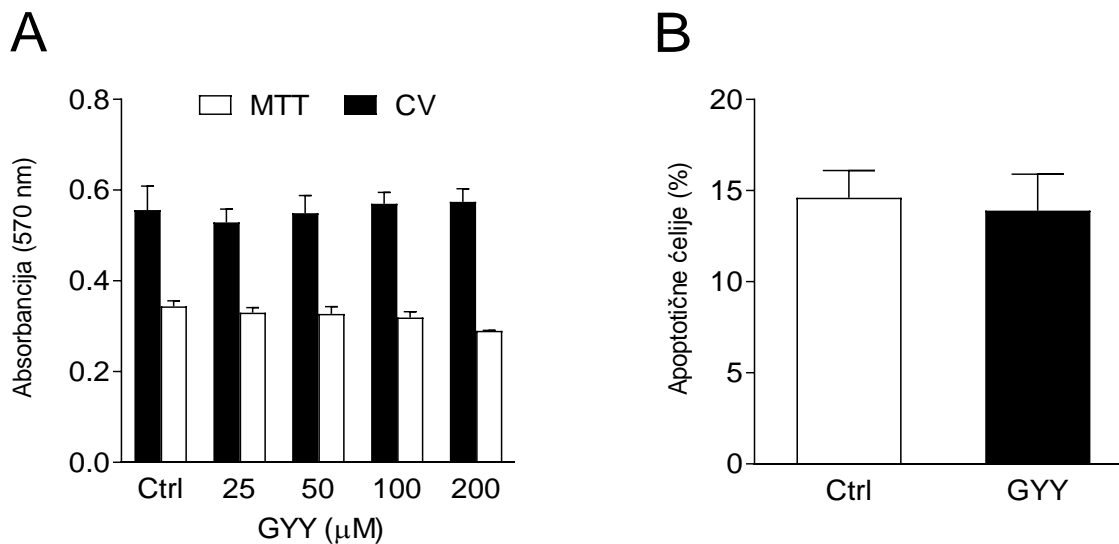
4. Rezultati

4.1. Imunomodulacijski efekat *in vitro* primene GYY4137 na aktivirane BV2 ćelije

4.1.1. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija

S obzirom na to da mikroglija prezentacijom antigena, reaktivacijom mijelin-specifičnih T limfocita i produkcijom medijatora inflamacije ostvaruje značajnu ulogu u efektorskoj fazi EAE-a, jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio ispitivanje uticaja GYY4137 na fenotip i funkciju BV2 ćelijske linije mikroglije. U tu svrhu su na BV2 ćelije primenjene različite koncentracije GYY4137 (25, 50, 100, 200 μM) u trajanju od 24h, uz simultanu stimulaciju LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml). Nakon isteka vremena inkubacije različitim testovima (MTT i CV) je određivana vijabilnost ćelija, a zatim je odabrana najviša koncentracija koja ne utiče na vijabilnost, u kojoj je dalje ispitivan efekat GYY4137 na funkciju i fenotip BV2 ćelija.

Rezultati testova MTT i CV su pokazali da GYY4137 ni u jednoj od primenjenih koncentracija ne utiče na vijabilnost BV2 ćelija (Slika 2A). Odsustvo efekta na vijabilnost potvrđeno je bojenjem ćelija aneksinom V i analizom na protočnom citofluorimetru, koja je pokazala da GYY4137 primenjen u koncentraciji od 200 μM ne dovodi do povećanja procenta ćelija u apoptozi (Slika 2B).



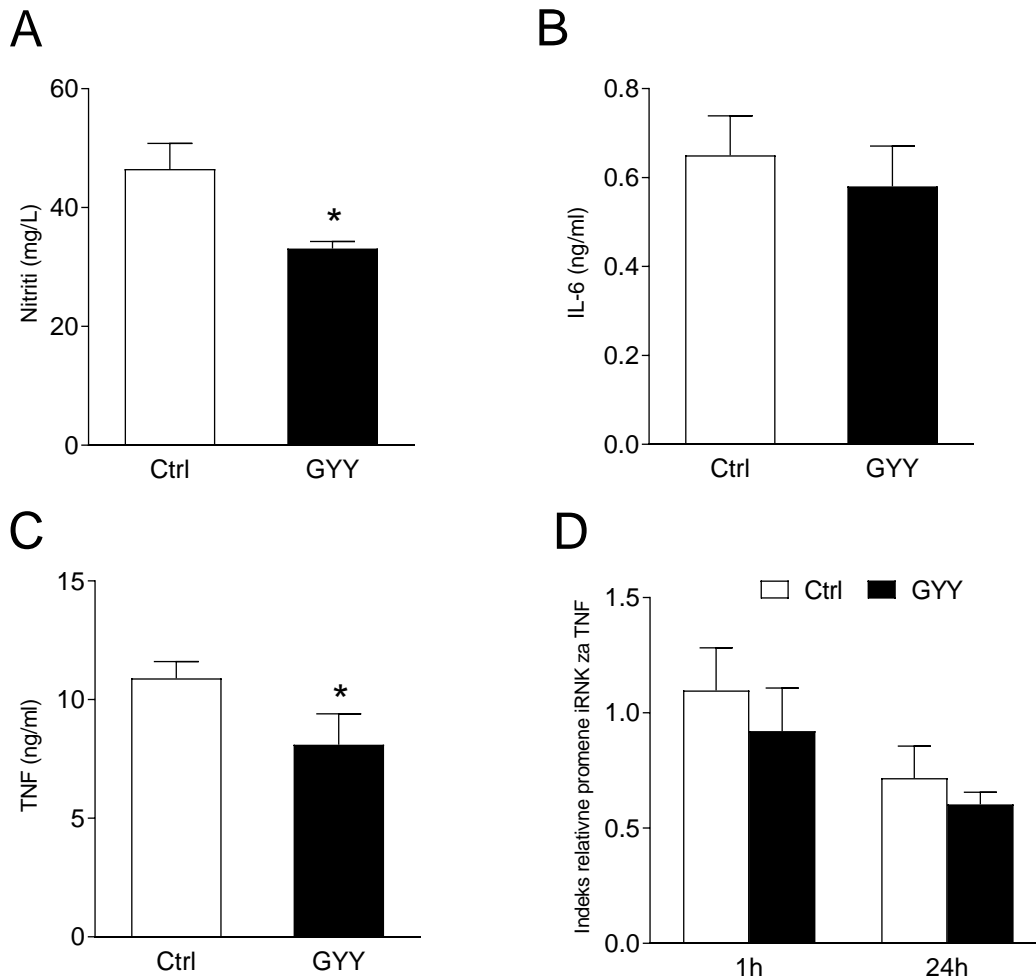
Slika 2. Efekat GYY4137 na vijabilnost aktiviranih BV2 ćelija. A) BV2 ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu različitih koncentracija (25, 50, 100, 200 μM) GYY4137 (GYY) u trajanju od 24h. Nakon 24h vijabilnost ćelija je određena testovima MTT i CV. B) BV2 ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 24h. Nakon 24h, apoptoza ćelija je određena metodom protočne citofluorimetrije bojenjem ćelija aneksinom V. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta.

Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da ni u jednoj od primenjenih koncentracija GYY4137 ne indukuje smrt BV2 ćelija.

4.1.2. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na funkcionalne karakteristike aktiviranih BV2 ćelija

Jedan od načina na koji mikroglija doprinosi patogenezi EAE-a je produkcija medijatora inflamacije, kao što su NO i proinflamacijski citokini IL-6 i TNF. Stoga je sledeći korak podrazumevao ispitivanje uticaja GYY4137 na ovu funkciju BV2 ćelija. S obzirom na to da GYY4137 ni u najvišoj primenjenoj koncentraciji nije uticao na vijabilnost BV2 ćelija, koncentracija od 200 μ M je odabrana za ispitivanje uticaja GYY4137 na funkcionalne karakteristike ovih ćelija: produkciju NO i proinflamacijskih citokina TNF i IL-6. Efekat GYY4137 na nivo nitrita, kao meru produkcije NO, određen je metodom po Grisu, dok je koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura određena testom ELISA.

Rezultati su pokazali da GYY4137 dovodi do smanjenja nivoa nitrita (Slika 3A), kao i citokina TNF (Slika 3C), ali da ne utiče na produkciju IL-6 (Slika 3B) u BV2 ćelijama stimulisanim LPS-om i IFN- γ . Međutim, GYY4137 nije uticao na relativnu ekspresiju iRNK za TNF ni nakon 1h, ni nakon 24h tretmana, ukazujući na to da svoj efekat na produkciju TNF ovo jedinjenje ostvaruje na posttranskripcionom nivou (Slika 3D).



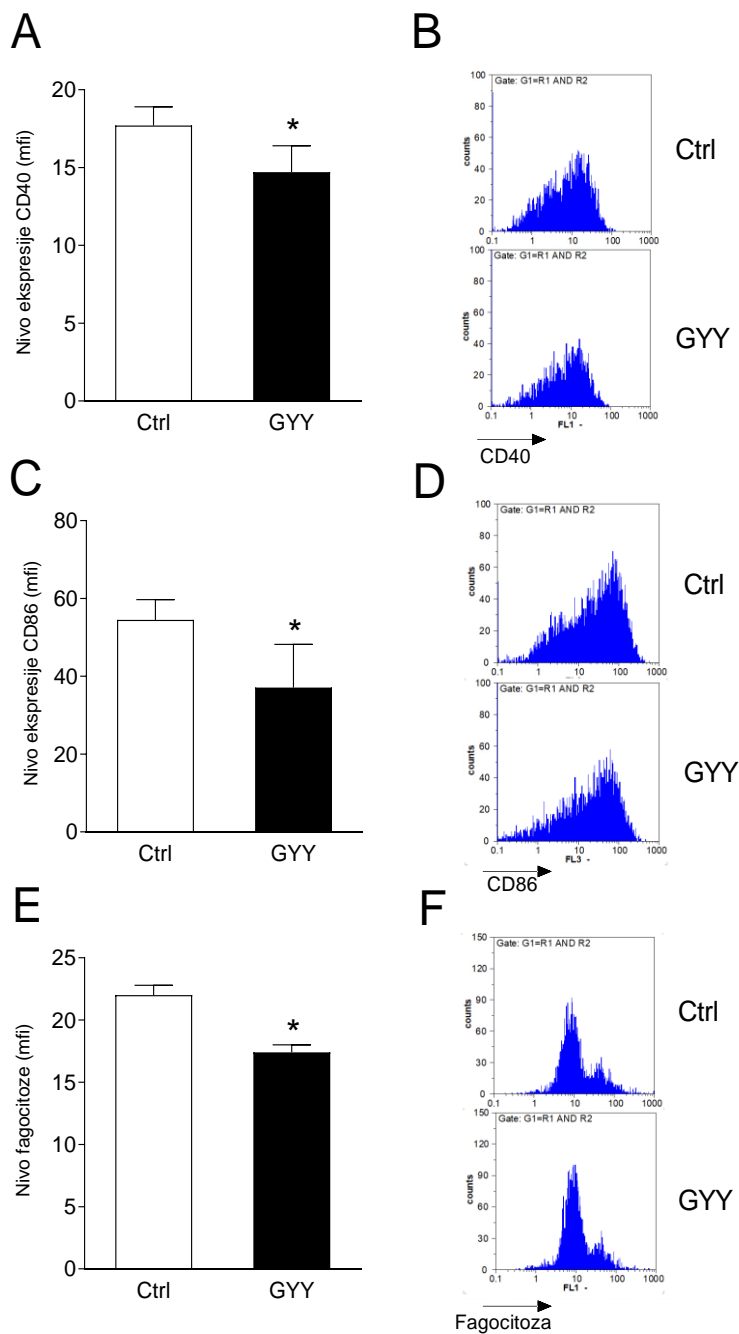
Slika 3. Efekat GYY4137 na produkciju NO i citokina IL-6 i TNF u BV2 ćelijama. BV2 ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M). Nakon 24h inkubacije određena je koncentracija nitrita metodom po Grisu (A), a metodom ELISA koncentracija citokina IL-6 (B) i TNF (C). Nakon 1h i 24h inkubacije metodom RT-

qPCR određen je relativni nivo ekspresije iRNK za TNF, koji je izražen kao relativna promena ekspresije ovog gena u odnosu na nivo ekspresije β -aktin (D). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da GYY4137 ostvaruje antiinflamacijski efekat na aktivirane BV2 ćelije tako što smanjuje produkciju medijatora inflamacije NO i proinflamacijskog citokina TNF.

4.1.3. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na fenotipske karakteristike i fagocitozu aktiviranih BV2 ćelija

Mikroglia dopinosi patogenezi EAE-a i prezentacijom antigena T ćelijama. Funkciju antigen-prezentujućih ćelija mikroglia obavlja zahvaljujući sposobnosti fagocitoze i ekspresiji MHC II molekula i kostimulatornih molekula, kao što su CD40 i CD86. Iz tog razloga je metodom protočne citofluorimetrije ispitan efekat primene GYY41377 (200 μ M) na ekspresiju površinskih molekula (CD40 i CD86) i fagocitozu od strane BV2 ćelija. GYY4137 je doveo do smanjenja nivoa ekspresije kostimulatornih molekula CD40 (Slika 4A i 4B) i CD86 (Slika 4C i 4D) po ćeliji. Takođe, primena GYY4137 je dovela do smanjenja nivoa fagocitoze (Slika 4E i 4F).



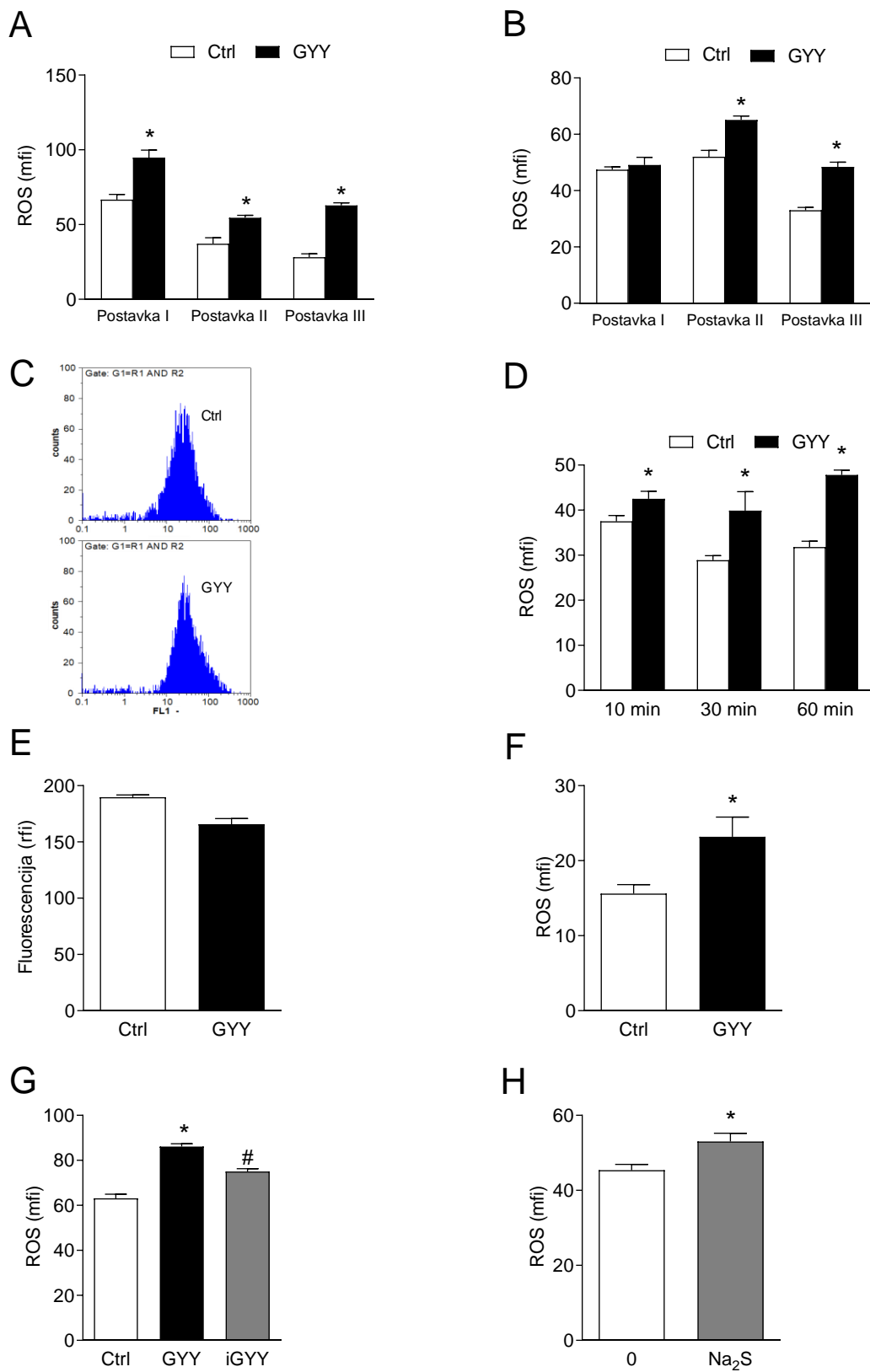
Slika 4. Efekat GYY4137 na nivo ekspresije površinskih molekula CD40 i CD86 i nivo fagocitoze u BV2 ćelijama. BV2 ćelije su stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 24h. Nakon 24h nivo ekspresije (mfi) površinskih molekula CD40 (A,B) i CD86 (C, D), kao i nivo fagocitoze (E, F) po ćeliji (mfi) određen je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati (A,C,E) su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Ovakvi rezultati ukazuju na to da GYY4137 ostvaruje antiinflamacijski efekat na aktivirane BV2 ćelije i kroz smanjenje nivoa fagocitoze i smanjenje nivoa ekspresije kostimulatornih molekula na površini ovih ćelija.

4.1.4. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na produkciju ROS od strane aktiviranih BV2 ćelija

Jedna od funkcionalnih karakteristika aktivirane mikroglije koja doprinosi patogenezi EAE-a je produkcija ROS. Stoga je bilo važno ispitati uticaj GYY4137 na produkciju ROS od strane BV2 ćelija. Kako bi efekat GYY4137 na produkciju ROS bio ispitan i na aktiviranim i na neaktiviranim BV2 ćelijama, ove ćelije su tretirane GYY4137 (200 μ M) u različitim vremenskim intervalima (10 min, 30 min, 60 min, 24h), u prisustvu (aktivirane ćelije) ili odsustvu (neaktivirane ćelije) primarne stimulacije LPS-om i IFN- γ . Nakon toga, ćelije su bojene fluorescentnim detektorom ROS (dihidrorodamin - DHR) i sledstveno sekundarno stimulisane PMA ili LPS-om i IFN- γ , u cilju stimulacije produkcije ROS. Produkcija ROS određivana je na osnovu intenziteta fluorescencije DHR-a metodom protočne citofluorimetrije i izražena je kao nivo produkcije ROS po ćeliji (mf \bar{i}).

GYY4137 je i nakon primene na aktiviranim (primarno stimulisanim) i neaktiviranim (u odsustvu primarne stimulacije) BV2 ćelijama doveo do povećanja produkcije ROS u svim vremenskim intervalima inkubacije (Slika 5A, B, D). S obzirom na to da je GYY4137 u najvećem broju istraživanja okarakterisan kao jedinjenje sa antioksidativnim svojstvima, ovakav efekat na produkciju ROS je bio neočekivan. Stoga je bilo neophodno dodatno proveriti postojanje ovakvog fenomena. U tu svrhu primenjene su tri različite eksperimentalne postavke u kojima je ispitan efekat GYY4137 na produkciju ROS od strane BV2 ćelija. Prva postavka podrazumevala je ispitivanje efekta primene GYY4137 na aktiviranim BV2 ćelijama, koje su, istovremeno sa primenom GYY4137, primarno stimulisane LPS-om i IFN- γ , a sekundarno stimulisane PMA-om (postavka I). Druga i treća postavka su podrazumevale primenu GYY4137 na neaktiviranim BV2 ćelijama (primena u odsustvu primarne stimulacije), dok su ove ćelije sekundarno stimulisane PMA-om (postavka II) ili LPS-om i IFN- γ (postavka III) nakon bojenja DHR-om. U gotovo svim primenjenim postavkama GYY4137 je doveo do povećanja produkcije ROS od strane BV2 ćelija (Slika 5A i 5B). Efekat na produkciju ROS je izostao samo u slučaju primene GYY4137 na aktivirane BV2 ćelije u trajanju od 1h (Slika 5B). Od svih eksperimentalnih postavki, najizraženiji efekat na povećanje produkcije ROS ostvaren je prilikom primene sekundarne stimulacije LPS-om i IFN- γ (postavka III) (Slika 5A i 5B). S obzirom na to da je GYY4137 doveo do povećanja produkcije ROS i nakon samo 10 min inkubacije, može se zaključiti da svoj efekat na BV2 ćelije GYY4137 ostvaruje u jako kratkom vremenskom intervalu (Slika 5D).



Slika 5. Efekat GYY417 na produkciju ROS od strane aktiviranih BV2 ćelija. A) BV2 ćelije su u trajanju od 24h inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M), uz

simultanu primarnu stimulaciju LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml), a zatim su ove ćelije bojene DHR-om i sekundarno stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min (postavka I), ili su tretirane GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 24h bez prisustva primarne stimulacije, bojene DHR-om i stimulisane PMA-om (postavka II) ili LPS-om i IFN- γ (postavka III) narednih 90 min. B) BV2 ćelije su inkubirane kao pod (A), ali je inkubacija trajala 60 min umesto 24h. C) Prikazani su reprezentativni plotovi dobijeni prilikom detekcije fluorescencije DHR u BV2 ćelijama. D) BV2 ćelije su inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 10 min, 30 min ili 60 min u odsustvu primarne stimulacije, zatim bojene DHR-om i stimulisane PMA-om narednih 90 min. E) GYY4137 (GYY, 200 μ M) ili odgovarajući kontrolni rastvarač (kontrola, Ctrl) je inkubiran sa DHR-om (5 μ M) u odgovarajućem bezćelijskom sistemu, a zatim je fluorescencija dobijenog rastvora merena na fluorimetru i izražena kao relativni intenzitet fluorescencije (rfi). F) BV2 ćelije su inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 60 min, u odsustvu primarne stimulacije, zatim bojene DCFDA i sekundarno stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min, a potom analizirane na protočnom citofluorimetru. G) BV2 ćelije su inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu svežeg rastvora GYY4137 (GYY) ili „istrošenog“ rastvora GYY4137 (iGYY) u trajanju od 60 min. Nakon završetka tretmana, ćelije su bojene DHR-om i sekundarno stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min. Produkcija ROS je zatim određivana na protočnom citofluorimetru. H) BV2 ćelije su inkubirane u odsustvu (0) ili prisustvu natrijum-sulfida (Na₂S, 200 μ M) u trajanju od 60 min. Nakon toga, ćelije su bojene DHR-om i sekundarno stimulisane PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min. Produkcija ROS je zatim određivana na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD (A,B,D-H) dobijene iz reprezentativnog od tri eksperimenta. *p < 0.05 vs. Ctrl i #p < 0.05 vs. GYY predstavljaju statističku značajnost.

S obzirom na to da je efekat GYY4137 na produkciju ROS od strane BV2 ćelija neočekivan, cilj narednog koraka je bio da se ispita da li postoji interakcija GYY4137 i DHR koja indukuje pojavu fluorescencije nezavisno od prisustva ćelija. U tu svrhu GYY4137 i DHR su inkubirani u medijumu za kultivaciju ćelija u odgovarajućim koncentracijama, a potom je na fluorometru detektovana fluorescencija ovakvog bezćelijskog sistema. Rezultati su pokazali da GYY4137 nije doveo do povećanja fluorescencije DHR-a u odnosu na kontrolu (Slika 5E).

Kako bi se ispitalo da li se i drugim detektorima ROS može registrovati ovaj fenomen, za određivanje efekta GYY4137 na produkciju ROS u BV2 ćelijama korišćen je alternativni detektor ROS – DCFDA. Korišćenjem DCFDA takođe je detektovana povećana produkcija ROS indukovana GYY4137, ukazujući na verodostojnost prvobitno dobijenog rezultata (Slika 5F).

GYY4137 je složeno jedinjenje čijom hidrolizom, pored H₂S, nastaju drugi produkti koji predstavljaju složena organska jedinjenja. Kako bi se ispitalo da li su efekti koje GYY4137 ostvaruje na produkciju ROS od strane BV2 ćelija posredovani H₂S oslobođenim od strane ovog jedinjenja ili nekim drugim produktom njegove dekompozicije, GYY4137 je rastvoren u standardnoj koncentraciji (200 μ M) i inkubiran 7 dana na 37°C. Smatra se da je ovakav rastvor GYY4137 oslobodio najveći deo H₂S i u daljem tekstu je označen kao „istrošeni“ GYY4137. BV2 ćelije su u trajanju od 60 min izložene GYY4137 (200 μ M) ili „istrošenom“ GYY4137, u odsustvu primarne stimulacije, a zatim bojene DHR-om i sekundarno stimulisane PMA-om narednih 90 min. Primena „istrošenog“ GYY4137 na BV2 ćelije u trajanju od 60 min ostvarila je znatno slabiji efekat na povećanje produkcije ROS u odnosu na primenu svežeg rastvora GYY4137 (Slika 5G). Dakle, smanjenje količine dostupnog H₂S je uslovalo smanjenje efekta koji GYY4137 ispoljava na produkciju ROS.

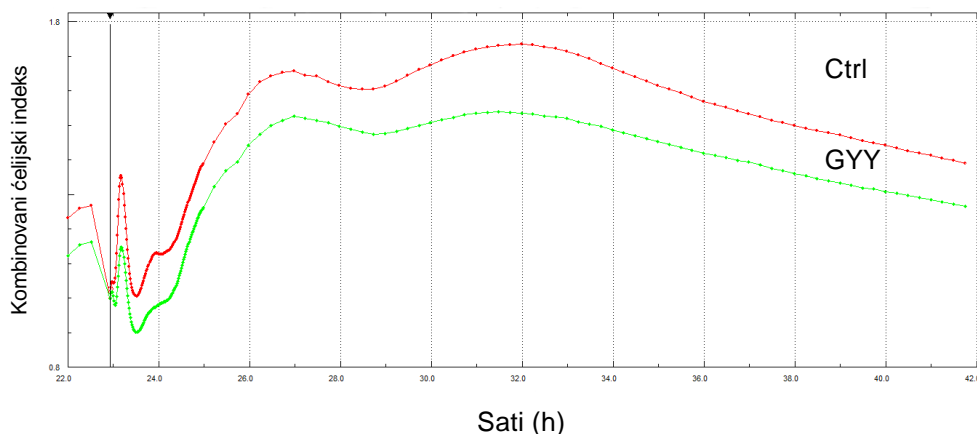
S druge strane, izlaganje BV2 ćelija natrijum-sulfidu (Na_2S), alternativnom donoru H_2S , dovelo je do povećanja produkcije ROS (Slika 5H). Dakle, prisustvo H_2S dovodi do sličnih efekata na produkciju ROS od strane BV2 ćelija kao i primena GYY4137.

Na osnovu navedenih rezultata se može zaključiti da GYY4137 dovodi po povećanja produkcije ROS nakon primene i na aktiviranim i na neaktiviranim BV2 ćelijama. Takođe, ovaj efekat je najverovatnije posredovan H_2S , a ne nekim drugim produktom dekompozicije GYY4137.

4.1.5. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na sposobnost adhezije aktiviranih BV2 ćelija

Promene u aktivacionom statusu, morfologiji, proliferaciji i vijabilnosti ćelija utiču na njihovu sposobnost adhezije. Promena u sposobnosti adhezije ćelija, odnosno u njihovoj interakciji s podlogom, može biti detektovana kao promena otpora analizom ćelija u realnom vremenu i izražena kao kombinovani ćelijski indeks. Efekat GYY4137 ispitan je i na ovaj parametar aktivacionog statusa BV2 ćelija.

Analiza ćelija u realnom vremenu je pokazala da efekat na BV2 ćelije GYY4137 ostvaruje posle samo nekoliko minuta od primene, što je u skladu sa prethodnim rezultatom, koji je pokazao da GYY4137 ostvaruje uticaj na produkciju ROS posle samo 10 min inkubacije. Takođe, rezultati ove metode pokazuju da pored brzine kojom GYY4137 deluje na BV2 ćelije, efekat koji se ostvaruje je trajan i održava se kroz najmanje 24h (Slika 6).

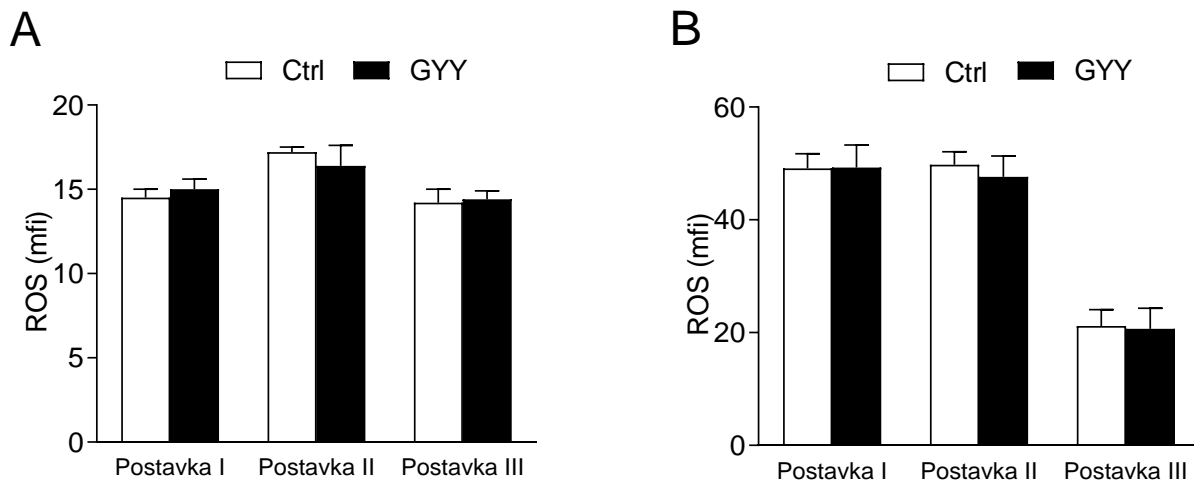


Slika 6. Efekat GYY4137 na sposobnost adhezije aktiviranih BV2 ćelija. BV2 ćelije su inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 24h i simultano stimulisane LPS-om (100 ng/ml) i $\text{IFN-}\gamma$ (10 ng/ml). Promene u sposobnosti adhezije aktiviranih BV2 ćelija tokom 24h analizirane su u realnom vremenu.

Prethodni rezultat ukazuje na to da GYY4137 efekat na sposobnost adhezije aktiviranih BV2 ćelija ostvaruje posle samo nekoliko min inkubacije, pri čemu je ovaj efekat trajan.

4.1.6. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na produkciju ROS od strane peritonealnih makrofaga C57BL/6 miša i DA pacova

Sledeći korak u ovom istraživanju je bio da se ispita da li je efekat koji GYY4137 ostvaruje na produkciju ROS specifičan za mikrogliju, ili se ostvaruje i u drugim, srodnim tipovima ćelija kao što su makrofagi. Iz tog razloga su izolovani makrofagi iz peritonealne šupljine miša i pacova, a zatim izloženi GYY4137 u trajanju od 60 min i stimulisani na tri različita, prethodno objašnjena načina (postavka I, II i III). Ni u jednoj od eksperimentalnih postavki GYY4137 nije doveo do povećanja produkcije ROS u makrofagima miša (Slika 7A) i pacova (Slika 7B), ukazujući na to da je efekat na produkciju ROS specifičan za mikrogliju.



Slika 7. Efekat GYY4137 na produkciju ROS od strane peritonealnih makrofaga C57BL/6 miša i DA pacova. Peritonealni makrofagi C57BL/6 miša (A) i DA pacova (B) su u trajanju od 60 min inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M), uz istovremenu primarnu stimulaciju LPS-om (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml), a zatim bojeni DHR-om i sekundarno stimulisani PMA-om (100 ng/ml) narednih 90 min (postavka I), ili su izloženi GYY4137 (200 μ M) u odsustvu primarne stimulacije, bojeni DHR-om i sekundarno stimulisani PMA-om (postavka II) ili LPS-om i IFN- γ (postavka III) narednih 90 min. Produkcija ROS određena je metodom protočne citofluorimetrije i izražena kao produkcija ROS po ćeliji (mfi). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta.

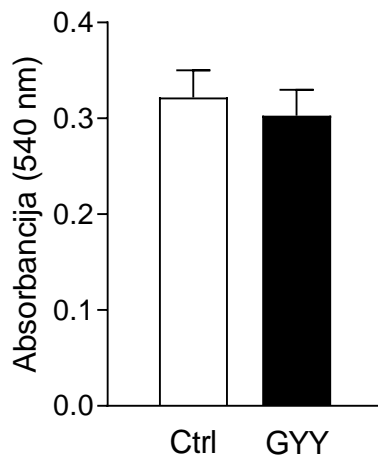
Ovakvi rezultati ukazuju na to da, iako je fenomen povećane produkcije ROS indukovane GYY4137 prisutan u mikrogliji, on nije prisutan u makrofagima, koji predstavljaju ćelije srodne mikrogliji.

4.2. Imunomodulacijski efekat *in vitro* primene GYY4137 na dendritske ćelije diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša

4.2.1. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na vijabilnost dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša

S obzirom na to da DĆ omogućavaju aktivaciju naivnih, antigen-specifičnih T limfocita i učestvuju u njihovoj reaktivaciji u CNS-u, one imaju bitnu ulogu u induktivnoj i efektorskoj fazi EAE-a. Stoga je sledeći korak ovog istraživanja podrazumevao ispitivanje efekta GYY4137 u *in vitro* modelu diferencijacije DĆ-a.

DĆ su diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša tokom sedmodnevne kultivacije u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml). Sedmog dana ćelije su tretirane GYY4137 (200 μ M), istovremeno sa dodatkom maturacionog stimulusa u vidu LPS-a (100 ng/ml). DĆ su sakupljene osmog dana i najpre je ispitan uticaj GYY4137 na vijabilnost ovih ćelija testom MTT. Rezultati ovog testa su pokazali da GYY4137 ne utiče na vijabilnost DĆ-a (Slika 8).



Slika 8. Efekat GYY4137 na vijabilnost DĆ. DĆ su diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša tokom sedmodnevne kultivacije u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml). Sedmog dana ćelije su izložene GYY4137 (GYY, 200 μ M) i simultano stimulisane LPS-om (100 ng/ml). Ćelije inkubirane u odsustvu GYY4137 su označene kao kontrola (Ctrl). Nakon 24h metabolička vijabilnost ćelija je određena testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta.

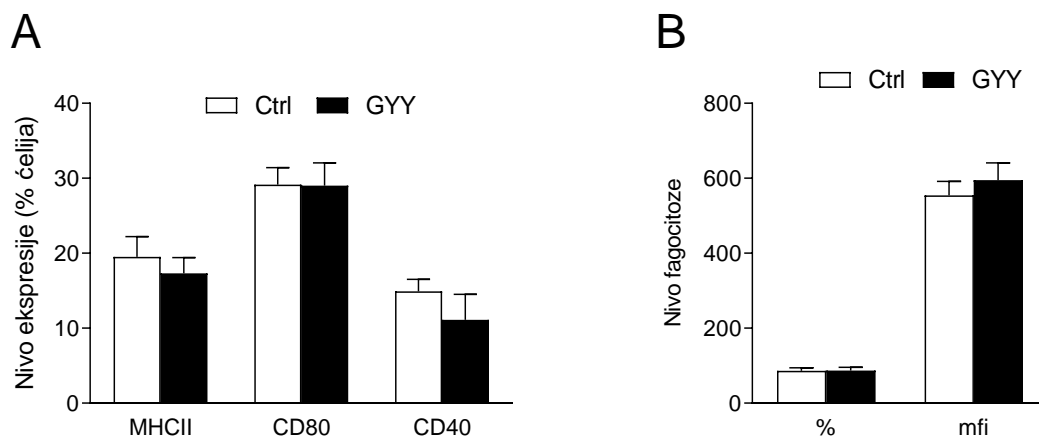
Navedeni rezultat pokazuje da GYY4137 ne ostvaruje efekat na vijabilnost DĆ-a.

4.2.2. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na fenotipske karakteristike i fagocitozu dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša

DĆ prezentacijom antigena naivnim, antigen-specifičnim T limfocitima omogućavaju njihovu aktivaciju, a zatim i reaktivaciju u CNS-u. Za obavljanje funkcije prezentacije antigena bitna je sposobnost fagocitoze i ekspresija MHC II molekula i kostimulatornih molekula, kao što su CD40 i

CD80. Iz tog razloga je metodom protočne citofluorimetrije ispitan efekat primene GYY41377 (200 μ M) na ekspresiju površinskih molekula (MHC II, CD40 i CD80) i fagocitozu od strane DĆ-a.

Nakon sedmodnevne kultivacije DĆ u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml) i primene GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 24h, uz LPS (100 ng/ml) kao maturacioni stimulus, određen je efekat GYY4137 na nivo fagocitoze i ekspresiju navedenih površinskih molekula u DĆ-ama. Rezultati su pokazali da GYY4137 nije ostvario efekat na ekspresiju površinskih molekula (MHC II, CD40 i CD80) u ukupnoj populaciji ćelija (Slika 9A) i nivo fagocitoze (Slika 9B) kako u ukupnoj populaciji, tako i po ćeliji.



Slika 9. Efekat GYY4137 na nivo ekspresije površinskih molekula MHC II, CD40 i CD80 i nivo fagocitoze u DĆ-ama. DĆ su diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša tokom sedmodnevne kultivacije u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml). Sedmog dana ćelije su izložene GYY4137 (GYY, 200 μ M) i simultano stimulisane LPS-om (100 ng/ml). Ćelije inkubirane u odsustvu GYY4137 su označene kao kontrola (Ctrl). Nakon 24h nivo ekspresije površinskih molekula MHC II, CD80, CD40 (A) i nivo fagocitoze (B) određen je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta.

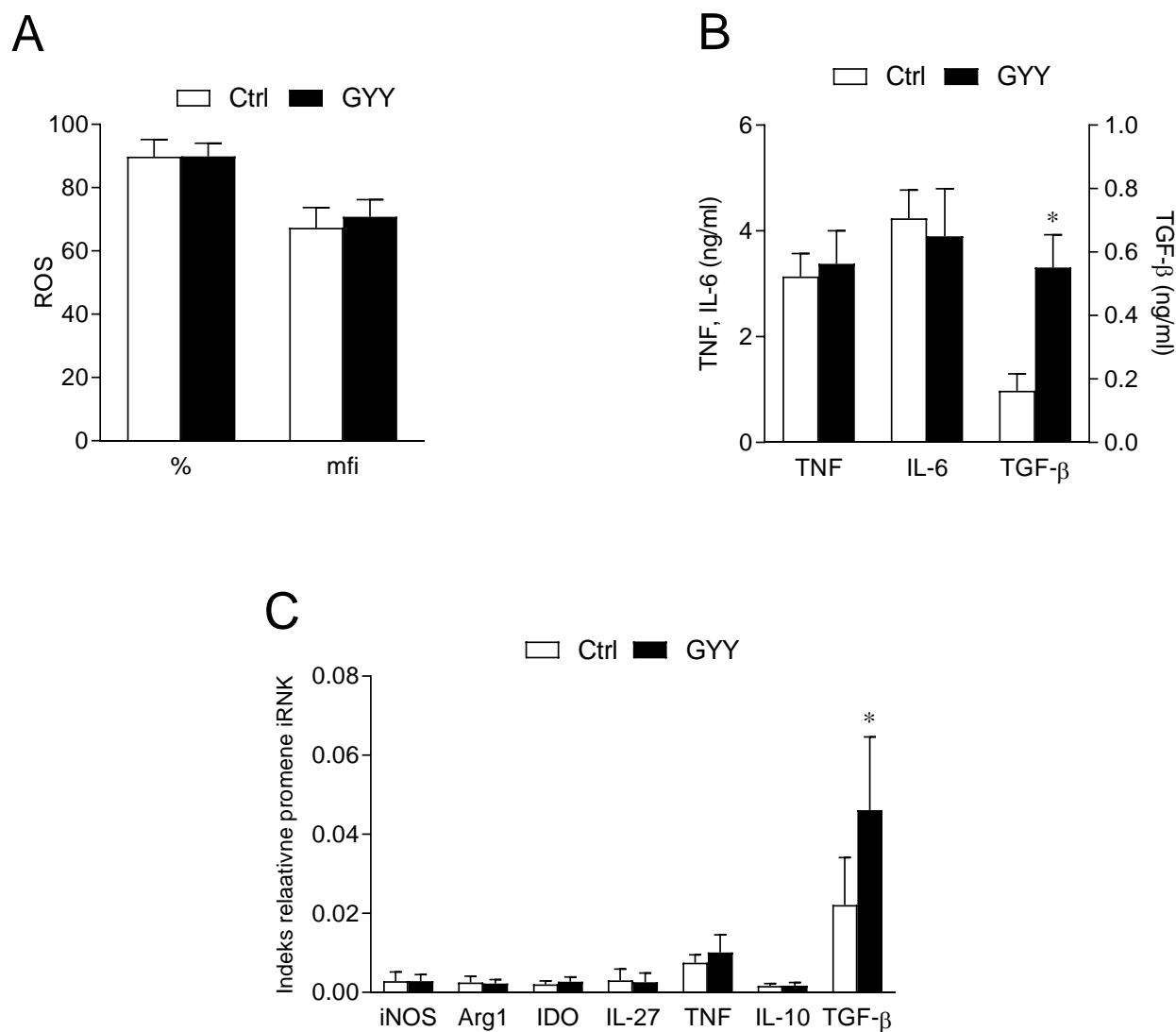
Navedeni rezultati ukazuju na to da GYY4137 ne utiče na ekspresiju površinskih molekula (MHC II, CD80, CD40) i nivo fagocitoze u DĆ-ama.

4.2.3. Efekat *in vitro* primene GYY4137 na funkcionalne karakteristike dendritskih ćelija diferentovanih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša

Još jedan način na koji DĆ doprinose patogenezi EAE-a je produkcija medijatora inflamacije, kao što su ROS i proinflamacijski citokini TNF i IL-6. Pored uloge u indukciji imunskog odgovora, DĆ imaju i tolerogenu funkciju, koja omogućava uspostavljanje i održavanje autotolerance. Tolerogenosti DĆ-a doprinose različiti molekuli uključujući TGF- β , iNOS, Arg1, IDO, IL-27, IL-10. Iz navedenih razloga, sledeći korak ove doktorske disertacije je podrazumevao ispitivanje uticaja GYY4137 na produkciju ROS, produkciju proinflamacijskih citokina TNF i IL-6, produkciju citokina TGF- β , kao i relativni nivo ekspresije iRNK za iNOS, Arg1, IDO, IL-27, IL-10. Nakon sedmodnevne kultivacije DĆ-a u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml) i primene GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 24h, uz LPS (100 ng/ml) kao maturacioni stimulus, efekat GYY4137 na produkciju ROS određen je metodom protočne

citofluorimetrije, dok je koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura određena testom ELISA. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR i izražena je kao relativna promena ekspresije datog gena u odnosu na β -aktin.

Rezultati su pokazali da GYY4137 nije ostvario uticaj na produkciju ROS od strane DĆ-a, kako u ukupnoj populaciji, tako i po ćeliji (Slika 10A). S druge strane, GYY4137 je doveo do statistički značajnog povećanja produkcije TGF- β , ali nije uticao na produkciju proinflamacijskih citokina IL-6 i TNF (Slika 10B). Takođe, GYY4137 je doveo do povećanja relativnog nivoa iRNK za TGF- β , što ukazuje na to da GYY4137 svoje efekte na ekspresiju TGF- β ostvaruje na transkripcionom nivou (Slika 10C). Međutim, GYY4137 nije ostvario efekat na relativnu ekspresiju iRNK drugih molekula od značaja za tolerogenost DĆ (iNOS, Arg1, IDO, IL-27, IL-10) (Slika 10C).



Slika 10. Efekat GYY4137 na funkcionalne karakteristike DĆ-a. DĆ su diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miša tokom sedmodnevne kultivacije u prisustvu GM-CSF (20 ng/ml). Sedmog dana ćelije su izložene GYY4137 (GYY, 200 μ M) i simultano stimulisane LPS-om (100 ng/ml). Ćelije inkubirane u odsustvu GYY4137 su označene kao kontrola (Ctrl). Nakon 24h je određen nivo produkcije ROS od strane DĆ-a metodom protočne citofluorimetrije (A), nivo citokina TNF, IL-6 i

TGF- β u supernatantima ćelijskih kultura metodom ELISA (B), a metodom RT-PCR određen je relativni nivo ekspresije iRNK za iNOS, Arg1, IDO, IL-27, IL-10, TNF i TGF- β , koji je izražen kao relativna promena ekspresije datog gena u odnosu na β -aktin (C). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

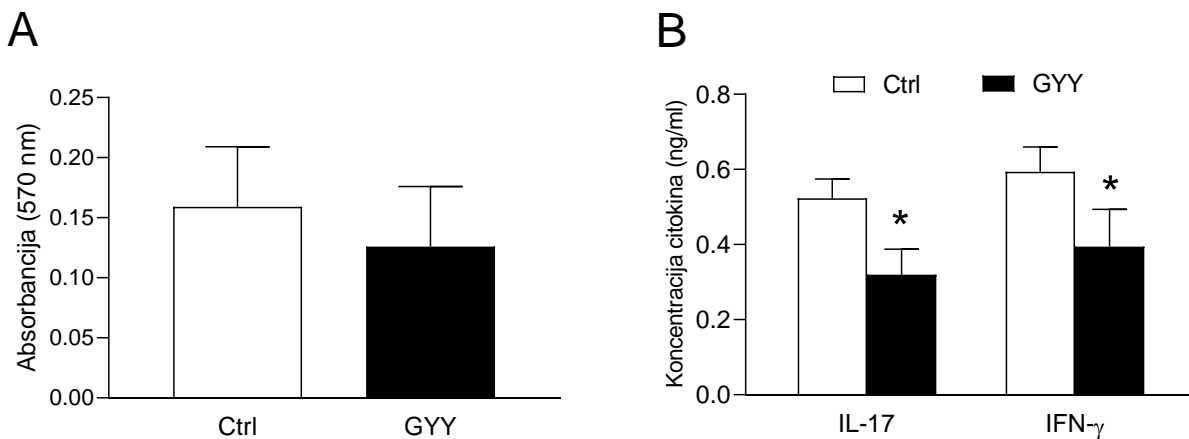
Navedeni rezultati pokazuju da je imunomodulacijski efekat koji GYY4137 ostvaruje na DC ograničen i da se ogleda u stimulaciji produkcije citokina TGF- β .

4.3. Imunomodulacijski efekat *ex vivo* primene GYY4137 na ćelije poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa i DA pacova

4.3.1. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

Nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, prezentacijom ovog antigena naivnim T limfocitima u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije dolazi do aktivacije ovih ćelija i njihove diferencijacije u Th1 i Th17 subpopulacije. Th1 i Th17 limfociti imaju ključnu ulogu u patogenezi EAE-a jer predstavljaju glavne proizvođače encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17. Stoga je sledeći korak u ispitivanju imunomodulacijskih efekata GYY4137 bio utvrđivanje njegovog uticaja na produkciju glavnih encefalitogenih citokina u ćelijama limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije (PLČ) C57BL/6 miša *ex vivo*. U tu svrhu ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ćelije PLČ su izložene GYY4137 (200 μ M) naredna 24h, u prisustvu peptida MOG₃₅₋₅₅, kako bi se omogućila restimulacija T limfocita. Nakon 24h vijabilnost ćelija je određena testom MTT, a koncentracije citokina IFN- γ i IL-17 u supernatantima ćelijskih kultura testom ELISA.

Rezultati testa MTT su pokazali da GYY4137 ne ostvaruje uticaj na vijabilnost ćelija PLČ imunizovanih miševa nakon 24h inkubacije u prisustvu GYY4137 (Slika 11A). Primena GYY4137 dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa IFN- γ i IL-17 u supernatantima ćelijskih kultura imunskih ćelija PLČ (Slika 11B).



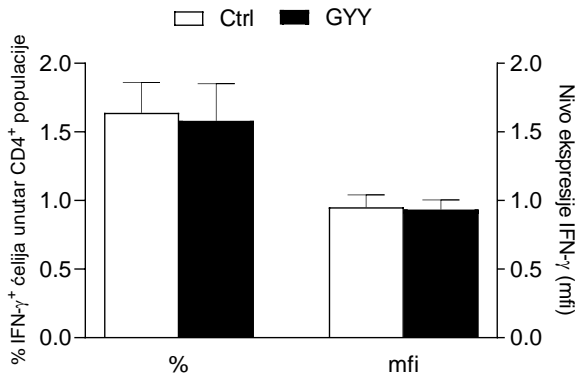
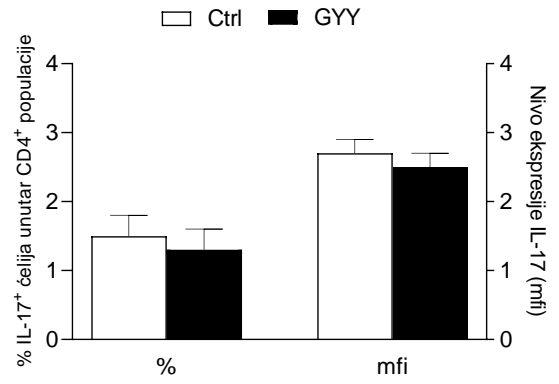
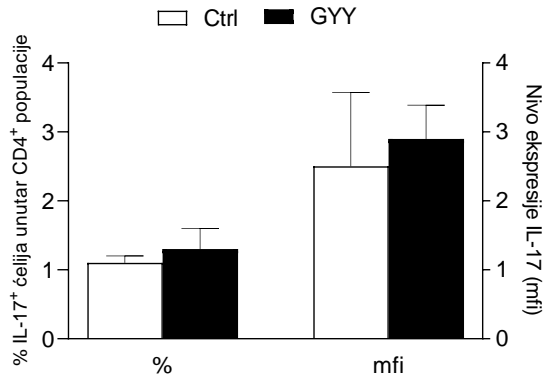
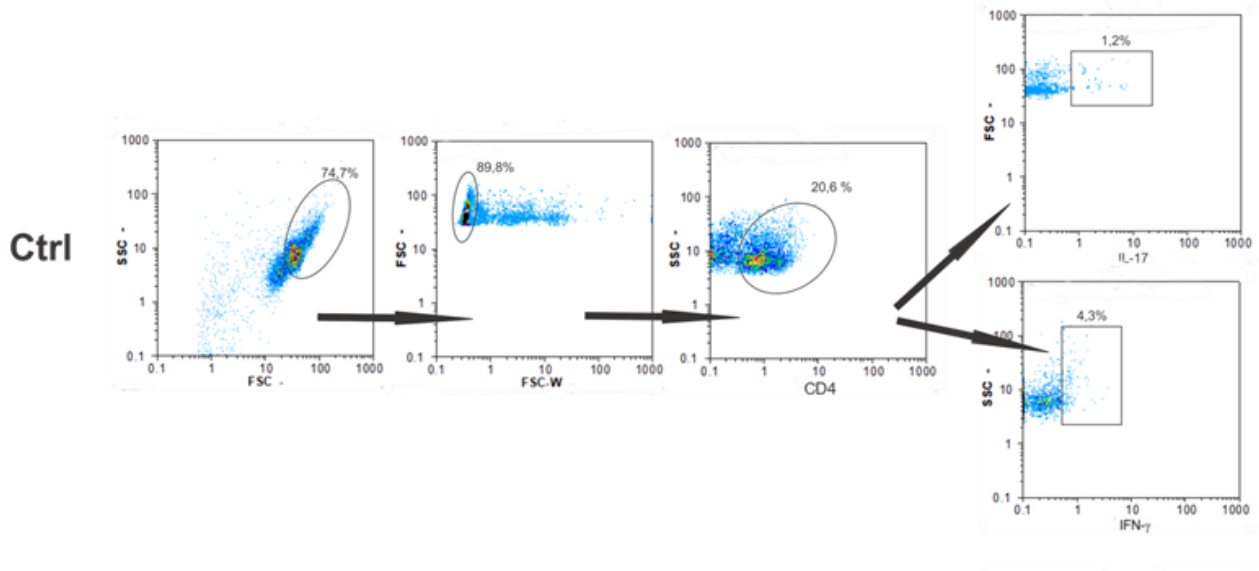
Slika 11. Efekat GYY4137 na vijabilnost i produkciju citokina IL-17 i IFN- γ u ćelijama PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa *ex vivo*. Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije C57BL/6 miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) i simultano stimulirane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (15 μ g/ml). Nakon 24h testom MTT je određena vijabilnost ćelija PLČ (A), a koncentracija citokina IL-17 i IFN- γ u supernatantima ćelijskih kultura je određena testom ELISA (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

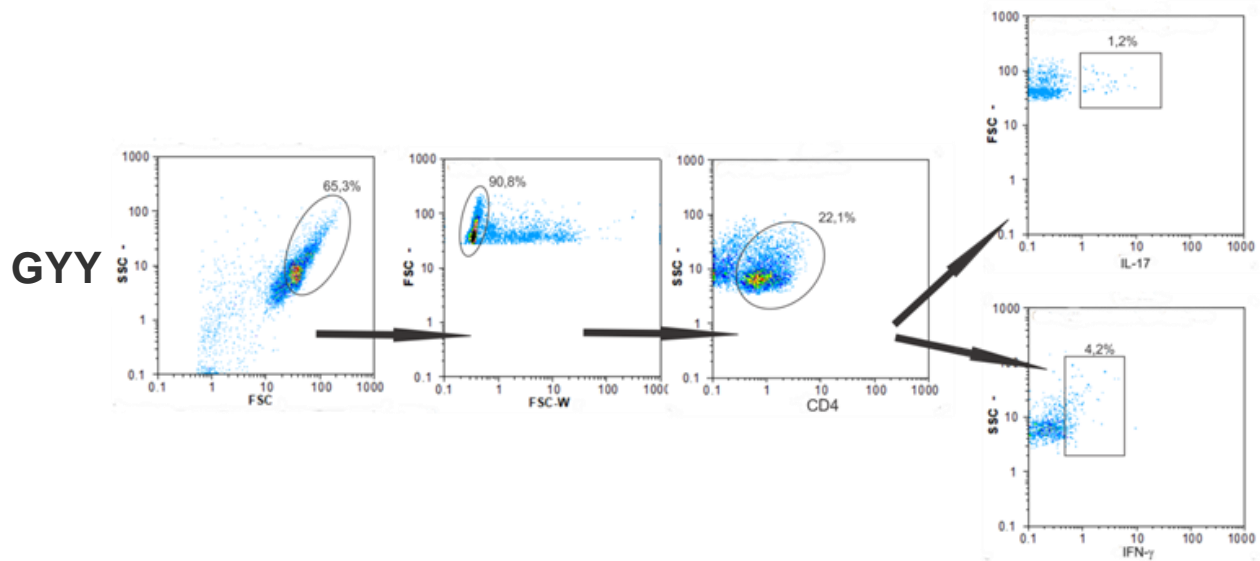
Dakle, GYY4137 ostvaruje imunosupresivno dejstvo na ćelije PLČ imunizovanih miševa kroz uticaj na smanjenje produkcije glavnih encefalitogenih citokina, IFN- γ i IL-17.

4.3.2. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na Th1 i Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

S obzirom na to da je prethodim rezultatima pokazano da GYY4137 redukuje produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama PLČ, naredni cilj je bio ispitati efekat koji ovo jedinjenje ostvaruje na zastupljenost Th1 i Th17 limfocita, kao glavnih ćelija koje proizvode ove citokine. Ćelije PLČ su u tu svrhu izolovane 7 dana nakon imunizacije C57BL/6 miševa i izložene GYY4137 (200 μ M) u ukupnom trajanju od 4,5h. Ćelije su nakon prvih 40 min inkubacije u prisustvu GYY4137 dodatno stimulirane jonomicinom (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije. Procentualna zastupljenost Th1 i Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određivana je metodom protočne citofluorimetrije. Th1 limfociti su definisani kao CD4⁺IFN- γ ⁺ ćelije, a Th17 kao CD4⁺IL-17⁺ ćelije. Primena GYY4137 u ukupnom trajanju od 4,5 h nije dovela do statistički značajne promene u zastupljenosti Th1 (Slika 12A) i Th17 (Slika 12B) limfocita u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Takođe, GYY4137 nije uticao na nivo ekspresije IFN- γ po Th1 limfocitu (Slika 12A), kao ni na nivo ekspresije IL-17 po Th17 limfocitu (Slika 12B) nakon 4,5 h tretmana.

Kako bi se utvrdio efekat dugotrajnog izlaganja GYY4137, procentualna zastupljenost Th17 limfocita određena je i nakon primene ovog jedinjenja u ukupnom trajanju od 16 h, pri čemu je prvih 40 min inkubacije GYY4137 primenjen samostalno, a zatim je dodata stimulacija u vidu jonomicina (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka vremena inkubacije od 16h. Rezultati su pokazali da ni nakon produžene inkubacije u prisustvu GYY4137 nije došlo do promene u procentualnoj zastupljenosti Th17 limfocita u odnosu na kontrolu (Slika 12C). Takođe, tretman GYY4137 u trajanju od 16 h nije uticao na nivo ekspresije IL-17 po Th17 limfocitu (Slika 12C).

A**B****C****D**



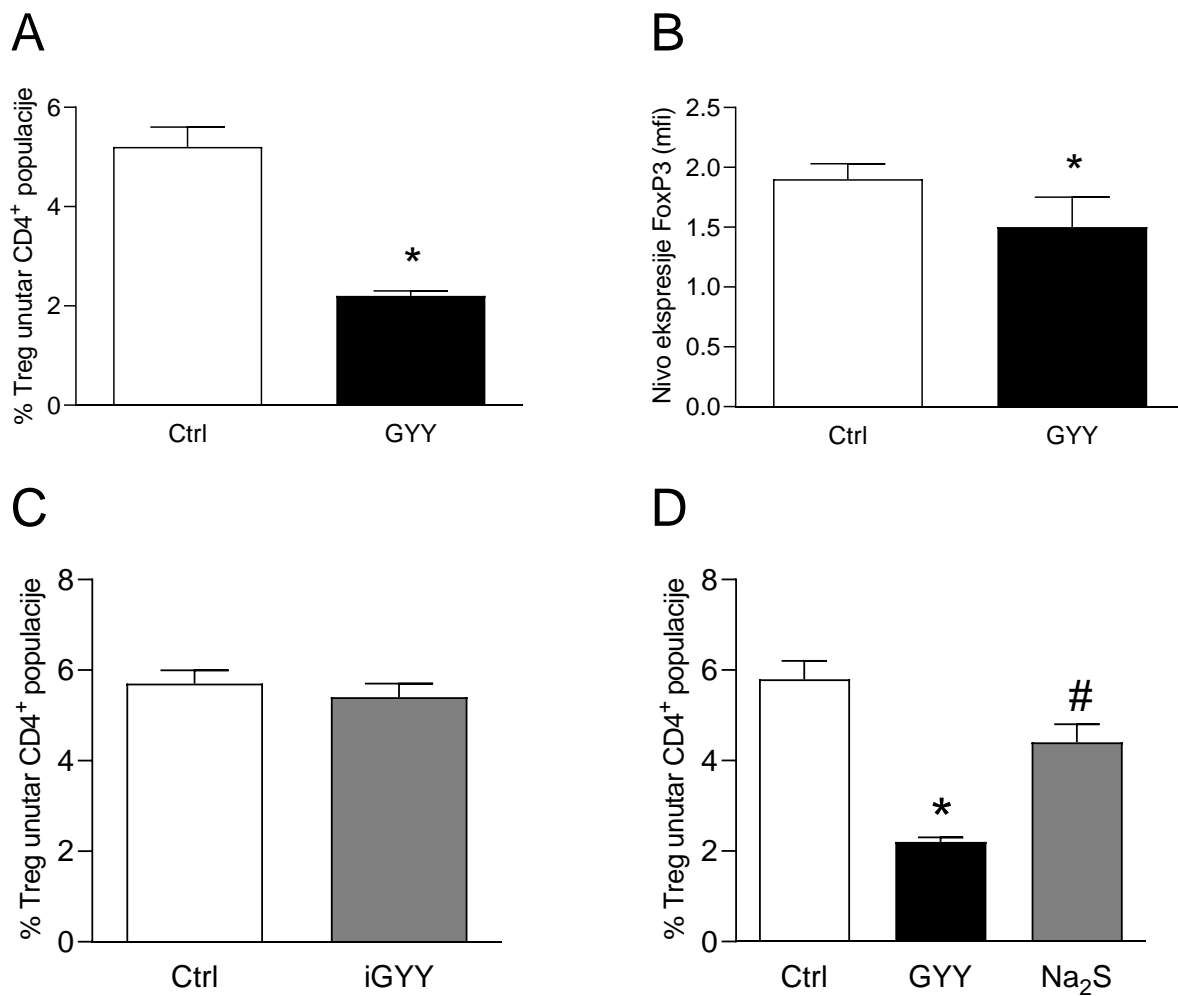
Slika 12. Efekat GYY4137 na Th1 i Th17 limfocite PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa *ex vivo*. Čelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije C57BL/6 miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GY, 200 μM) u trajanju od 4,5 h ili 16 h. Čelije su nakon prvih 40 min inkubacije dodatno stimulirane jonomycinom (1,3 μM) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μM) i monensina (2 μM), do isteka ukupnog vremena inkubacije. A) Nakon 4,5 h inkubacije određena je procentualna zastupljenost IFN-γ⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th1 limfocita) i nivo ekspresije IFN-γ po CD4⁺IFN-γ⁺ (Th1) ćeliji metodom protočne citofluorimetrije. B) Nakon 4,5 h inkubacije određena je procentualna zastupljenost IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th17 limfocita) i nivo ekspresije IL-17 po CD4⁺IL-17⁺ (Th17) ćeliji metodom protočne citofluorimetrije. C) Nakon 16 h inkubacije određena je procentualna zastupljenost IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th17 limfocita) i nivo ekspresije IL-17 po CD4⁺IL-17⁺ (Th17) ćeliji metodom protočne citofluorimetrije. D) Prikazani su reprezentativni plotovi dobijeni prilikom analize ćelija na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A-C). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Iako GYY4137 inhibira produkciju glavnih encefalitogenih citokina, on ne utiče na udeo Th1 i Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ nakon kratkotrajne inkubacije. Takođe, GYY4137 ne utiče na procentualnu zastupljenost Th17 limfocita nakon dugotrajnog izlaganja ovom jedinjenju. GYY4137 ne utiče ni na nivo ekspresije IFN-γ i IL-17 po ćeliji.

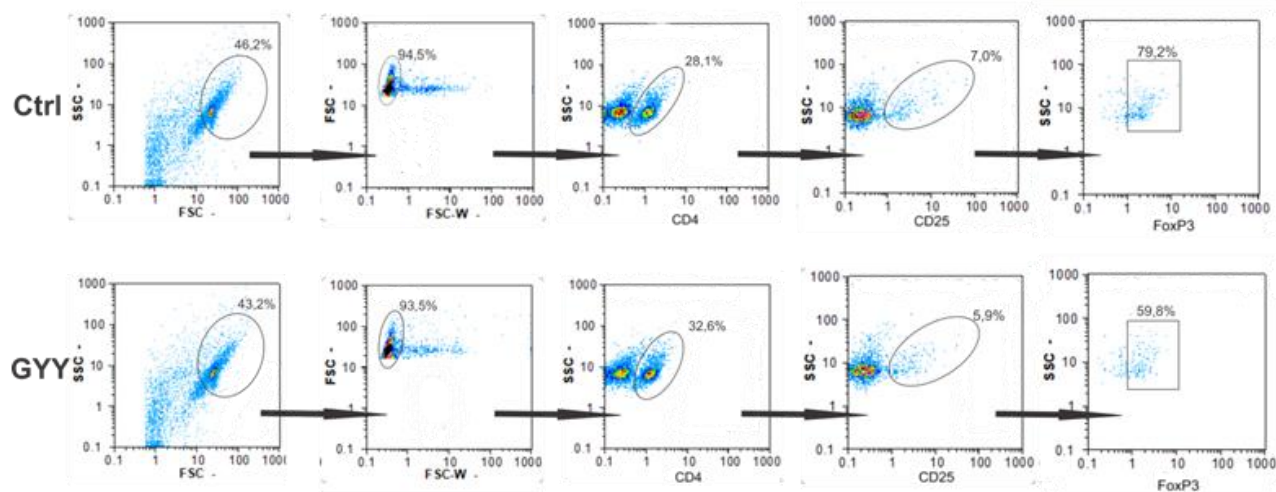
4.3.3. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

Regulatorni T limfociti imaju bitnu ulogu u ograničavanju imunskog odgovora i održavanju imunske homeostaze. Zbog toga je sledeći korak u ovom istraživanju podrazumevao ispitivanje uticaja GYY4137 na Treg. U tu svrhu su ćelije PLČ izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izložene GYY4137 (200 μM) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Potom je određivana procentualna zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ analizom na protočnom citofluorimetru. Treg su definisani kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelije. Rezultati su pokazali da primena

GY4137 u trajanju od 40 min dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ (Slika 13A). Takođe, GY4137 je indukovao blagu, ali statistički značajnu, redukciju nivoa ekspresije FoxP3 po CD4⁺CD25⁺ ćeliji (mfi) (Slika 13B).



E



Slika 13. Efekat GYY4137 na regulatorne T limfocite PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa *ex vivo*. A) Čelije PLČ su izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Procentualna zastupljenost Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) unutar CD4⁺ T populacije PLČ određivana je metodom protočne citofluorimetrije. B) Čelije PLČ su izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min, bez dodatne stimulacije. Nivo ekspresije FoxP3 po CD4⁺CD25⁺ ćeliji određivan je metodom protočne citofluorimetrije. C) Čelije PLČ su izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu „istrošenog“ GYY4137 (iGYY) u trajanju od 40 min. Procentualna zastupljenost Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određena je metodom protočne citofluorimetrije. D) Čelije PLČ su izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu natrijum-sulfida (Na₂S, 200 μM) ili standardnog rastvora GYY4137 (GYY, 200 μM). Procentualna zastupljenost Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određena je metodom protočne citofluorimetrije. E) Prikazani su reprezentativni plotovi dobijeni analizom ćelija na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A-D). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

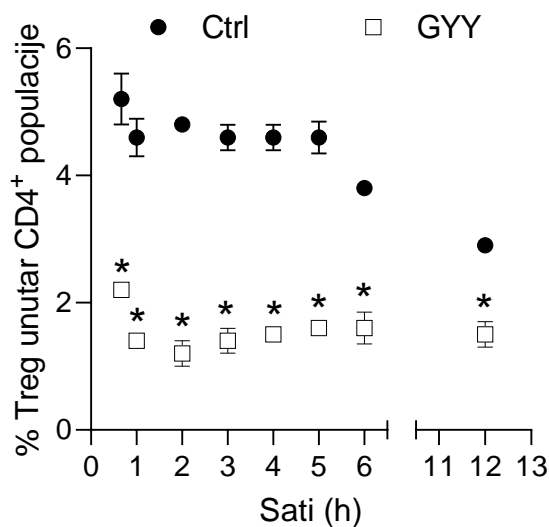
Zatim, kako bi se ispitalo da li su efekti koje GYY4137 ostvaruje na Treg PLČ posredovani H₂S oslobođenim od strane ovog jedinjenja, ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa i izložene „istrošenom“ GYY4137 u trajanju od 40 min. Primena „istrošenog“ GYY4137 nije dovela do promene u procentualnoj zastupljenosti Treg u odnosu na kontrolne ćelije inkubirane bez prisustva GYY4137 (Slika 13C). Ovakav rezultat ukazuje na to da je efekat koji GYY4137 ostvaruje na Treg posredovan H₂S, a ne nekim drugim produktom dekompozicije GYY4137.

Kako bi uloga H₂S u posredovanju efekata koje GYY4137 ostvaruje na Treg bila potvrđena, ćelije PLČ su izložene alternativnom donoru H₂S, Na₂S. Primena Na₂S (200 μM) u trajanju od 40 min je takođe dovela do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ (Slika 13D). Međutim, efekat koji je Na₂S ostvario na udeo Treg je bio znatno manjeg intenziteta od efekta koji je ostvario sam GYY4137: GYY4137 je doveo do smanjenja zastupljenosti Treg za 62% u odnosu na kontrolu, a Na₂S do smanjenja od samo 24%.

Prikazani rezultati pokazuju da GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ, kao i do smanjenja nivoa ekspresije FoxP3 po CD4⁺CD25⁺ ćeliji, nakon kratkotrajnog izlaganja ćelija ovom jedinjenju u trajanju od 40 min. Takođe, efekat koji GYY4137 ostvaruje na udeo Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ je posredovan H₂S, koji se oslobađa od strane ovog jedinjenja.

4.3.4. Kinetika uticaja *ex vivo* primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

Kako bi se ispitala kinetika uticaja GYY4137 na udeo Treg, imunske ćelije PLČ su inkubirane u prisustvu GYY4137 u različitim vremenskim intervalima (40 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h i 12h), bez dodatne stimulacije. Pokazano je da GYY4137 smanjuje procentualnu zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ u svim ispitivanim intervalima (Slika 14). Najizraženiji efekat na udeo Treg GYY4137 ostvaruje nakon 2 h inkubacije, kada dovodi do smanjenja procenta Treg za 75% u odnosu na kontrolu. Veličina efekta koji GYY4137 ostvaruje na procentualnu zastupljenost Treg u odnosu na kontrolu opada sa produžavanjem vremena inkubacije iznad 2 h. Ova pojava nastaje i kao posledica spontanog pada zastupljenosti Treg u kontrolnim uzorcima, koja doprinosi smanjenju razlike između udela Treg u tretiranoj i kontrolnoj grupi.



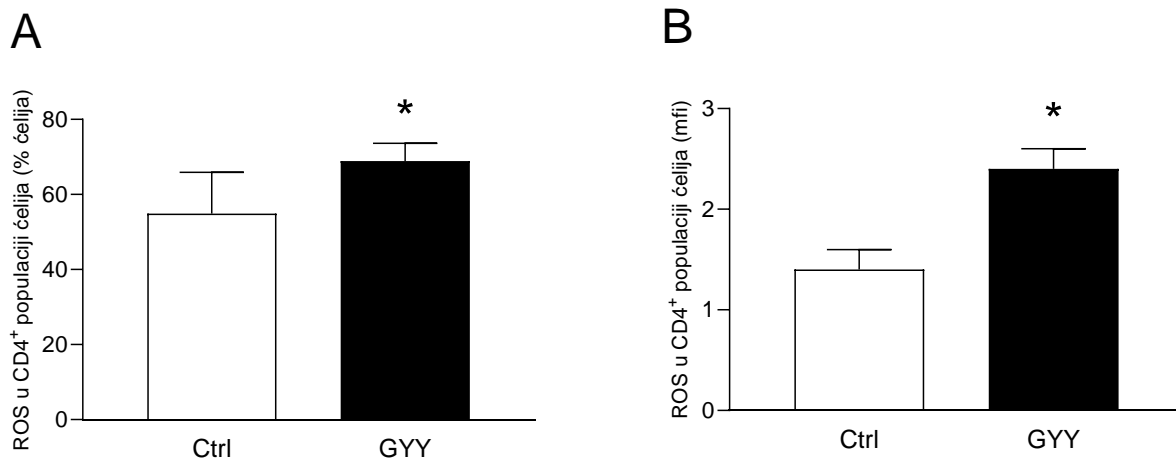
Slika 14. Kinetika uticaja GYY4137 na procentualnu zastupljenost regulatornih T limfocita PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. Ćelije PLČ su izolovane iz miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u različitim vremenskim intervalima (40 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h i 12h). Procentualna zastupljenost Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određen je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

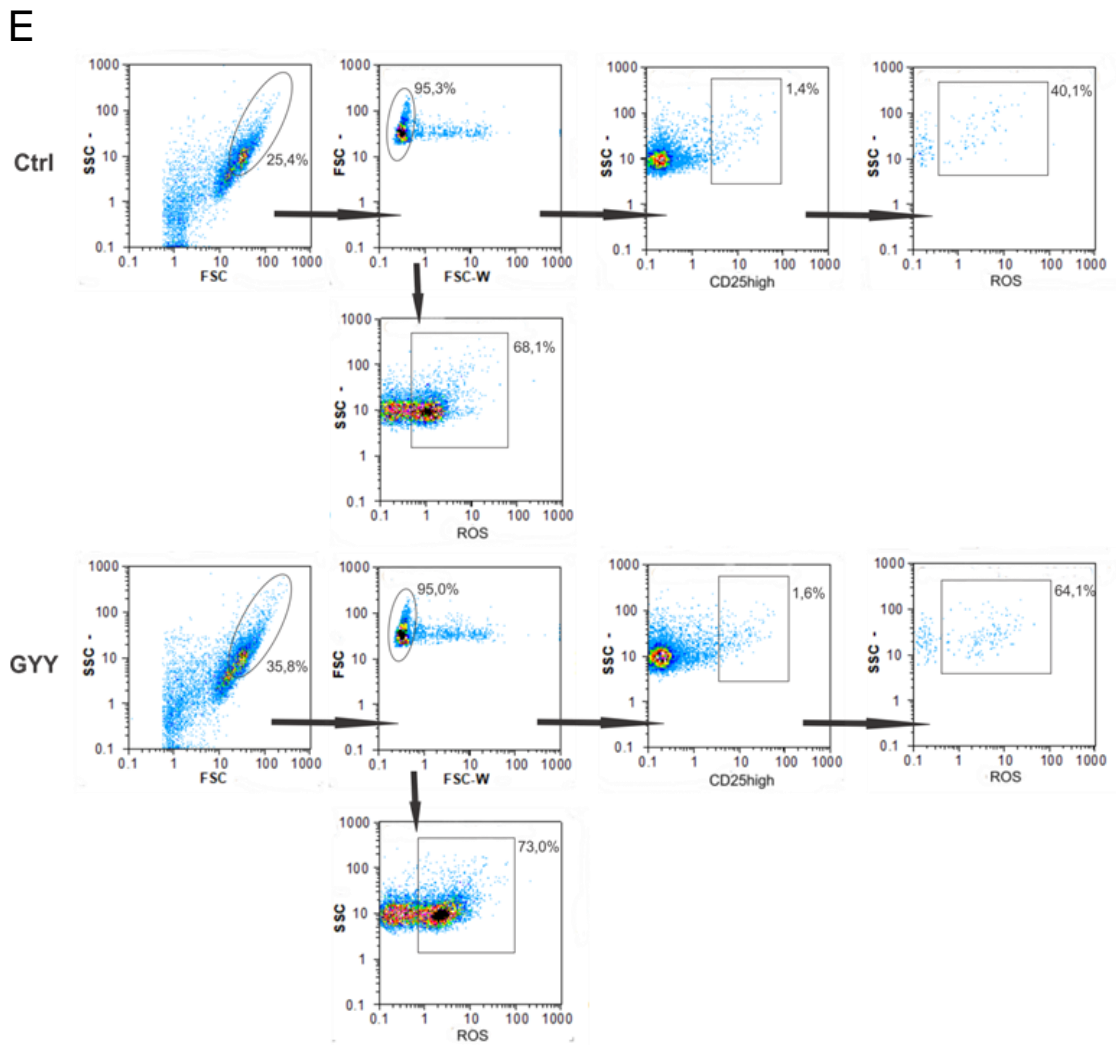
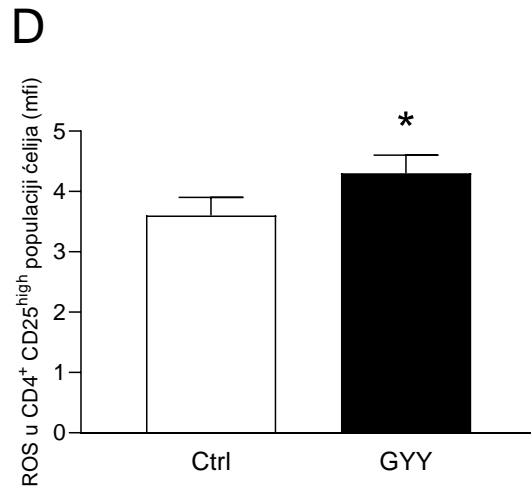
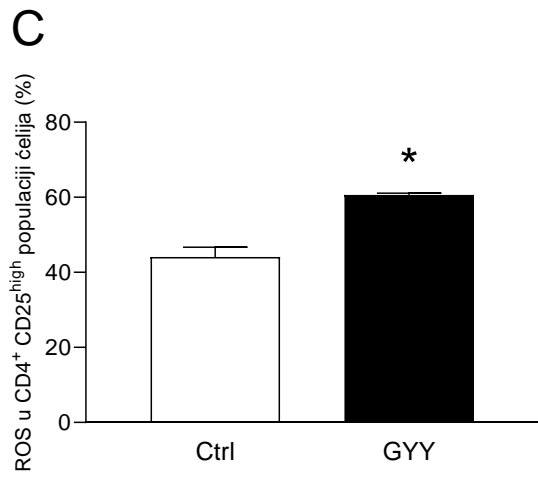
Navedeni rezultati pokazuju da se efekat GYY4137 na zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ zadržava i nakon produženog izlaganja ćelija ovom jedinjenju.

4.3.5. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na produkciju ROS od strane CD4⁺ T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

S obzirom na to da je prethodnim rezultatima pokazano da GYY4137 dovodi do povećanja produkcije ROS u ćelijama mikroglije, ali ne i u DC-ama i makrofagima, sledeći korak je podrazumevao ispitivanje efekta GYY4137 na produkciju ROS od strane još jedne populacije ćelija sa ključnom ulogom u imunopatogenezi EAE-a - CD4⁺ T limfocita. U tu svrhu su metodom magnetne separacije prečišćeni CD4⁺ T limfociti iz ukupne populacije ćelija PLČ izolovanih 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ovako dobijeni CD4⁺ T limfociti su izloženi GYY4137 (200 μM) u ukupnom trajanju od 60 min, pri čemu je poslednjih 40 min inkubacije ćelijama dodat DHR (detektor ROS) i stimulacija u vidu PMA (100 ng/ml). Nakon toga, ćelije su inkubirane sa fluorescentno obeleženim antitelima na CD25, kako bi se omogućilo detektovanje CD4⁺CD25^{high} populacije ćelija, koja se smatra populacijom Treg. Uobičajena detekcija Treg kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija je bila onemogućena zbog nemogućnosti bojenja antitelima na FoxP3 usled nekompatibilnosti metoda. Produkcija ROS od strane različitih populacija CD4⁺ T limfocita je određivana na protočnom citofluorimetru.

Primena GYY4137 je dovela do povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺ T limfocita PLČ koji produkuju ROS (Slika 14A), kao i do povećanja prosečnog intenziteta fluorescencije po ćeliji (Slika 14B). Korišćenje fluorescentno obeleženih antitela na CD25 istovremeno sa bojenjem DHR-om je omogućilo merenje produkcije ROS unutar CD4⁺CD25^{high} populacije ćelija. Primena GYY4137 je dovela do povećanja procenta CD4⁺CD25^{high} ćelija koje produkuju ROS (Slika 14C) i povećanja prosečnog intenziteta fluorescencije po CD4⁺CD25^{high} ćeliji (Slika 14D). Međutim, iako je GYY4137 doveo do povećanja produkcije ROS i unutar ukupne CD4⁺ i unutar CD4⁺CD25^{high} populacije ćelija, efekat na produkciju ROS unutar CD4⁺CD25^{high} populacije je bio izraženiji. U ukupnoj populaciji CD4⁺ T limfocita GYY4137 je doveo do povećanja procentualne zastupljenosti ćelija koje produkuju ROS za 29% u odnosu na kontrolu, dok je u populaciji CD4⁺CD25^{high} ćelija to povećanje iznosilo 39%.



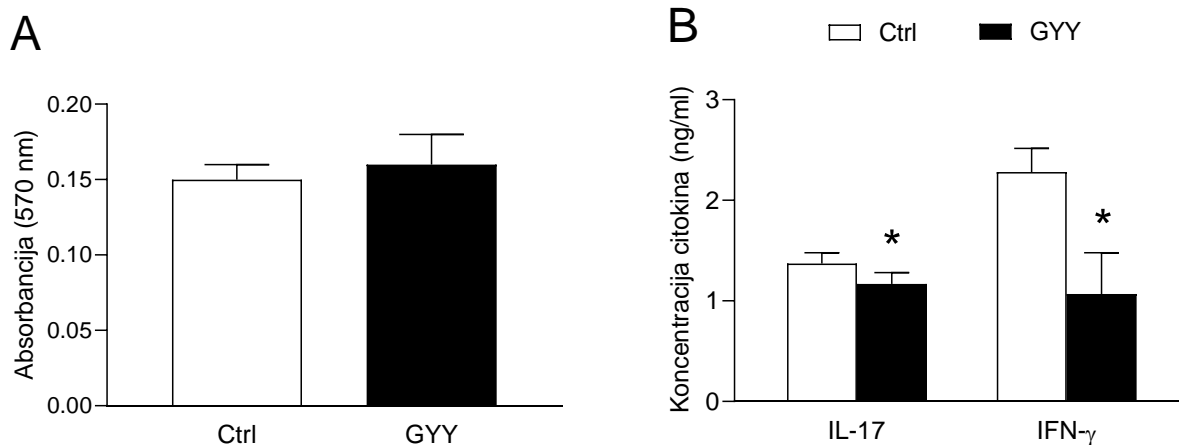


Slika 14. Efekat GYY4137 na produkciju ROS od strane CD4⁺ T limfocita PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. CD4⁺ T limfociti su metodom magnetne separacije prečišćeni iz ćelija PLČ izolovanih 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ovako dobijeni CD4⁺ T limfociti su inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u ukupnom trajanju od 60 min, pri čemu je poslednjih 40 min inkubacije ćelijama dodat DHR (detektor ROS) i stimulacija u vidu PMA (100 ng/ml). Nakon toga, ćelije su inkubirane sa fluorescento obeleženim antitelima na CD25. Procentualna zastupljenost CD4⁺ T limfocita koji produkuju ROS (A), prosečni intenzitet fluorescencije po CD4⁺ ćeliji (B), procentualna zastupljenost CD4⁺CD25^{high} T limfocita koji produkuju ROS (C) i prosečni intenzitet fluorescencije po CD4⁺CD25^{high} ćeliji (D) određivani su na protočnom citofluorimetru. Reprezentativni plotovi dobijeni analizom ćelija na protočnom citofluorimetru prikazani su pod (E). Produkcija ROS je izražena kao procenat ćelija koje produkuju ROS i kao nivo produkcije ROS po ćeliji (mfi). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A-D). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Dobijeni rezultati pokazuju da GYY4137 indukuje povećanu produkciju ROS u svim CD4⁺ T limfocitima, pri čemu je to povećanje najizraženije u populaciji CD4⁺CD25^{high} ćelija (populaciji Treg).

4.3.6. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova

S obzirom na to da je prethodno pokazano da *ex vivo* primena GYY4137 redukuje produkciju encefalitogenih citokina IFN-γ i IL-17 u ćelijama PLČ imunizovanih miševa, sledeći korak je bio ispitati da li se isti fenomen ispoljava i na pacovskom modelu. Ćelije PLČ su izolovane sedmog dana nakon imunizacije pacova emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izložene GYY4137 (200 μM) u trajanju od 24h. U cilju restimulacije T limfocita, ćelijama je tokom inkubacije sa GYY4137 dodat peptid MOG₃₅₋₅₅. Određivanje vijabilnosti ćelija PLČ MTT testom je pokazalo da GYY4137 ne ostvaruje uticaj na vijabilnost ovih ćelija nakon 24h inkubacije (Slika 15A). Merenjem produkcije citokina IFN-γ i IL-17 u supernatantima ćelijskih kultura ELISA testom pokazano je da GYY4137 smanjuje produkciju ovih citokina u ćelijama PLČ (Slika 15B).



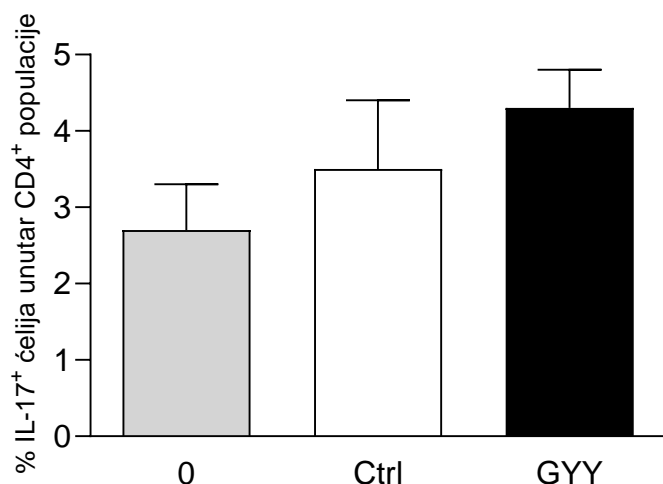
Slika 15. Efekat GYY4137 na vijabilnost i produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama PLČ imunizovanih pacova *ex vivo*. Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA pacova emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200

μM) i simultano stimulisane peptidom MOG₃₅₋₅₅ (15 $\mu\text{g/ml}$). Nakon 24h određivana je vijabilnost ćelija testom MTT (A) i koncentracija citokina IL-17 i IFN- γ u supernatantima ćelijskih kultura metodom ELISA (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Navedeni rezultati pokazuju da GYY4137 redukuje produkciju IL-17 i IFN- γ u ćelijama PLČ pacova, pritom ne utiči na njihovu vijabilnost.

4.3.7. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova

Nakon određivanja efekta GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina, naredni korak je bio određivanje njegovog uticaja na encefalitogenu subpopulaciju Th17 limfocita PLČ u pacovskom modelu. U tu svrhu su ćelije PLČ izolovane sedmog dana nakon imunizacije pacova emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izložene GYY4137 (200 μM) u ukupnom trajanju od 4,5 h. Prvih 40 min inkubacije GYY4137 je primenjen samostalno, a zatim je ćelijama dodata stimulacija u vidu jonomicina (1,3 μM) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μM) i monensina (2 μM), do isteka inkubacije od 4,5 h. Procenat Th17 limfocita, koji su definisani kao CD4⁺ IL-17⁺ ćelije, određivan je metodom protočne citofluorimetrije. U skladu sa rezultatima na mišjem modelu, GYY4137 nije uticao na procentualnu zastupljenost Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ pacova u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 16). Takođe, upoređivanjem udela Th17 limfocita unutar populacije ćelija PLČ izloženih rastvaraču GYY4137 (DMSO) i ćelija PLČ inkubiranih u odsustvu DMSO, pokazano je da DMSO ne ostvaruje uticaj na Th17 limfocite PLČ (Slika 16).



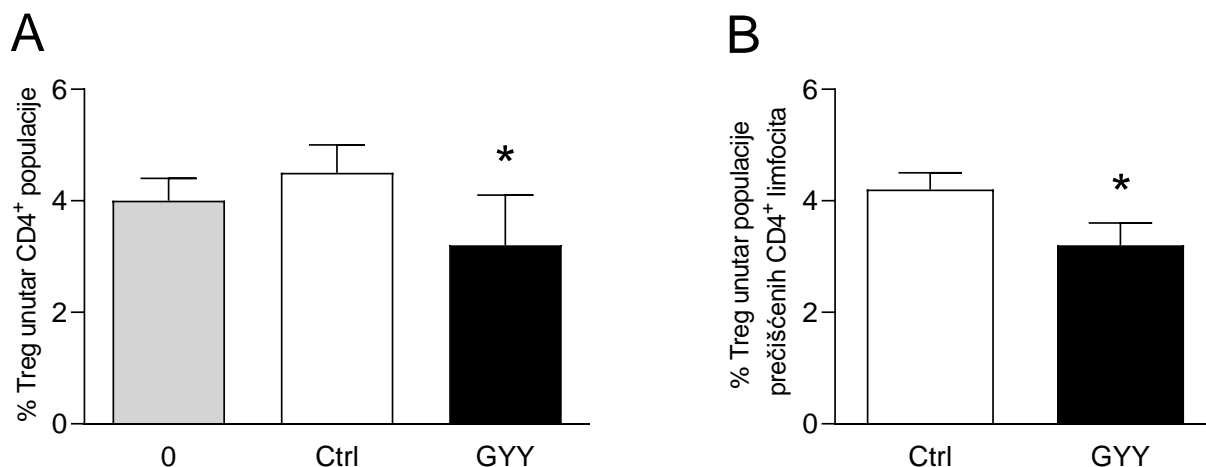
Slika 16. Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Th17 limfocita unutar populacije ćelija PLČ imunizovanih DA pacova *ex vivo*. Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA pacova emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 4,5 h. Ćelije inkubirane u prisustvu rastvarača GYY4137 (DMSO) su označene kao kontrola (Ctrl), a ćelije inkubirane u odsustvu DMSO i GYY4137 kao 0. Ćelije su nakon prvih 40 min inkubacije u prisustvu GYY4137 dodatno stimulisane jonomicinom (1,3 μM) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μM) i monensina (2 μM), do isteka ukupnog vremena inkubacije. Procenat IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ populacije ćelija (Th17 limfocita) određen je nakon 4,5h inkubacije metodom protočne

citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta.

Na osnovu navedenih rezultata se može zaključiti da, kao i u mišjem modelu, GYY4137 ne utiče na udeo Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ imunizovanih pacova.

4.3.8. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova

Naredni korak je podrazumevao određivanje uticaja GYY4137 na subpopulaciju Treg PLČ imunizovanih pacova. Efekat GYY4137 na udeo Treg je ispitivan nakon 40 min od izlaganja ćelija PLČ ovom jedinjenju, bez dodatne stimulacije. Procentualna zastupljenost Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ redukovana je nakon primene GYY4137 (Slika 17A). Isti efekat na zastupljenost Treg primećen je i nakon primene GYY4137 na CD4⁺ T limfocite prečišćene iz ukupne populacije ćelija PLČ pacova, ukazujući na to da GYY4137 svoj efekat ostvaruje direktno na CD4⁺ T limfocite (Slika 17B). Takođe, upoređivanjem udela Treg unutar populacije ćelija PLČ izloženih rastvaraču GYY4137 (DMSO) i ćelija PLČ inkubiranih u odsustvu DMSO, pokazano je da DMSO ne ostvaruje uticaj na Treg PLČ (Slika 17A).



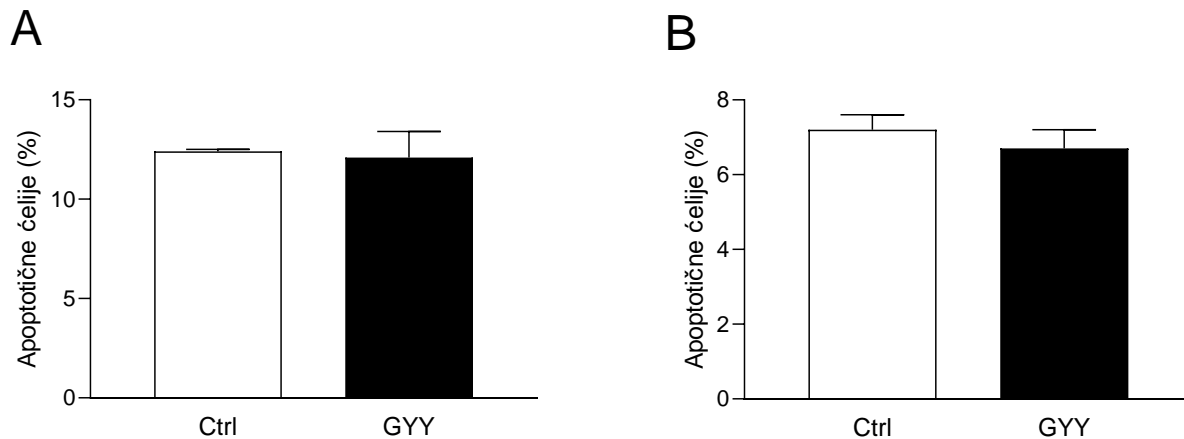
Slika 17. Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Treg unutar populacije ćelija PLČ imunizovanih DA pacova *ex vivo*. A) Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA pacova emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min. Ćelije inkubirane u prisustvu rastvarača GYY4137 (DMSO) su označene kao kontrola (Ctrl), a ćelije inkubirane u odsustvu DMSO i GYY4137 kao 0. Procenat Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određen je metodom protočne citofluorimetrije. B) Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, a zatim su CD4⁺ T limfociti prečišćeni magnetnom separacijom iz ukupne populacije ćelija PLČ i inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min. Procenat Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija) unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ određen je metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Navedeni rezultati pokazuju da GYY4137 dovodi do smanjenja udela Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ, što je u korelaciji s rezultatima na mišjem modelu. Uz to, GYY4137 svoj efekat na Treg ostvaruje direktnim delovanjem na CD4⁺ T limfocite.

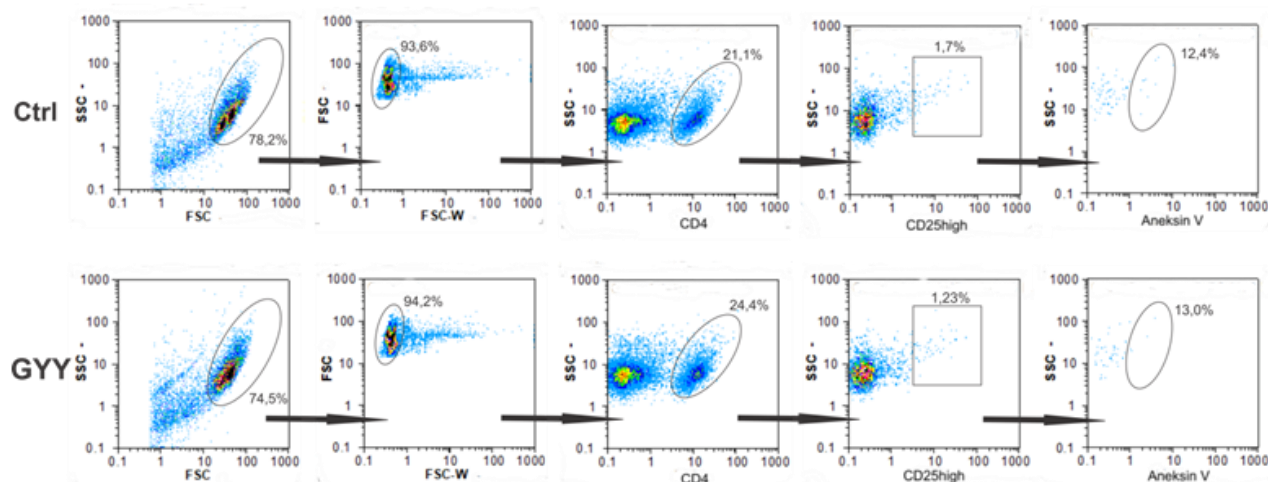
4.4. Mehanizmi kojima GYY4137 ostvaruje svoj efekat na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

4.4.1. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na apoptozu regulatornih T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

U cilju ispitivanja mehanizma kojim GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ ispitivan je uticaj ovog jedinjenja na apoptozu Treg. U tu svrhu su ćelije PLČ nakon 40 min izlaganja GYY4137 (200 μM) pripremane za analizu na protočnom citofluorimetru. Procenat apoptotičnih, aneksin V-pozitivnih ćelija određivan je unutar populacije regulatornih T limfocita, koji su deifisani kao CD4⁺CD25^{high} ćelije. Uobičajena detekcija Treg kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija je bila onemogućena zbog nemogućnosti bojenja antitelima na FoxP3 usled nekompatibilnosti metoda. Dobijeni rezultati su pokazali da ne postoji razlika u procentualnoj zastupljenosti apoptotičnih ćelija unutar populacije Treg između kontrolnih i tretiranih uzoraka (Slika 21A).



C



Slika 18. Efekat GYY4137 na apoptozu regulatornih T limfocita PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. Čelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ukupne čelije PLČ (A) ili CD4⁺ T limfociti prečišćeni magnetnom separacijom iz populacije čelija PLČ (B) su inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min. Nakon toga, čelije su obeležavane aneksinom V, CD4 i CD25 antitelom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Procenat apoptotičnih čelija određivan je unutar CD4⁺CD25^{high} populacije (A) ili unutar CD25^{high} populacije (B). Reprezentativni plotovi dobijeni analizom ukupne populacije čelija PLČ na protočnom citofluorimetru prikazani su pod (C). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A,B). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

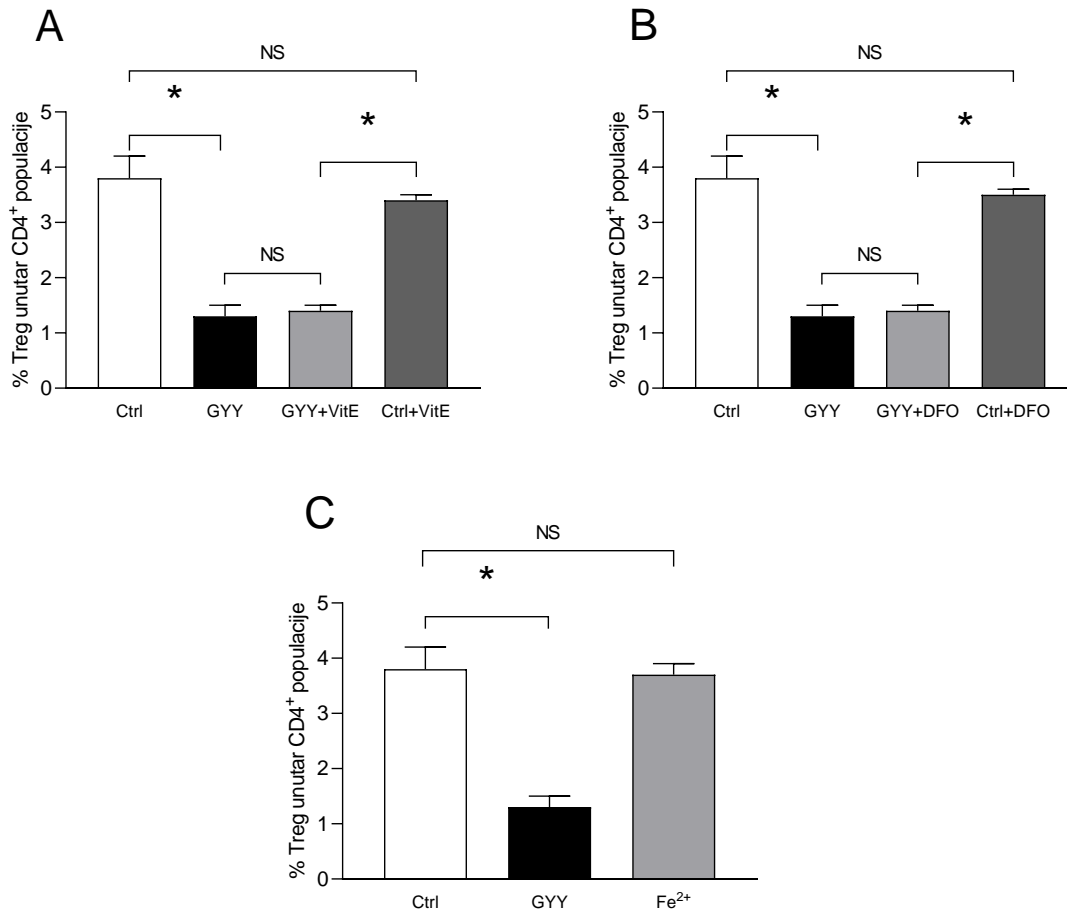
Kako bi se potvrdilo da indukcija apoptoze u populaciji Treg nije mehanizam kojim GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti ove subpopulacije čelija, CD4⁺ T limfociti su magnetnom separacijom prečišćeni iz populacije čelija PLČ i zatim izloženi GYY4137 (200 μM) u trajanju od 40 min. Procenat apoptotičnih čelija je određivan aneksin V bojenjem unutar populacije CD25^{high} čelija. Ni nakon izlaganja prečišćenih CD4⁺ T limfocita GYY4137 nije došlo do povećanja udela apoptotičnih čelija u populaciji Treg (Slika 18B).

Navedeni rezultati pokazuju da indukcija apoptoze u populaciji Treg nije mehanizam kojim GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti ovih čelija unutar CD4⁺ populacije čelija PLČ.

4.4.2. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na ferroptozu regulatornih T limfocita poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

Povećana produkcija i akumulacija ROS karakterišu poseban tip programirane ćelijske smrti, ferroptozu. Prethodnim rezultatima je pokazano da je efekat GYY4137 na produkciju ROS znatno izraženiji u populaciji CD4⁺CD25^{high} čelija u odnosu na ukupnu populaciju CD4⁺ T limfocita. S obzirom na to da se CD4⁺CD25^{high} populacija T limfocita smatra regulatornim T limfocitima, naredni cilj je bio ispitati da li je indukcija ferroptoze mehanizam posredstvom koga GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar CD4⁺ populacije čelija PLČ. U tu svrhu, čelije PLČ imunizovanih miševa su

neposredno pre izlaganja GYY4137 inkubirane u prisustvu inhibitora ferroptoze - vitamina E (VitE) i deferoksamina (DFO), pri čemu su oba primenjena u koncentraciji 100 μ M. Inhibitori ferroptoze su primenjeni 40 min (VitE) ili 15 min (DFO) pre dodavanja GYY4137, dok je inkubacija u prisustvu GYY4137 trajala 40 min. Analiza zastupljenosti Treg nije pokazala razliku između ćelija inkubiranih sa GYY4137 i ćelija inkubiranih sa GYY4137 u prisustvu inhibitora ferroptoze VitE (Slika 19A) ili DFO (Slika 19B). Takođe, kada su inhibitori ferroptoze primenjeni samostalno, nisu doveli do promene u udelu Treg u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 19A i 19B).



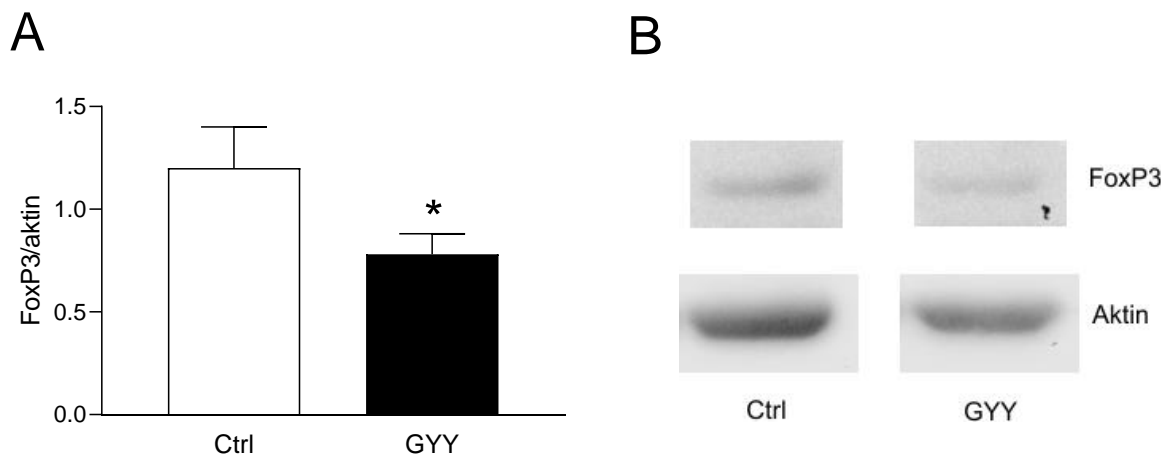
Slika 19. Efekat GYY4137 na ferroptozu regulatornih T limfocita PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. A) Ćelije PLČ su izložene delovanju inhibitora ferroptoze VitE (100 μ M) 40 min pre primene GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 40 min (GYY+VitE). Ćelije izložene VitE u odsustvu GYY4137 su označene kao Ctrl+VitE. B) Ćelije PLČ su izložene delovanju inhibitora ferroptoze DFO (100 μ M) 15 min pre primene GYY4137 u trajanju od 40 min (GYY+DFO). Ćelije izložene DFO u odsustvu GYY4137 su označene kao Ctrl+DFO. C) Ćelije PLČ su izložene delovanju 1 μ g/ml gvožđe(II)-amonijumcitrate u trajanju od 40 min (Fe²⁺). Ćelije inkubirane u odsustvu GYY4137, inhibitora ferroptoze i jona gvožđa su označene kao kontrola (Ctrl). Procentualna zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ je određena na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odgovarajućim poređenjima. NS – nema statističke značajnosti.

Feroptoza je tip programirane ćelijske smrti koji indukuju različiti mali molekuli i jedinjenja, istovremeno indukujući i akumulaciju jona gvožđa. Upravo je akumulacija jona gvožđa jedno od karakterističnih svojstava ovog tipa programirane ćelijske smrti. Kako bi se potvrdilo da indukcija feroptoze nije mehanizam kojim GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg, u cilju podražavanja uslova karakterističnih za feroptozu, ćelije PLČ su izložene gvožđe(II)-amonijumcitratu (1 µg/ml) u trajanju od 40 min. Rezultati su pokazali da prisustvo dvovalentnog jona gvožđa nije dovelo do smanjenja zastupljenosti Treg u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 19C).

Prikazani rezultati ukazuju da indukcija feroptoze nije mehanizam posredstvom kog GYY4137 ostvaruje svoj efekat na procentualnu zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija poplitealnih limfnih čvorova.

4.4.3. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na ekspresiju transkripcionog faktora FoxP3 u CD4⁺ T limfocitima poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

S obzirom na to da su Treg definisani kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelije, u cilju utvrđivanja mehanizma kojim GYY4137 ostvaruje uticaj na udeo ovih ćelija, ispitan je uticaj GYY4137 na ekspresiju transkripcionog faktora FoxP3 u CD4⁺ T limfocitima PLČ. U tu svrhu, CD4⁺ T limfociti su magnetnom separacijom prečišćeni iz ukupne populacije ćelija PLČ miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izloženi delovanju GYY4137 (200 µM) u trajanju od 40 min. Nakon toga su iz ćelija izolovani ukupni proteini i pripremljeni za analizu metodom Western blot. Merenjem nivoa ekspresije proteina FoxP3 pokazano je da GYY4137 dovodi do smanjenja relativne ekspresije ovog proteina u odnosu na ekspresiju aktina u CD4⁺T limfocitima prečišćenim iz PLČ u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 20).



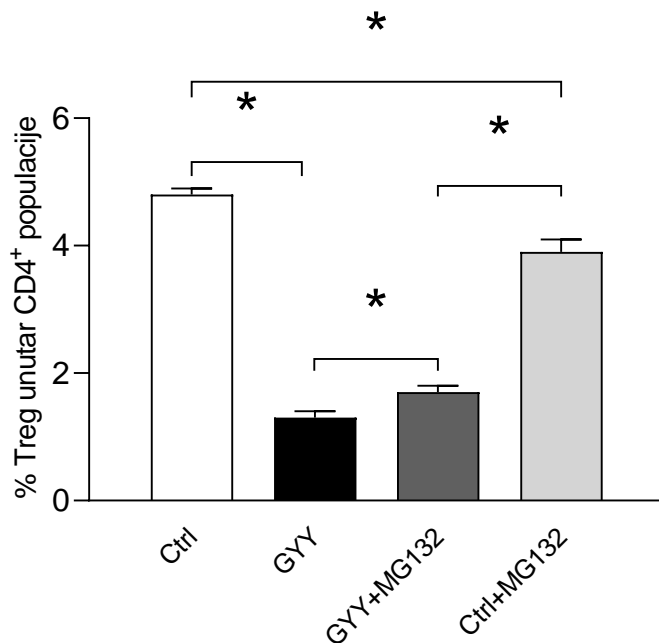
Slika 20. Efekat GYY4137 na relativnu ekspresiju proteina FoxP3 u CD4⁺ T limfocitima PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. A) CD4⁺ T limfociti su metodom magnetne separacije prečišćeni iz populacije ćelija PLČ izolovanih 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ovako dobijeni CD4⁺ T limfociti su inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 µM) u trajanju od 40 min, nakon čega su iz ovih ćelija izolovani ukupni proteini. Relativni nivo ekspresije proteina FoxP3 u odnosu na ekspresiju aktina određen je metodom Western blot. B) Prikazane su reprezentativne proteinske trake detektovane metodom Western blot. Rezultati su

prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da je jedan od mehanizama kojima GYY4137 ostvaruje efekat na udeo Treg najverovatnije smanjenje ekspresije proteina FoxP3.

4.4.4. Značaj proteazomalne degradacije za efekat koji GYY4137 ostvaruje na regulatorne T limfocite poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih C57BL/6 miševa

Ubikvitinacija i posledična proteazomalna degradacija predstavlja jedan od posttranslacionih mehanizama regulacije ekspresije proteina FoxP3, a samim tim i mehanizam regulacije stabilnosti i funkcije Treg. Stoga je u narednom koraku ispitano da li stimulacija procesa proteazomalne degradacije predstavlja jedan od mehanizama posredstvom kojih GYY4137 dovodi do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg. Kako bi ova pretpostavka bila proverena, ćelije PLČ su izolovane sedam dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izložene GYY4137 (200 μM), u prisustvu ili odsustvu inhibitora proteazoma MG132 (10 μM), u trajanju od 4h. Primena GYY4137 u prisustvu inhibitora proteazoma je dovela do statistički značajnog povećanja procentualne zastupljenosti Treg u odnosu na ćelije inkubirane samo u prisustvu GYY4137 (Slika 21). Istovremena primena MG132 i GYY4137 je dovela do smanjenja zastupljenosti Treg za 56% u odnosu na odgovarajuću kontrolu, dok je GYY4137 u odsustvu inhibicije proteazoma indukovao smanjenje udela ovih ćelija za 74% u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Dakle, iako je samostalno primenjen MG132 doveo do blagog, ali statistički značajnog, smanjenja procentualne zastupljenosti Treg u odnosu na odgovarajuću kontrolu, ovi rezultati ukazuju na to da inhibicija proteazoma dovodi do ublažavanja efekta koji GYY4137 ostvaruje na zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ. Može se zaključiti da je proteazomalna degradacija značajna za ispoljavanje efekta koji GYY4137 ostvaruje na udeo Treg, pri čemu se uloga proteazomalne degradacije najverovatnije ogleda u degradaciji transkripcionog faktora FoxP3.

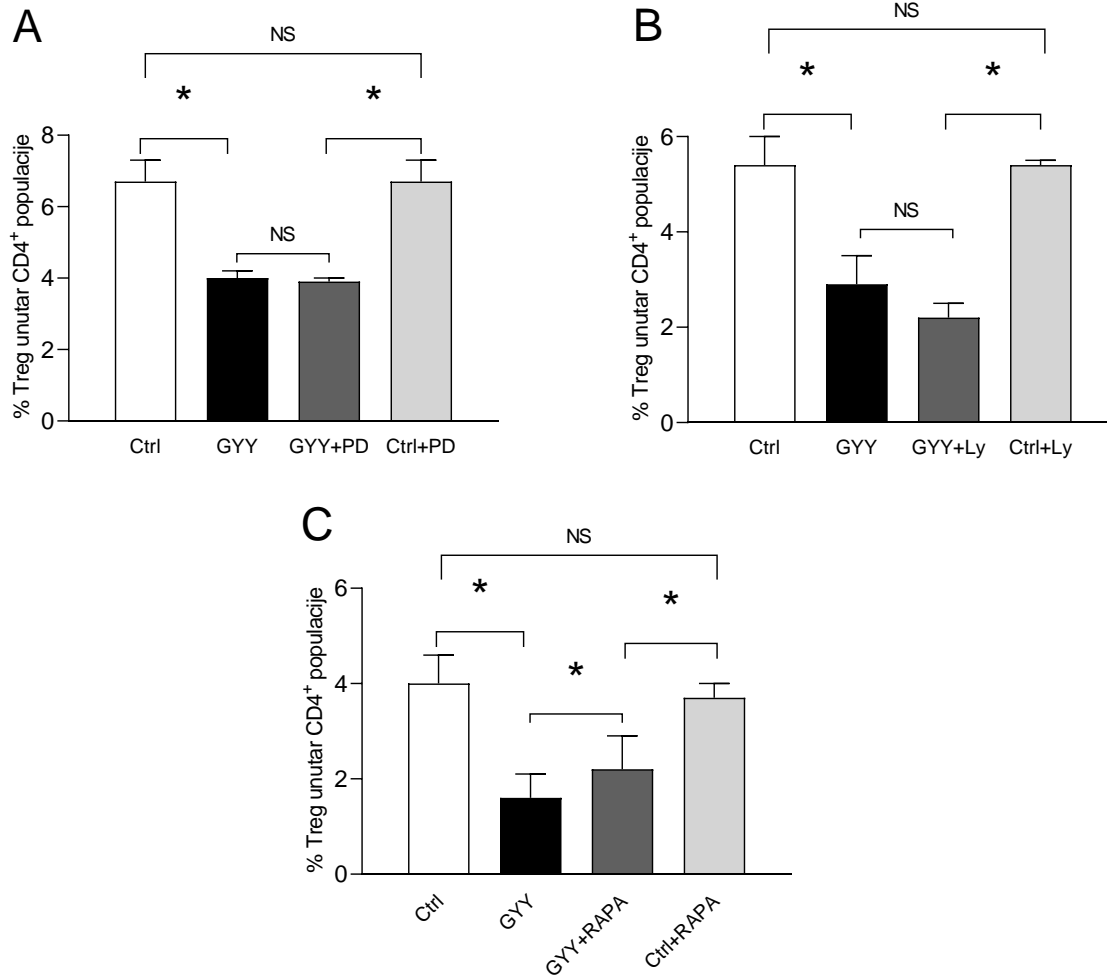


Slika 21. Značaj proteazomalne degradacije za efekat koji GYY4137 ispoljava na procentualnu zastupljenost Treg. Čelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i izložene GYY4137 (200 μM) u odsustvu (GYY) ili prisustvu (GYY+MG132) inhibitora proteazoma MG132 (10 μM) u trajanju od 4 h. Čelije koje nisu izložene GYY4137 i MG132 su označene kao kontrola (Ctrl). Čelije koje nisu izložene GYY4137, ali su inkubirane u prisustvu MG132 su označene kao Ctrl+MG132. Procentualna zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ je određena na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odgovarajućim poređenjima.

Navedeni rezultati pokazuju da je aktivnost proteazoma bitna za efekat koji GYY4137 ostvaruje na udeo Treg. Na osnovu toga se može pretpostaviti da je jedan od mehanizama redukcije ekspresije FoxP3 stimulacija njegove proteazomalne degradacije.

4.4.5. Interakcija GYY4137 sa signalnim putevima u kojima učestvuju kinaze mTOR, ERK i Akt

S obzirom na to da je poznato da H₂S interaguje sa velikim brojem signalnih puteva u ćelijama, sledeći cilj je bio ispitati da li se efekat GYY4137 na Treg ostvaruje kroz modulaciju signalnih puteva od značaja za proliferaciju i stabilnost ovih ćelija. Kako bi se proverila mogućnost da GYY4137 svoje dejstvo na Treg ostvaruje kroz stimulaciju signalnih puteva u kojima učestvuju kinaze mTOR, ERK i Akt, ćelije PLČ imunizovanih miševa su 15 min pre izlaganja GYY4137 izložene odgovarajućim inhibitorima: inhibitorom kinaze ERK (PD98059, 40 μM), inhibitorom kinaze Akt (Ly294002, 40 μM) ili inhibitorom kinaze mTOR (rapamicin, 100 ng/ml). Nakon inkubacije od 2 h određivana je procentualna zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ. Primena inhibitora kinaza ERK (Slika 22A) ili Akt (Slika 22B) nije umanjila ili poništila efekat koji GYY4137 ostvaruje na Treg. Jedino je rapamicin doveo do ublažavanja efekta koji GYY4137 ostvaruje na udeo Treg, ukazujući na posredovanje kinaze mTOR ili neke od nizvodnih kinaza ovog signalnog puta u efektima GYY4137 (Slika 22C). Samostalno primenjeni inhibitori nisu doveli do promena u procentu Treg u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 22A, B, C).

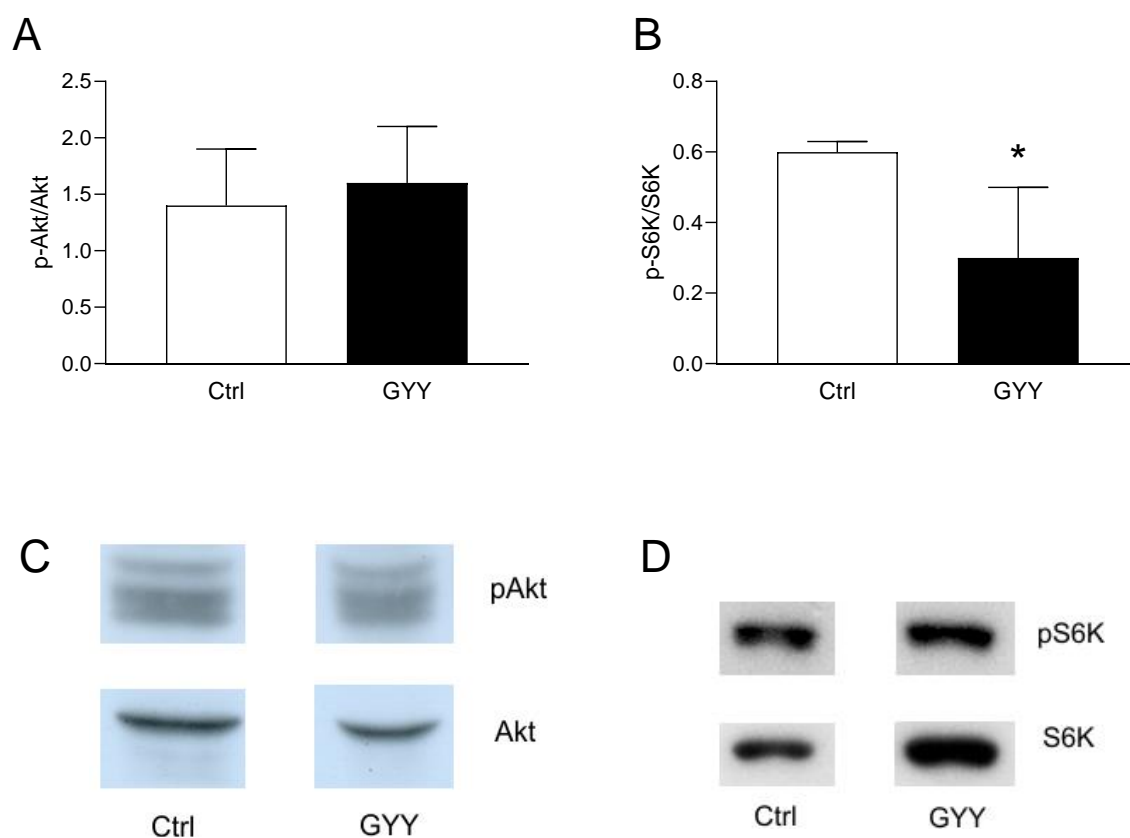


Slika 22. Uticaj inhibitora kinaze ERK, Akt i mTOR na efekat koji GYY4137 ostvaruje na procentualnu zastupljenost Treg PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. Čelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i inkubirane u odsustvu ili prisustvu inhibitora kinaze ERK (PD98059, 40 μM) (A), inhibitora kinaze Akt (Ly294002, 40 μM) (B) ili inhibitora kinaze mTOR (rapamicin, 100 ng/ml) (C) 15 min pre izlaganja GYY4137 (200 μM). Netretirane ćelije su označene kao kontrola (Ctrl), ćelije izložene samo GYY4137 kao GYY, ćelije istovremeno izložene GYY4137 i PD98059 kao GYY+PD, ćelije izložene samo PD98059 kao Ctrl+PD, ćelije istovremeno izložene GYY4137 i Ly294002 kao GYY+Ly, ćelije izložene samo Ly294002 kao Ctrl+Ly, ćelije istovremeno izložene GYY4137 i rapamicinu kao GYY+RAPA, ćelije izložene samo rapamicinu kao Ctrl+RAPA. Nakon 2 h inkubacije određivana je procentualna zastupljenost Treg unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 predstavlja statističku značajnost u odgovarajućim poređenjima. NS – nema statističke značajnosti.

Navedeni rezultati ukazuju na to da jedan od mehanizama koji posreduje u efektu koji GYY4137 ostvaruje na Treg PLČ može biti stimulacija signalnog puta mTOR.

4.4.6. Efekat GYY4137 na aktivaciju kinaza Akt i S6 u CD4⁺ T limfocitima poplitealnih limfnih čvorova imunizovanih miševa

S obzirom na to da je inhibicija mTOR signalnog puta ublažila efekte koje GYY4137 ostvaruje na udeo Treg, naredni korak je podrazumevao ispitivanje uticaja GYY4137 na aktivaciju nishodnih kinaza ovog signalnog puta: Akt i S6 kinazu (S6K). U tu svrhu su CD4⁺ T limfociti magnetnom separacijom prečišćeni iz ukupne populacije ćelija PLČ imunizovanih miševa, a zatim izloženi GYY4137 (200 μM). Nakon 40 min inkubacije izolovani su ukupni proteini i pripremljeni za analizu metodom Western blot. Merenjem ukupne i fosforilisane forme kinaze Akt došlo se do zaključka da GYY4137 ne utiče na njenu aktivaciju (Slika 23A, 23C). S druge strane, pokazano je da GYY4137 dovodi do redukcije relativnog nivoa fosforilisane forme S6 kinaze i ujedno smanjenja njene aktivacije (Slika 23B, 23D).



Slika 23. Efekat GYY4137 na relativnu ekspresiju fosforilisane forme kinaze Akt i S6 u CD4⁺ T limfocitima prečišćenim iz populacije ćelija PLČ imunizovanih C57BL/6 miševa. CD4⁺ T limfociti su metodom magnetne separacije prečišćeni iz ćelija PLČ izolovanih 7 dana nakon imunizacije miševa emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Ovako dobijeni CD4⁺ T limfociti su inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μM) u trajanju od 40 min, nakon čega su iz ćelija izolovani ukupni proteini. Odnos proteina p-Akt/Akt (A) i p-S6K/S6K (B) je određen metodom Western blot. Prikazane su reprezentativne proteinske trake za p-Akt i Akt (C) i p-S6K i S6K (D). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A,B). *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

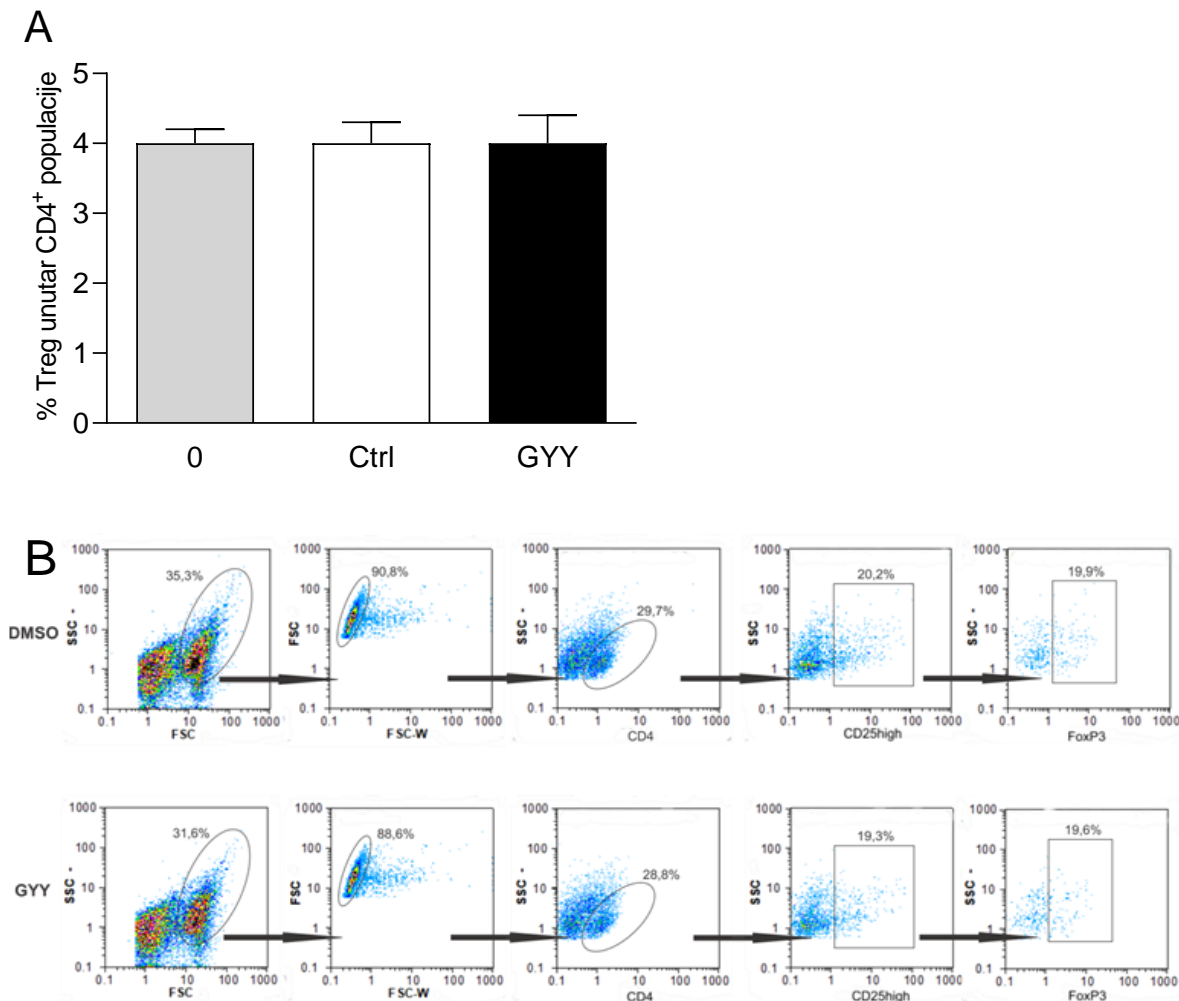
Ovakvi rezultati pokazuju da GYY4137 ne utiče na aktivaciju kinaze Akt, ali dovodi do redukcije aktivacije S6 kinaze u CD4⁺ T limfocitima PLČ imunizovanih miševa. Takođe, ovi rezultati pokazuju i da GYY4137 ne dovodi do stimulacije signalnog puta mTOR prilikom delovanja na Treg.

4.5. Imunomodulacijski efekat *ex vivo* primene GYY4137 na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

4.5.1. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na regulatorne T limfocite izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

Nakon određivanja efekta koji GYY4137 ostvaruje na imunske ćelije sekundarnih limfnih organa imunizovanih pacova, sledeći korak je bio određivanje efekta koji ovo jedinjenje ostvaruje na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a. U tu svrhu, imunske ćelije su izolovane na piku bolesti iz kičmene moždine DA pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA.

Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Treg određivan je nakon 40 min izlaganja imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine ovom jedinjenju. Za razliku od efekta koji je ostvario na Treg PLČ, GYY4137 nije uticao na udeo Treg unutar CD4⁺ populacije imunskih ćelija kičmene moždine (Slika 24).

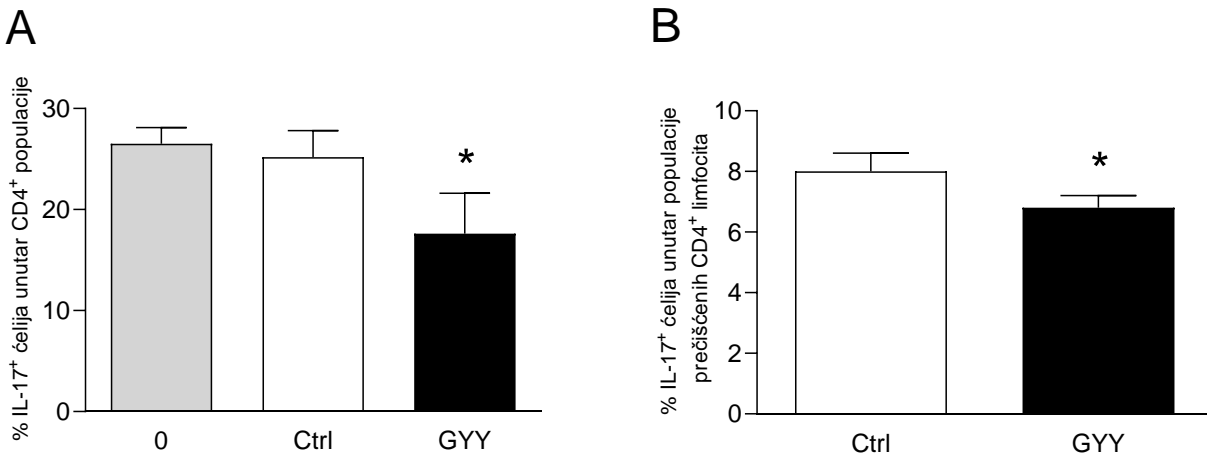


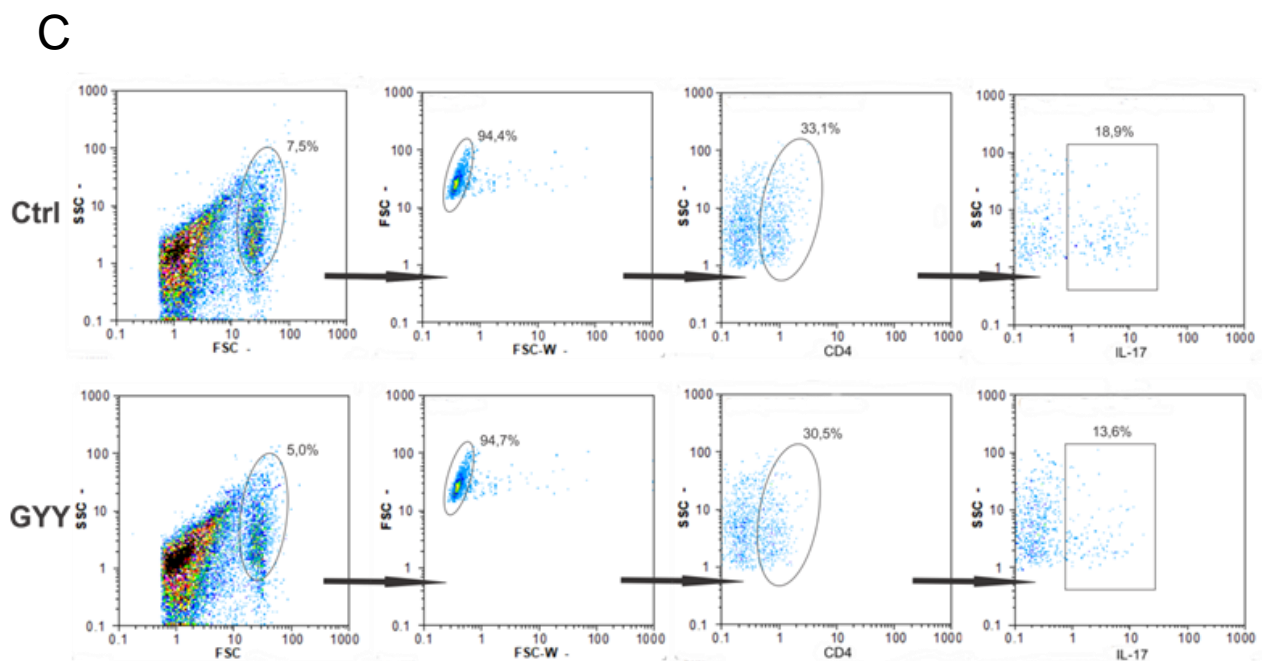
Slika 24. Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Treg izolovanih iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a *ex vivo*. Imunske ćelije su izolovane na piku bolesti iz kičmene moždine pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA. Dobijene ćelije su zatim inkubirane u prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 40 min. Ćelije inkubirane u prisustvu rastvarača GYY4137 (DMSO) su označene kao kontrola (Ctrl), a ćelije inkubirane u odsustvu DMSO i GYY4137 kao 0. Nakon 40 min inkubacije određivan je procenat Treg u CD4⁺ populaciji imunskih ćelija kičmene moždine (A). Reprezentativni plotovi dobijeni analizom ćelija na protočnom citofluorimetru prikazani su pod (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A). * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Navedeni rezultati pokazuju da GYY4137 ne dovodi do smanjenja udela Treg unutar CD4⁺ populacije imunskih ćelija kičmene moždine.

4.5.2. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na Th17 limfocite izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

U cilju određivanja efekta GYY4137 na udeo Th17 limfocita, imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine su izložene GYY4137 u trajanju od 4,5 h, pri čemu je nakon 40 min ćelijama dodata stimulacija u vidu jonomicina (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka inkubacije. Dok sam DMSO nije ostvario uticaj na udeo Th17 limfocita, GYY4137 je doveo do smanjenja procentualne zastupljenosti Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije imunskih ćelija kičmene moždine (Slika 25A). Takođe, isti efekat na udeo Th17 limfocita GYY4137 je ostvario nakon tretmana CD4⁺ T limfocita prečišćenih iz ukupne populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine pacova (Slika 25B).





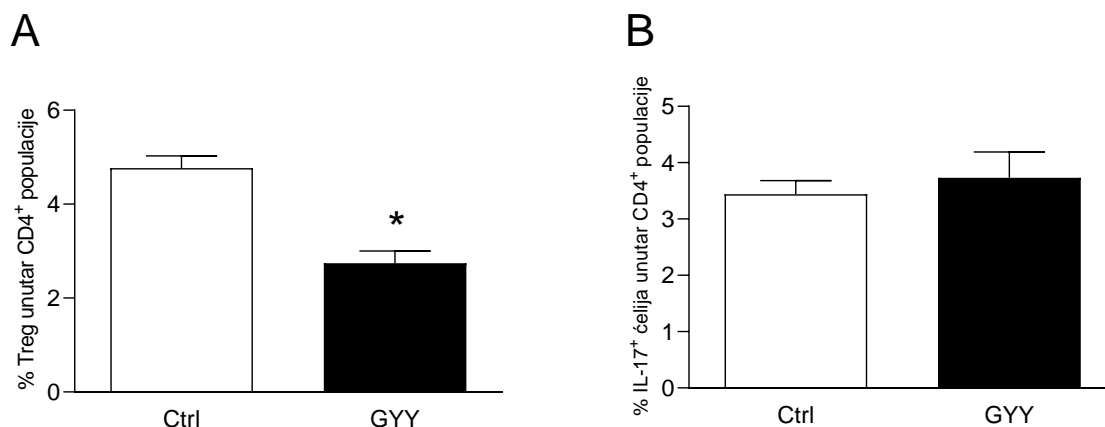
Slika 25. Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Th17 limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a *ex vivo*. A) Imunske ćelije su izolovane na piku bolesti iz kičmene moždine pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 4,5 h. Ćelije su nakon prvih 40 min inkubacije dodatno stimulisane jonomicinom (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 4,5 h. Procenat IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th17 limfocita) određen je metodom protočne citofluorimetrije. B) CD4⁺ T limfociti su magnetnom separacijom prečišćeni iz ukupne populacije imunskih ćelija izolovanih na piku bolesti iz kičmene moždine pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA, i inkubirani u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 4,5 h. Ćelije su nakon prvih 40 min inkubacije dodatno stimulisane jonomicinom (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije od 4,5 h. Procenat IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th17 limfocita) određen je metodom protočne citofluorimetrije. C) Prikazani su reprezentativni plotovi dobijeni analizom ćelija na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (A,B). * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Ovakvi rezultati pokazuju da GYY4137 dovodi do smanjenja udela Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije imunskih ćelija kičmene moždine. Uz to, GYY4137 svoj efekat na Th17 limfocite ostvaruje direktnim delovanjem na CD4⁺ T limfocite.

4.5.3. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na regulatorne T limfocite i Th17 limfocite poplitealnih limfnih čvorova DA pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA

Dakle, efekat koji GYY4137 ostvaruje na zastupljenost Treg i Th17 limfocita unutar populacije imunskih ćelija kičmene moždine je suprotan od efekta koji ovo jedinjenje ostvaruje na zastupljenost

istih subpopulacija T limfocita unutar populacije ćelija PLČ imunizovanih pacova. Kako bi se potvrdilo da navedena razlika u efektu GYY4137 nije posledica razlike u imunizaciji (MOG₃₅₋₅₅ u CFA za ćelije PLČ, HKM u CFA za imunske ćelije kičmene moždine), ćelije PLČ su izolovane sedmog dana nakon imunizacije pacova emulzijom HKM u CFA i zatim izložene GYY4137 u trajanju od 40 min. Alternativno, ćelije PLČ ovako imunizovanih pacova su izložene GYY4137 u trajanju od 4,5 h. Ove ćelije su nakon prvih 40 min izlaganja GYY4137 dodatno stimulisane jonomicinom (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije. Određivanjem procentualne zastupljenosti Treg i Th17 limfocita metodom protočne citofluorimetrije je pokazano da je GYY4137, u skladu sa prethodnim rezultatima, doveo do smanjenja uдела Treg (Slika 26A), a nije uticao na udeo Th17 limfocita unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ (Slika 26B).

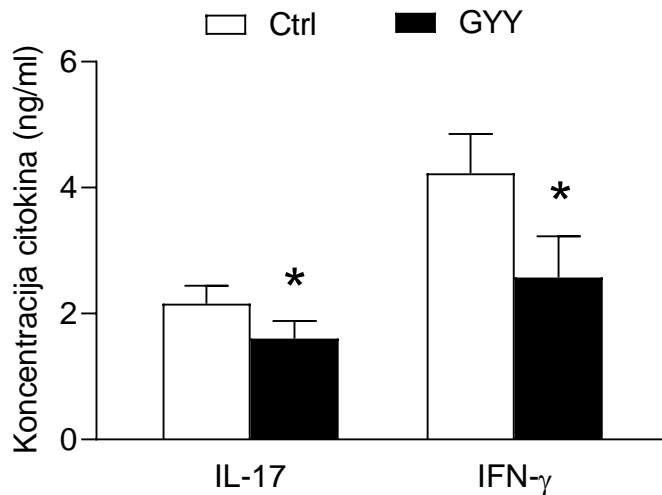


Slika 26. Efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Treg i Th17 limfocita unutar populacije ćelija PLČ DA pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA *ex vivo*. A) Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA pacova emulzijom HKM u CFA. Ovako dobijene ćelije su inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 40 min, nakon čega je određivan procenat Treg metodom protočne citofluorimetrije. B) Ćelije PLČ su izolovane 7 dana nakon imunizacije DA pacova emulzijom HKM u CFA. Zatim su ove ćelije inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 4,5 h, pri čemu su nakon prvih 40 min inkubacije dodatno stimulisane jonomicinom (1,3 μ M) i PMA (81 nM), u prisustvu brefeldina A (10,6 μ M) i monensina (2 μ M), do isteka ukupnog vremena inkubacije. Procenat IL-17⁺ ćelija unutar CD4⁺ ćelija (Th17 limfocita) određen je nakon 4,5 h inkubacije metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. *p < 0.05 vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Navedeni rezultati pokazuju da razlika u efektu koji GYY4137 ostvaruje na udeo Treg i Th17 limfocita unutar populacije imunskih ćelija PLČ i populacije imunskih ćelija kičmene moždine nije posledica različitog načina imunizacije pacova.

4.5.4. Efekat *ex vivo* primene GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a

Dejstvo GYY4137 ispitano je i na produkciju encefalitogenih citokina u imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a. U tu svrhu, imunske ćelije izolovane na piku bolesti iz kičmene moždine pacova su izložene GYY4137 (200 μ M) u trajanju od 24 h. S obzirom na to da se smatra da se imunske ćelije reaktiviraju *in vivo* u CNS-u, one nisu dodatno stimulisane. Produkcija citokina IL-17 i IFN- γ određena je metodom ELISA u supernatantima ćelijskih kultura. Rezultati pokazuju da, kao i u slučaju imunskih ćelija PLC \checkmark , GYY4137 dovodi do smanjenja produkcije ovih encefalitogenih citokina u imunskim ćelijama kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a (Slika 27).



Slika 27. Efekat GYY4137 na produkciju encefalitogenih citokina u imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a. Imunske ćelije su izolovane na piku bolesti iz kičmene moždine pacova imunizovanih emulzijom HKM u CFA i inkubirane u odsustvu (kontrola, Ctrl) ili prisustvu GYY4137 (GYY, 200 μ M) u trajanju od 24 h, bez dodatne stimulacije. Koncentracija citokina IL-17 i IFN- γ u supernatantima ćelijskih kultura određena je metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti + SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ vs. Ctrl predstavlja statističku značajnost.

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da GYY4137 ostvaruje imunosupresivno dejstvo na imunske ćelije kičmene moždine EAE pacova, koje se ogleda u smanjenju produkcije encefalitogenih citokina IL-17 i IFN- γ u ovim ćelijama.

5. Diskusija

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da GYY4137 ostvaruje imunomodulacijski efekat na ćelije imunskog sistema uključene u patogenezu EAE-a, pri čemu priroda i intenzitet ovog efekta variraju u zavisnosti od tipa ćelija i miljea iz kojeg ćelije potiču. Tako je GYY4137 ostvario antiinflamacijski efekat na BV2 ćelije nakon *in vitro* primene, dovodeći do smanjenja produkcije medijatora inflamacije, ekspresije kostimulatornih molekula i kapaciteta fagocitoze. Međutim, antiinflamacijski efekat GYY4137 na DĆ, koje su diferencirane iz kostne srži miševa, bio je znatno manje izražen i ogledao se samo u povećanju produkcije antiinflamacijskog citokina TGF- β . S druge strane, efekat *ex vivo* primene GYY4137 na T limfocite izolovane iz miševa/pacova imunizovanih encefalitogenom emulzijom bio je kompleksniji. GYY4137 je doveo do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg unutar populacije ćelija PLČ, ali nije uticao na njihovu zastupljenost u populaciji imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine. Suprotno tome, pokazano je da GYY4137 ne utiče na procentualnu zastupljenost Th17 limfocita PLČ, ali dovodi do smanjenja zastupljenosti Th17 limfocita unutar populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine. Takođe, na osnovu rezultata ove doktorske disertacije zaključeno je da je jedan od mehanizama, kojim je GYY4137 ostvario efekat na udeo Treg ćelija PLČ, smanjenje ekspresije transkripcionog faktora FoxP3, koje se najverovatnije odvija stimulacijom njegove proteazomalne degradacije. Pored toga, GYY4137 je smanjio koncentraciju encefalitogenih citokina, IL-17 i IFN- γ , u supernatantima kultura ćelija PLČ i imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine. Ispitan je i efekat GYY4137 na još jednu bitnu funkcionalnu karakteristiku imunskih ćelija – produkciju ROS. Dok GYY4137 nije ostvario efekat na produkciju ROS od strane DĆ-a i makrofaga, neočekivano je doveo do povećanja produkcije ROS od strane BV2 ćelija i CD4⁺ T limfocita izolovanih iz PLČ miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA.

Kao što je prethodno navedeno, APC imaju ključnu ulogu u patogenezi EAE-a i MS-e, te je stoga prvi korak u utvrđivanju antiencefalitogenog potencijala GYY4137 i rasvetljavanju uloge H₂S u kontekstu patogeneze EAE-a i MS-e bilo ispitivanje *in vitro* efekta GYY4137 na funkcionalne i fenotipske karakteristike APC. Kao model za ispitivanje efekta GYY4137 na APC su korišćene mišja imortalizovana linija mikroglije (BV2 ćelije) i DĆ koje su diferencirane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa, a prvo je ispitan efekat GYY4137 na antigen-prezentujuću sposobnost ovih ćelija. Naime, jedan od načina na koji APC doprinose patogenezi EAE-a je preuzimanje antigena fagocitozom i njihova prezentacija CD4⁺ T limfocitima u sklopu MHC molekula II klase. Pored prepoznavanja antigena, za uspešnu aktivaciju antigen-specifičnih T limfocita neophodan je i drugi signal koji se obezbeđuje interakcijom kostimulatornih molekula na APC (CD40, CD80 i CD86) sa ligandima na T limfocitima (CD28 i CD40L) (Zozulya i sar., 2010). Shodno tome se određivanjem efekta GYY4137 na ekspresiju navedenih molekula i sposobnost fagocitoze APC-a može posredno odrediti njegov uticaj na sposobnost prezentacije antigena i aktivacije T limfocita od strane APC-a. Tako rezultati ove disertacije pokazuju da *in vitro* primena GYY4137 smanjuje antigen-prezentujuću sposobnost BV2 ćelija, jer dovodi do smanjenja ekspresije molekula CD40 i CD86 na ovim ćelijama, kao i sposobnosti fagocitoze. Ovakav efekat GYY4137 na ekspresiju kostimulatornih molekula u BV2 ćelijama je naročito značajan kada se ima u vidu da je nivo ekspresije CD40 i CD86 povećan na ćelijama mikroglije tokom EAE-a (Ponomarev i sar., 2005). Iako je GYY4137 ostvario negativan efekat na antigen-prezentujuću sposobnost BV2 ćelija, on nije ostvario efekat na antigen-prezentujuću sposobnost DĆ-a diferenciranih iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa. Tako GYY4137 nije uticao na fagocitozu i ekspresiju kostimulatornih molekula (CD40 i CD80) i MHC molekula II klase na DĆ-ama. Shodno tome se može zaključiti da GYY4137 ostvaruje različit efekat na antigen-prezentujuću sposobnost mikroglije i DĆ-a. Jedan od načina na koji se može objasniti uočena razlika u efektu GYY4137 na dva tipa APC-a je upotreba različitih agenasa za stimulaciju ova dva tipa ćelija. Tako je eksperimentalna postavka podrazumevala stimulaciju BV2 ćelija LPS-om i IFN- γ , dok su DĆ stimulisane samo LPS-om. Ovakvom objašnjenju idu u prilog studije drugih grupa koje su pokazale da različiti stimuli indukuju povećanje ekspresije CD40 na APC-ama posredstvom različitih signalnih

puteva. Iako prema ovim studijama i IFN- γ i LPS stimulišu ekspresiju CD40 posredstvom aktivacije transkripcionih faktora STAT1 α i NFkB, efekat IFN- γ na ekspresiju CD40 u velikoj meri je zavisan od stimulacije endogene produkcije TNF, koji potom stimuliše aktivaciju transkripcionog faktora NFkB (Benveniste i sar., 2004). S druge strane, LPS aktivira transkripcioni faktor NFkB signalizacijom preko receptora TLR4 i Myd88 signalnog puta (Qin i sar., 2005). Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da u slučaju BV2 ćelija LPS i IFN- γ ostvaruju kumulativni efekat na ekspresiju CD40, a da GYY4137 interferira sa signalnim putevima specifično pokrenutim aktivacijom receptora za IFN- γ . Na taj način GYY4137 potencijalno dovodi do smanjenja onog dela efekta na ekspresiju CD40, koji je uslovljen stimulacijom pokrenutom IFN- γ . Ovoj pretpostavci u prilog ide i smanjenje produkcije citokina TNF do koga GYY4137 dovodi u BV2 ćelijama. S obzirom na to da je endogeno produkovan TNF ključan za stimulaciju ekspresije CD40 indukovanu IFN- γ , može se pretpostaviti da je upravo smanjenje produkcije TNF mehanizam kojim je GYY4137 uticao na ekspresiju CD40 na BV2 ćelijama. Takođe, razlike u efektu GYY4137 na anigen-prezentujuću sposobnost BV2 ćelija i DĆ-a mogu biti posledica njihovog različitog porekla. Naime, BV2 ćelije su dobijene imortalizacijom mišjih ćelija mikroglije pomoću retrovirusa (Blasi i sar., 1990), dok su DĆ korišćene u ovom istraživanju dobijene diferencijacijom od prekursora iz kostne srži miševa. Iako su analize transkriptoma i proteoma BV2 ćelija i primarne mikroglije nakon stimulacije pokazale veliku sličnost između ovih ćelija, postoje određene razlike koje se pre svega ogledaju u smanjenom nivou ekspresije gena nakon stimulacije BV2 ćelija u odnosu na primarnu mikrogliju (Henn i sar., 2009). Ova razlika između transformisanih i netransformisanih ćelija takođe treba biti uzeta u obzir prilikom razmatranja razlika u efektu GYY4137 na antigen-prezentujuću sposobnost BV2 ćelija i DĆ-a. Finalno, inherentne razlike koje postoje između mikroglije i DĆ-a takođe mogu biti uzrok različitog efekta GYY4137 na ove APC. S obzirom na to da DĆ predstavljaju profesionalne APC sa jedinstvenom sposobnošću da aktiviraju naivne antigen-specifične T limfocite, dok mikroglija predstavlja slabog aktivatora naivnih T limfocita i njena uloga u patogenezi EAE-a se pre svega ogleda u reaktivaciji T limfocita nakon ulaska u CNS, može se pretpostaviti da bi GYY4137 nakon *in vivo* primene potencijalno ostvario efekat na reaktivaciju T limfocita u CNS-u, dok ne bi uticao na aktivaciju naivnih T limfocita u PLČ (Bachereau i Steinman, 1998; Bailey i sar., 2006).

Osim prezentacijom antigena, mikroglija i DĆ doprinose patogenezi EAE-a i produkcijom medijatora inflamacije, te je stoga efekat GYY4137 ispitan i na ovu funkciju BV2 ćelija i DĆ-a. U tom smislu, ispitan je efekat GYY4137 na produkciju NO i proinflamacijskih citokina TNF i IL-6 od strane BV2 ćelija, kao i efekat na produkciju proinflamacijskih citokina TNF i IL-6 i antiinflamacijskog citokina TGF- β od strane DĆ-a. Pokazano je da GYY4137 dovodi do smanjenja produkcije TNF od strane BV2 ćelija mikroglije, dok ne utiče na njegovu produkciju od strane DĆ-a. S druge strane, GYY4137 ne utiče na ekspresiju iRNK za TNF u BV2 ćelijama, što ukazuje na to da svoj efekat na produkciju TNF ovo jedinjenje ostvaruje na posttranskripcionom nivou. Efekat GYY4137 na smanjenje produkcije TNF u BV2 ćelijama je naročito značajan kada se ima u vidu da mikroglija, zajedno sa astrocitima, predstavlja glavni izvor TNF u mozgu, kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima (Pfeffer i sar., 1993; Fresegna i sar., 2020). Takođe, brojnim studijama je pokazano da TNF doprinosi narušavanju krvno-moždane barijere i stimuliše demijelinizaciju i ekscitotoksičnost tokom EAE-a, pa ovakav efekat GYY4137 na produkciju TNF u BV2 ćelijama može ukazati na antiencefalitogeni potencijal ovog jedinjenja (Fresegna i sar., 2020). Međutim, prilikom razmatranja antiencefalitogenog potencijala GYY4137 u kontekstu efekta na produkciju TNF treba biti oprezan jer ovaj citokin ostvaruje dualnu funkciju u EAE-u i MS-i. Pored patofiziološke funkcije u EAE-u, TNF takođe ostvaruje i neuroprotektivnu ulogu koja proističe iz pozitivnog efekta na funkciju Treg, kao i efekta na stimulaciju remijelinizacije (Fresegna i sar., 2020). Ovakva plejotropna uloga TNF u patogenezi EAE-a i MS-e uslovlila je neuspeh primene neselektivnih inhibitora ovog citokina u tretmanu MS-e. Naime, primena

anti-TNF terapije je kod pacijenata obolelih od MS-e dovela do pogoršanja simptoma bolesti (Wiendl i sar., 2000). Dualna uloga TNF u neuroinflamaciji može se objasniti postojanjem dva tipa receptora za ovaj citokin (TNFR1 i TNFR2), čija aktivacija dovodi do suprotnih efekata u neuroinflamaciji. Naime, aktivacija TNFR1 stimuliše infiltraciju imunskih ćelija u CNS i demijelinizaciju, dok aktivacija TNFR2 ima ulogu u indukciji regulatornih T limfocita i eliminaciji autoreaktivnih T limfocita i makrofaga (Freseigna i sar., 2020). Pored toga, sam citokin TNF postoji u dva oblika, transmembranskom (tmTNF) i solubilnom (sTNF), koji pokazuju različit afinitet za pomenute receptore. S obzirom na to da sTNF pokazuje visok afinitet prema TNFR1, a tmTNF pokazuje visok afinitet prema TNFR2, smatra se da interakcija tmTNF i TNFR2 pozitivno utiče na EAE, dok interakcija sTNF i TNFR1 stimuliše neuroinflamaciju (van Hauwermeiren i sar., 2011). Imajući sve navedeno u vidu, efekat koji GYY4137 ostvaruje na produkciju TNF u BV2 ćelijama je neophodno dodatno ispitati u kontekstu uticaja na ekspresiju različitih formi TNF, jer smanjenje produkcije TNF do koga GYY4137 dovodi u BV2 ćelijama ne mora nužno ukazivati i na pozitivne efekte koje bi tretman GYY4137 mogao da ostvari u EAE-u.

Osim TNF, i IL-6 i TGF- β imaju značajnu ulogu u određivanju kliničkog toka EAE-a. Jedna od najznačajnijih funkcija ova dva citokina je njihova uloga u regulisanju balansa između Th17 i Treg subpopulacija limfocita, što posledično utiče na intenzitet autoimunskog odgovora u EAE-u. Naime, pokazano je da TGF- β stimuliše diferencijaciju Treg, dok IL-6 inhibira diferencijaciju Treg indukovanu ovim citokinom (Chen i sar., 2003). S druge strane, IL-6 u prisustvu TGF- β indukuje diferencijaciju Th17 limfocita od naivnih T limfocita (Veldhoen i sar., 2006; Kimura i Kishimoto, 2010). Na taj način odnos produkcije citokina IL-6 i TGF- β određuje smer diferencijacije T limfocita, a time i intenzitet imunskog odgovora (Lu i sar., 2016). Shodno tome, iako GYY4137 nije ostvario efekat na produkciju IL-6 u BV2 ćelijama i DC-ama, njegov efekat na povećanje produkcije TGF- β u DC-ama može ukazati na potencijal ovog jedinjenja da usmeri ravnotežu diferencijacije CD4⁺ T limfocita prema Treg, što može biti korisno u tretmanu EAE-a i MS-e. Ipak, ovu pretpostavku neophodno je dodatno ispitati kako bi se utvrdilo da li je efekat GYY4137 na produkciju TGF- β u DC-ama dovoljan da podrži diferencijaciju Treg, naročito kada se ima u vidu da GYY4137 nije uticao na ostale funkcije DC-a. Prvi korak u proveru ove pretpostavke predstavljala bi *in vitro* diferencijacija Treg od naivnih T limfocita u prisustvu DC-a, diferenciranih u prisustvu ili odsustvu GYY4137. Značaj efekta GYY4137 na produkciju TGF- β u DC-ama ogleda se i u tome što je ovaj citokin negativan regulator Th1 subpopulacije ćelija, koje predstavljaju važnu encefalitogenu populaciju T limfocita (Gorelik i sar., 2002).

GYY4137 je ostvario negativan efekat i na produkciju još jednog medijatora inflamacije u BV2 ćelijama - NO. S obzirom na to da NO doprinosi narušavanju krvno-moždane barijere (Shukla i sar., 1996), stimuliše demijelinizaciju ostvarivanjem toksičnog efekta na oligodendrocite (Mitrovic i sar., 1994) i interferira sa provođenjem akcionih potencijala kroz nervna vlakna smanjujući inaktivaciju voltažno-zavisnih kanala za Na⁺ (Ahern i sar., 2000), smanjenje produkcije NO indukovano tretmanom GYY4137 takođe ukazuje na potencijal ovog jedinjenja da ostvari antiencefalitogeni efekat. Ipak, studije koje su podrazumevale inhibiciju produkcije NO nisu donele ohrabrujuće rezultate koji bi ukazali na mogućnost primene ovog principa u terapiji MS-e (Smith i Lassman, 2002). Naime, efekat inhibicije produkcije NO zavisi od faze patogeneze EAE-a u kojoj je inhibitor primenjen. Tako je pokazano da inhibicija produkcije NO u ranim fazama bolesti kod DA pacova dovodi do razvoja težih simptoma, dok inhibicija od trenutka pojave simptoma dovodi do produžavanja trajanja bolesti, bez efekta na njenu jačinu (Kahl i sar., 2003). S druge strane, inhibicija produkcije NO počevši od 9 d.p.i. ublažava jačinu bolesti kod DA pacova (Petković i sar., 2013). Različiti efekti koji se ostvaruju primenom inhibitora produkcije NO u različitim terminima objašnjavaju se time što NO, osim

proinflamacijske funkcije, ostvaruje i povoljnu imunomodulacijsku ulogu u EAE-u jer inhibira prezentaciju antigena, proliferaciju T limfocita i deluje negativno na ekspresiju adhezivnih molekula koji su neophodni za infiltraciju imunskih ćelija u CNS (Sicher i sar. 1994; Albina i Henry, 1991; Kubes i sar., 1991). Na osnovu navedenih podataka se može pretpostaviti da bi primena GYY4137 u odgovarajućim terminima inhibicijom produkcije NO mogla da ostvari pozitivan efekat na tok EAE-a. Ipak, uprkos tome što GYY4137 ostvaruje brojne imunosupresivne efekte na BV2 ćelije, ovakvi podaci ponovo potvrđuju potrebu za utvrđivanjem efekata koje bi GYY4137 ostvario u kompleksnom *in vivo* sistemu.

Studije drugih grupa su se takođe bavile ispitivanjem uticaja različitih donora H₂S na BV2 ćelije. Rezultati studije Zhou i saradnika koji su pokazali negativan uticaj GYY4137 na produkciju NO u BV2 ćelijama u skladu su sa rezultatima ove doktorske disertacije (Zhou i sar., 2014). Iako efekat GYY4137 na ekspresiju molekulskih markera aktivacije mikroglije nije ispitan u pomenutoj studiji, ona je pokazala da alternativni donor H₂S, 5-(4-hidroksifenil)-3H-1,2-ditiociklopenten-3-tion, dovodi do smanjenja nivoa ekspresije iRNK molekula karakterističnih za M1 fenotip mikroglije, uključujući i TNF (Zhou i sar., 2014). Ovo dodatno potvrđuje imunosupresivni potencijal H₂S potvrđujući i rezultate na BV2 ćelijama dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji. Efekat GYY4137 do sada nije ispitan na produkciju proinflamacijskih citokina u mikrogliji, ali postoje studije koje su pokazale negativan uticaj ovog jedinjenja na produkciju citokina TNF, IL-6 i IL-1 β u ćelijskoj liniji makrofaga RAW264.7 (Whiteman i sar., 2010a). S obzirom na to da su mikroglija i makrofagi srodne ćelije, ovakav rezultat ide u prilog pokazanom efektu GYY4137 na produkciju proinflamacijskog citokina TNF u BV2 ćelijama.

Za razliku od efekta na mikrogliju koji je do danas ispitan u značajnom broju studija, nema mnogo podataka o efektu donora H₂S na DĆ. Iako efekat GYY4137 na DĆ do rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji nije ispitan, efekat drugih donora H₂S na DĆ ispitan je u životinjskim modelima melanoma i alkoholnog hepatitisa (De Cicco i sar., 2020; Sutti i sar., 2015). U ovim studijama efekat donora H₂S na funkciju i prirodu DĆ-a je bio suprotan. Dok je na modelu hepatitisa primena NaHS dovela do smanjenja akumulacije CXCR3⁺ DĆ-a u jetri, primena donora dialil-trisulfida na modelu mišjeg melanoma je potencirala akumulaciju DĆ-a u slezini miševa, što je bilo u korelaciji sa smanjenim rastom tumora. Slično tome, *in vitro* primena NaHS je dovela do smanjenja ekspresije hemokinskog receptora CXCR3 na DĆ-ama, dok je *in vitro* primena dialil-trisulfida na prekursore iz kostne srži promovisala diferencijaciju u DĆ i njihovu maturaciju (De Cicco i sar., 2020; Sutti i sar., 2015). Dakle, studije koje su koristile različite donore H₂S su pokazale da on može ostvariti kako imunosupresivni, tako i imunostimulatorni efekat na DĆ (Dilek i sar., 2020). Ipak, opseg parametara imunogenosti DĆ-a koje su obuhvatile ove studije je ograničen, što otežava upoređivanje rezultata sa rezultatima ove doktorske disertacije. Međutim, može se zaključiti da različiti donori, kao i različiti uslovi primene tih donora mogu ostvariti suprotan efekat na imunogenost DĆ-a, što otvara potrebu za ispitivanjem efekta *in vivo* primene GYY4137 na DĆ-ama u modelu EAE-a.

Posebno zanimljiv efekat GYY4137 na BV2 ćelije je indukcija povećanja produkcije ROS u ovim ćelijama. Ovakav efekat GYY4137 je prilično neočekivan kada se ima u vidu da su brojne studije dokazale antioksidativna svojstva H₂S. S druge strane, literaturni podaci koji ukazuju na to da ovaj gas može ostvariti i stimulatorni efekat na produkciju ROS su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Ipak, uprkos postojanju studija koje idu u prilog rezultatima dobijenim na BV2 ćelijama, zbog suprotstavljenosti podataka o antioksidativnim svojstvima H₂S, ovi rezultati su provereni u nekoliko dodatnih eksperimenata, koji su podržali prvobitno dobijene podatke. Stimulatorno dejstvo GYY4137 na produkciju ROS potvrđeno je korišćenjem DCFDA, kao alternativne boje za detekciju produkcije ROS, kao i utvrđivanjem odsustva fluorescence bezćelijskog rastvora GYY4137 i DHR.

Pored toga, efekat GYY4137 na produkciju ROS ispitan je i na aktiviranim i na neaktiviranim BV2 ćelijama, kako bi se potvrdilo da GYY4137 ostvaruje sličan efekat na produkciju ROS nezavisno od uslova stimulacije. Iako je u svim postavkama eksperimenta GYY4137 doveo do povećane produkcije ROS od strane BV2 ćelija, intenzitet ovog povećanja varirao je u zavisnosti od tipa stimulacije. Najizraženiji efekat na povećanje produkcije ROS je ostvaren prilikom primene sekundarne stimulacije LPS-om i IFN- γ , u odsustvu primarne stimulacije, dok je najslabiji efekat na povećanje produkcije ROS GYY4137 ostvario pri primeni primarne stimulacije LPS-om i IFN- γ , nakon koje je usledila sekundarna stimulacija PMA-om. Ovakva razlika u efektu GYY4137 na produkciju ROS u različitim uslovima stimulacije može se objasniti različitim bazalnim nivoom produkcije ROS koji indukuje primena stimulusa u odsustvu GYY4137. Naime, primarnom stimulacijom LPS-om i IFN- γ , nakon koje sledi sekundarna stimulacija PMA-om, se postiže najviši bazalni nivo produkcije ROS, dok je bazalni nivo produkcije ROS postignut sekundarnom stimulacijom LPS-om i IFN- γ bez primene primarne stimulacije najmanji. Dalje se može pretpostaviti da je bazalni nivo produkcije postignut primarnom stimulacijom koju prati sekundarna stimulacija blizak platau produkcije ROS, te je usled blizine platoa uticaj GYY4137 na produkciju ROS uz ovakvu stimulaciju najmanje izražen.

Iako je GYY4137 doveo do povećanja produkcije ROS u BV2 ćelijama u različitim eksperimentalnim postavkama, on nije uticao na produkciju ROS u drugim tipovima ispitanih APC – DC-ama i makrofagima. Odsustvo efekta na produkciju ROS u makrofagima naročito je zanimljivo kada se ima u vidu sličnost ovog tipa ćelija s mikroglijom. Sličnost mikroglije i makrofaga ogleda se kako u njihovoj funkciji, tako i u njihovom poreklu. Funkcionalnu sličnost najbolje oslikava činjenica da makrofagi iz kostne srži mogu zameniti mikrogliju nakon totalne deplecije mikroglije indukovane zračenjem (Chu i sar., 2018). Ovakav stepen sličnosti i funkcionalne komplementarnosti mikroglije i makrofaga otežava objašnjenje diferencijalnog efekta GYY4137 na produkciju ROS u ova dva tipa ćelija. Ipak, postoje podaci o finim razlikama u funkciji ovih ćelija koje se ogledaju u diferencijalnoj ekspresiji pojedinih gena u aktiviranim makrofagima i mikrogliji (Schmid i sar., 2009). Među diferencijalno ekspimiranim genima nalazi se i Trem2 (*engl.* Triggering receptor expressed on myeloid cells 2, Trem2), čiji je nivo ekspresije značajno veći u mikrogliji nego u makrofagima i koji kodira protein koji je uključen u stimulaciju produkcije ROS posredstvom Syk kinaze (Weng i sar., 2021, Hickman i Houry, 2014). S obzirom na to da je poznato da H₂S može uticati na aktivnost proteina posredstvom sulfhidracije, može se pretpostaviti da ovaj gas menja aktivnost receptora Trem2 ili njegovog adapterskog proteina, a da se usled znatno veće ekspresije ovog receptora u ćelijama mikroglije to odražava na produkciju ROS u mikrogliji, ali ne i u makrofagima (Mustafa i sar., 2009).

Osim što je doveo do povećanja produkcije ROS u BV2 ćelijama, GYY4137 je stimulisao produkciju ROS i u CD4⁺ T limfocitima izolovanim iz PLC¹ miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Iako je ranije pomenuto da ROS dovode do oštećenja ćelija i tkiva, ovakav efekat GYY4137 na produkciju ROS ne mora nužno doprinostiti patogenezi EAE-a, jer ROS takođe mogu imati ulogu u signalizaciji i modulaciji funkcije T limfocita (Belikov i sar., 2015). Tako je jedna od funkcija ROS u modulaciji funkcije T limfocita uticaj na njihovu diferencijaciju. S obzirom na to da ROS stimulišu diferencijaciju Th2 limfocita, dok nedostatak ROS favorizuje nastanak Th1 i Th17 limfocita, postoji mogućnost da stimulacija produkcije ROS indukovana GYY4137 ostvari povoljne efekte u EAE-u (Frossi i sar., 2008). Još jedan način na koji bi povišena produkcija ROS u T limfocitima mogla doprineti antiencefalitogenim efektima GYY4137 je i uticaj na aktivacijom indukovanu ćelijsku smrt, jer ROS stimuliše ekspresiju FasL u T limfocitima i time doprinosi rezoluciji inflamacije (Devadas i sar., 2002; Belikov i sar., 2015). Ipak, nekoliko studija je pokazalo da se povećanje produkcije ROS u T limfocitima dešava nakon njihove aktivacije i da je ovako produkovani ROS ključan za signalizaciju kojom se stimuliše proliferacija i klonalna ekspanzija T ćelija (Sena i sar., 2013). Ova funkcija ROS u

modulaciji funkcije T limfocita je proinflamacijska i potencijalno bi mogla da doprinese patogenezi EAE-a. Pored toga, ROS stimulišu ekspresiju kostimulativnih molekula i MHC II molekula na DC-ama (Rutault i sar., 1999), što takođe može doprineti razvoju autoimunskog odgovora. ROS ostvaruje efekat i na ravnotežu između M1 i M2 mikroglije favorizujući transkripciju gena ključnih za razvoj M1 fenotipa (Choi i sar., 2012).

Treba istaći da je efekat koji je GYY4137 ostvario na produkciju ROS u CD4⁺ T limfocitima bio izraženiji u populaciji Treg nego u ukupnoj populaciji CD4⁺ T limfocita. Iako nakon aktivacije T limfocita dolazi do povećanja produkcije ROS u svim subpopulacijama limfocita, nekoliko studija je pokazalo da je povećanje produkcije ROS značajno veće u Treg nego u drugim subpopulacijama T limfocita (Beier i sar., 2015; Howie i sar., 2017). Shodno tome, efekat GYY4137 na produkciju ROS u Treg bi mogao biti posledica njihovog specifičnog oksidativnog metabolizma. S druge strane, postoje podaci koji pokazuju da efekat ROS na stabilnost Treg može biti varijabilan. Dok su neke studije pokazale da povećana intracelularna produkcija ROS nakon aktivacije Treg dovodi do povećanja njihove stabilnosti, kao i povećanja ekspresije transkripcionog faktora FoxP3, postoje studije po kojima visoka produkcija ROS može imati štetne efekte na Treg (Saksida i sar., 2021). S obzirom na to da superoksid može inhibirati ekspresiju gena posredstvom stimulacije hipermetilacije gena (Saksida i sar., 2021), negativan efekat koji GYY4137 ostvaruje na zastupljenost Treg bi se mogao objasniti stimulacijom hipermetilacije u regionu *FoxP3* gena, posredovanom superoksidom, čiju produkciju u ovim ćelijama stimuliše GYY4137.

Sve navedene regulatorne i efektorske funkcije ROS u patogenezi EAE-a moraju biti uzete u obzir pri proceni antiencefalitogenog potencijala GYY4137. Shodno tome, za utvrđivanje da li povećana produkcija ROS indukovana sa GYY4137 ima predominantno efektorsku ili regulatornu funkciju neophodni su dodatni eksperimenti u kojima bi se ispitala interakcija mikroglije i T limfocita sa drugim ćelijama od značaja za patogenezu EAE-a. Ne treba isključiti mogućnost da H₂S može ostvariti negativne efekte na različite bolesti CNS-a, naročito kada se ima u vidu da je pokazano da H₂S doprinosi ishemijskom oštećenju mozga u pacovskom modelu moždanog udara (Qu i sar., 2006). S obzirom na to da se smatra da veliki deo oštećenja u ovom modelu nastaje usled oksidativnog stresa, moguće je da H₂S potenciranjem nastanka ROS dovodi do oštećenja kod ovog modela, kao i da je to mehanizam kojim bi ovaj gas potencijalno mogao da ostvari štetne efekte i u EAE-u (Juurink i sar., 1997; Wong i sar., 2006).

Jedan od koraka u utvrđivanju antiencefalitogenog potencijala GYY4137 i rasvetljavanju uloge H₂S u patogenezi EAE-a i MS-e je bilo ispitivanje *ex vivo* uticaja GYY417 na CD4⁺ T limfocite izolovane iz PLČ miševa i pacova imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a. Osnovni fenomen u kontekstu uticaja GYY417 na CD4⁺ T limfocite PLČ je ispitan i na mišjem i na pacovskom modelu autoimunosti u cilju sigurnije potvrde otkrivenog fenomena. S druge strane, efekat GYY417 na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine ispitan je samo na pacovskom modelu sa idejom pridržavanja principa 3R (*engl.* Replacement, Reduction and Refinement). Naime, broj imunskih ćelija koji se može izolovati iz kičmene moždine imunizovanog miša je znatno manji od broja ćelija koji se dobija iz kičmene moždine pacova i zahtevao bi žrtvovanje velikog broja životinja u cilju dobijanja adekvatnog broja ćelija.

Kao što je već navedeno, antiinflamacijski efekat koji je GYY4137 ostvario na ćelije PLČ izolovane iz miševa i pacova imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA se ogledao u smanjenju koncentracije encefalitogenih citokina, IL-17 i IFN- γ , u supernatantima kultura ovih ćelija. Iako je uticao na koncentraciju encefalitogenih citokina, GYY4137 nije uticao na procentualnu zastupljenost Th17 i Th1 limfocita, koji su dominantni proizvođači ovih citokina. Pored izostanka efekta na zastupljenost Th17 i

Th1 limfocita unutar populacije ćelija PLČ miševa i/ili pacova, GYY4137 nije uticao ni na prosečni nivo ekspresije IL-17 i IFN- γ po CD4⁺ T limfocitu (mfi), te se može pretpostaviti da ovo jedinjenje nije uticalo na sintezu navedenih citokina u Th17 i Th1 limfocitima. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na to da smanjenje koncentracije encefalitogenih citokina GYY4137 ostvaruje delujući na sporedne proizvođače citokina IL-17 i IFN- γ , kao što su $\gamma\delta$ T limfociti, NK ćelije, makrofagi, neutrofil, koje se takođe nalaze u PLČ (Pappu i sar., 2010). S druge strane, iako GYY4137 nije ostvario uticaj na sintezu citokina IL-17 i IFN- γ u Th17 i Th1 limfocitima, uočeno smanjenje koncentracije citokina u supernatantu bi se moglo objasniti interferencijom ovog jedinjenja sa procesom egzocitoze i remećenjem procesa sekrecije ovih citokina, što bi uticalo na njihovu koncentraciju u vanćelijskoj sredini. U prilog ovakvoj pretpostavci idu rezultati drugih grupa koje su pokazale da H₂S zaista može interferirati sa egzocitozom u različitim tipovima ćelija (Mustafina i sar., 2015; Grambow i sar., 2014). Ovi rezultati sugerišu da bi GYY4137 u *in vivo* sistemu mogao da smanji potencijal Th1 i Th17 limfocita, koji će napustiti PLČ i otići u CNS, da sekretuju encefalitogene citokine. Ipak, pri tumačenju navedenih rezultata treba uzeti u obzir da efekat na koncentraciju encefalitogenih citokina i odsustvo efekta na procentualnu zastupljenost Th1 i Th17 limfocita može biti posledica razlika u eksperimentalnoj postavci pri određivanju ovih parametara - različite stimulacije, kao i različitog vremena inkubacije.

Iako je ostvario antiinflamacijski efekat delujući na produkciju encefalitogenih citokina u ćelijama PLČ, primena GYY4137 na ćelije PLČ miševa i pacova, imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, je već nakon 40 min inkubacije dovela do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg. Ovakav efekat na zastupljenost Treg se održao i nakon produženog izlaganja ćelija PLČ miša ovom jedinjenju. Pored toga, smanjenje zastupljenosti Treg nakon tretmana alternativnim donatorom H₂S, NaHS, potvrdilo je da je efekat GYY4137 na Treg posredovan ovim gasom. S druge strane, poređenjem efekta koji su dva različita donora ostvarila na udeo Treg utvrđeno je da GYY4137 ostvaruje efekat znatno većeg intenziteta od NaHS. Kako NaHS dostiže pik otpuštanja H₂S posle nekoliko sekundi, a GYY4137 posle 10 min, uz održavanje stabilnog oslobađanja H₂S tokom narednih sat vremena, različit intenzitet efekta ova dva donora može se objasniti razlikom u kinetici otpuštanja H₂S (Powell i sar., 2018). Stabilno, sporo oslobađanje H₂S tokom produženog vremenskog perioda u skladu je sa time da se efekat GYY4137 na Treg održao i posle 12 h inkubacije.

U potrazi za mehanizmom kojim GYY417 ostvaruje uticaj na procentualnu zastupljenost Treg unutar ćelija PLČ miša najpre je ispitano da li ovo jedinjenje svoje dejstvo ostvaruje posredstvom indukcije apoptoze u Treg. S obzirom na to da GYY4137 dovodi do promene zastupljenosti Treg u jako kratkom vremenskom intervalu, pitanje koje se može postaviti je da li je proces apoptoze dovoljno brz kako bi se njime mogao objasniti ovaj fenomen. Čitav proces apoptoze, od inicijalnog stimulusa do uništenja ćelije, može trajati nekoliko sati ili čak nekoliko dana, a detekcija fosfatidil-serina na površini ćelijske membrane je moguća posle samo 10 min (Green, 2005; Mourdjeva i sar., 2005). Takođe, tokom prvih 10 min od inicijalnog stimulusa dešavaju se i promene u mitohondrijama i pik aktivacije kaspaza, koji se smatra tačkom nakon koje je smrt ćelije neizbežna (Green, 2005). Na osnovu toga što je eksperimentalna postavka podrazumevala da od izlaganja ćelija GYY4137 do detekcije fosfatidil-serina na njihovoj površini prođe 90 min, kao i na osnovu podataka u literaturi o vremenu detekcije prvih apoptotičnih ćelija, pretpostavljeno je da apoptoza može biti jedan od mehanizama koji doprinose efektu GYY4137 na udeo Treg. Ipak, kako GYY4137 nije doveo do povećanja procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija unutar populacije Treg, ispitano je da li ovo jedinjenje indukuje ferroptozu Treg, koja predstavlja nedavno otkriveni tip programirane ćelijske smrti. S obzirom na to da je jedna od karakteristika ferroptoze akumulacija citosolnih i lipidnih ROS, prethodno pokazano povećanje produkcije ROS u Treg je takođe ukazalo na mogućnost da se u osnovi efekta GYY4137

nalazi ovaj tip programirane ćelijske smrti (Dixon i sar., 2012). Međutim, kako primena inhibitora ferroptoze nije umanjila efekte GYY4137, a primena jona Fe^{2+} nije ostvarila imitaciju efekta GYY4137 na Treg, ova pretpostavka je odbačena.

S druge strane, primena GYY4137 na $CD4^+$ T limfocite prečišćene iz populacije ćelija PLČ miševa, imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, je dovela do smanjenja relativne ekspresije proteina FoxP3 u ovim ćelijama. Kao što je prethodno navedeno, FoxP3 je transkripcioni faktor koji ima bitnu ulogu u razvoju i očuvanju imunosupresivne funkcije Treg (Fontenot i sar., 2003; Khattri i sar., 2003). U skladu sa tim, može se zaključiti da se smanjenjem ekspresije FoxP3 koju indukuje GYY4137 remeti stabilnost Treg. Takođe, smanjenje nivoa ekspresije proteina FoxP3 indukovano GYY4137 je u skladu sa jednim od prethodnih rezultata na ćelijama PLČ miša, kojim je pokazano smanjenje nivoa ekspresije FoxP3 po $CD4^+CD25^+$ ćeliji (mfi). Održavanje adekvatnog nivoa i funkcije proteina FoxP3 je ključno za imunosupresivnu funkciju Treg, te je ekspresija ovog proteina kontrolisana složenom regulacijom. Danas je poznato da se regulacija ekspresije FoxP3 odvija na transkripcionom, epigenetičkom i posttranslacionom nivou (Lee i Lee, 2018; Loosdregt i Coffey, 2014). Posttranslaciona regulacija proteina FoxP3 podrazumeva kovalentne modifikacije aminokiselina koje utiču na aktivnost, lokalizaciju, degradaciju proteina i njegovu interakciju sa drugim proteinima. Jedna od posttranslacionih modifikacija koja je uključena u regulaciju ekspresije proteina FoxP3 je ubikvitinacija, kojom se ovaj protein obeležava za degradaciju u proteazomu (Loosdregt i Coffey, 2014). U tom kontekstu, ublažavanje efekta GYY4137 koje nastaje kao posledica primene inhibitora proteazoma ukazuje na značaj proteazomalne degradacije za efekat koji ovo jedinjenje ostvaruje na Treg. S obzirom na značaj ubikvitinacije i proteazomalne degradacije za regulaciju ekspresije proteina FoxP3, može se pretpostaviti da se doprinos proteazomalne degradacije efektu GYY4137 na Treg ogleda upravo u proteazomalnoj degradaciji FoxP3 i da je to mehanizam kojim GYY4137 dovodi do smanjenja nivoa ekspresije ovog proteina. Ipak, iako je u ovoj tezi pokazano smanjenje ekspresije proteina FoxP3 u $CD4^+$ T limfocitima nakon tretmana GYY4137, kao i značaj proteazomalne degradacije za efekat GYY4137 na Treg, smanjenje nivoa proteina FoxP3 može biti posledica i nekih drugih uticaja koji su nezavisni od proteazomalne degradacije. Shodno tome neophodna su dalja istraživanja koja bi ispitala direktnu vezu između proteazomalne degradacije i nivoa FoxP3 nakon tretmana GYY4137.

Jedan od koraka u istraživanju mehanizma kojim GYY4137 ostvaruje efekat na Treg je podrazumevao ispitivanje interakcija koje ovo jedinjenje ostvaruje sa signalnim putem kinaze mTOR. Kinaza mTOR je evolutivno konzervirana serin/treonin kinaza koja predstavlja ključni regulator ćelijskog rasta, proliferacije i diferencijacije (Laplante i Sabatini, 2012). Svoju funkciju kinaza mTOR može ostvarivati kombinovanjem u dva različita multiproteinska kompleksa, koji se razlikuju po prisustvu adapterskih proteina i označavaju se kao mTORC1 i mTORC2 (Chapman i Chi, 2014). Imajući u vidu da se inhibicijom mTOR signalnog puta stimuliše ekspresija proteina FoxP3, ekspanzija Treg i njihova regulatorna funkcija (Chapman i Chi, 2014), kao i da su mnoge studije pokazale sposobnost H_2S da aktivira mTOR signalni put (Yang i sar., 2017; Zhang i sar., 2018; Wang i sar., 2017), najpre je ispitano kako inhibicija ovog signalnog puta utiče na efekat koji GYY4137 ostvaruje na Treg. Ublažavanje efekta ovog jedinjenja na Treg, koje nastaje kao posledica primene rapamicina, je ukazalo na mogućnost da deo svog efekta GYY4137 ostvaruje posredstvom stimulacije signalnog puta mTOR. Kako bi se dalje ispitala ova pretpostavka, ispitan je uticaj GYY4137 na aktivacioni status kinaze S6, koju aktivira kompleks mTORC1, i kinaze Akt, koju aktivira kompleks mTORC2, u $CD4^+$ T limfocitima prečišćenim iz populacije ćelija PLČ miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA. Odsustvo uticaja GYY4137 na aktivaciju kinaze Akt je bilo u skladu sa odsustvom uticaja inhibitora ove kinaze (Ly294002) na efekat koji GYY4137 ostvaruje na Treg. S druge strane, neočekivano

smanjenje aktivacije kinaze S6, uzrokovano primenom GYY4137, nije bilo u skladu sa uočenim ublažavanjem efekta GYY4137, koje nastaje kao rezultat inhibicije kinaze mTOR. Takođe, na osnovu toga što GYY4137 nije doveo do povećanja aktivacije kinaza Akt i S6 se može pretpostaviti da GYY4137 nije uzrokovao stimulaciju mTOR signalnog puta prilikom delovanja na Treg. Pored toga, neslaganje između efekta GYY4137 na aktivaciju S6 kinaze i efekta rapamicina na uticaj GYY4137 na Treg se može objasniti delovanjem GYY4137 posredstvom alternativnog signalnog puta, koji ne uključuje kinazu mTOR, a koji moduliše aktivnost S6 kinaze. Naime, poznato je da pored kinaze mTOR, aktivnost S6 kinaze mogu regulisati i kinaze PDK-1 i ERK, koje fosforilišu i aktiviraju kinazu S6 u odgovoru na različite stimulse (Kuemmerle, 2002; Sawicka i sar., 2016; Richards i sar., 1999). Shodno tome, može se pretpostaviti da GYY4137 svoj efekat na smanjenje aktivnosti kinaze S6 nije ostvario posredstvom kinaze mTOR, već modulacijom aktivnosti neke od prethodno navedenih kinaza. U tom kontekstu je u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan samo uticaj inhibitora kinaze ERK (PD98059) na efekat GYY4137 na procentualnu zastupljenost Treg. Izostanak uticaja inhibitora kinaze ERK je očekivan s obzirom na to da je prethodno navedeno da se, zbog efekta na S6 kinazu, očekuje smanjenje aktivacije ove kinaze kao posledica delovanja GYY4137. Ipak, neophodno je detaljno ispitivanje efekta GYY4137 na aktivaciju kinaze ERK i PDK-1 pre izvođenja bilo kakvog zaključka.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da, osim u ćelijama PLČ pacova i miševa imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, GYY4137 dovodi do smanjenja produkcije encefalitogenih citokina IL-17 i IFN- γ i u imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a. S obzirom na to da imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine predstavljaju *in vivo* restimulisane ćelije, efekat GYY4137 na produkciju citokina u ovim ćelijama dodatno ide u prilog potentnosti donora. Sposobnost GYY4137 da smanji produkciju ovih citokina u imunskim ćelijama izolovanim iz CNS-a je naročito bitna kada se ima u vidu prethodno pomenuta uloga IL-17 i IFN- γ u patogenezi EAE-a (Soulika i sar., 2009; Zehntner i sar., 2005; Huppert i sar., 2010; Ottum i sar., 2015). Takođe, pokazana pozitivna korelacija između povećane produkcije citokina IL-17 i IFN- γ i stepena demijelinizacije u EAE-a dodatno ide u prilog antiencefalitogenom potencijalu GYY4137 (Arrelano i sar., 2015). Pored toga, sposobnost H₂S da deluje na smanjenje produkcije IL-17 u CNS-u prethodno je pokazana u studiji Ma i saradnika, što takođe ide u prilog ovom nalazu (Ma i sar., 2017).

Za razliku od efekta koji je ostvario na zastupljenost populacija Treg i Th17 unutar CD4⁺ populacije ćelija PLČ, GYY4137 je doveo do smanjenja procentualne zastupljenosti Th17 limfocita unutar populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine, dok nije uticao na zastupljenost Treg limfocita. Ovaj rezultat je postao naročito interesantan nakon isključivanja mogućnosti uticaja različitih emulzija korišćenih u imunizaciji životinja iz kojih su izolovane ćelije PLČ i imunske ćelije kičmene moždine. S obzirom na to da je isti efekat na zastupljenost Treg i Th17 limfocita unutar populacije ćelija PLČ ostvaren pri imunizaciji emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA i emulzijom HKM u CFA, zaključeno je da suprotan efekat na zastupljenost subpopulacija T limfocita unutar populacije imunskih ćelija izolovanih iz kičmene moždine nije posledica imunizacije emulzijom HKM u CFA. Suprotan efekat koji je GYY4137 ostvario na zastupljenost različitih populacija T limfocita izolovanih iz sekundarnih limfnih organa i iz CNS-a mogao bi biti posledica inherentnih razlika između ovih ćelija, koje nastaju usled uticaja različitih miljea kojima su ove ćelije bile izložene neposredno pre primene GYY4137. Ovakvoj pretpostavci u prilog idu podaci iz literature koji ukazuju na to da se T limfociti izolovani iz perifernih limfnih organa i iz CNS-a EAE životinja razlikuju u ekspresiji različitih molekula koji određuju njihov status aktivacije (Flugel i sar., 2001; Miljković i sar., 2011; Stojić-Vukanić i sar., 2016). Naime, T limfociti izolovani iz CNS-a životinja na piku EAE-a se odlikuju sličnom ekspresijom površinskih molekula kao i T limfociti koji su *in vitro* restimulisani, dok to nije slučaj sa T limfocitima izolovanim iz perifernih limfnih organa u induktivnoj fazi (Flugel i sar., 2001). Zbog toga se T limfociti

CNS-a na piku EAE-a smatraju *in vivo* restimulisanim ćelijama. Ovakve razlike u T limfocitima perifernih limfnih organa i CNS-a EAE životinja mogu usloviti njihovu različitu podložnost delovanju GYY4137. Pored toga, objašnjenje suprotnog efekta GYY4137 na Treg sekundarnih limfnih organa i CNS-a se može pretpostaviti na osnovu rezultata studije Hood-a i saradnika. Ova studija je pokazala da se Treg izolovane iz CNS-a i limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije razlikuju u afinitetu prema autoantigenu i u metilacionom statusu demetilisanog regiona specifičnog za Treg (*engl.*, Treg-specific demethylated region, TSDR). Takođe, ova studija je na osnovu metilacionog statusa ovih ćelija, kao i ekspresije markera timusnog porekla (Helios) pretpostavila da je najveći deo Treg ćelija CNS-a timusnog porekla, dok to nije slučaj sa Treg limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije (Hood i sar., 2015). Za objašnjenje rezultata ove doktorske disertacije je naročito bitna činjenica da se demetilacijom TSDR timusnih Treg postiže stabilna ekspresija FoxP3 i njeno održavanje kroz ćelijske deobe, a da za razliku od timusnih Treg, indukovane Treg nemaju visok stepen demetilacije u ovom regionu (Zheng i sar., 2010; Vahl i sar., 2014; Waight i sar., 2015). Na osnovu svega navedenog se može pretpostaviti da zbog višeg stepena hipometilacije TSDR Treg CNS-a i stabilne ekspresije FoxP3 u ovim ćelijama, GYY4137 ne dovodi do smanjenja ekspresije ovog transkripcionog faktora, a samim tim ne utiče ni na zastupljenost Treg CNS-a. S druge strane, odsustvo hipometilacije u TSDR regionu Treg limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije čini ekspresiju FoxP3 znatno manje stabilnom i podložnijom negativnom efektu GYY4137.

Osim u ovoj doktorskoj disertaciji, uticaj H₂S na Treg ćelije je ispitan u studiji Yanga i saradnika (Yang i sar., 2015). Kao što je prethodno navedeno, rezultati ove studije su pokazali da H₂S promoviše diferencijaciju i supresivnu funkciju Treg kroz stimulaciju ekspresije Tet1 i Tet2 enzima koji vrše demetilaciju regiona gena FoxP3. Neslaganje sa rezultatima ove doktorske disertacije može se objasniti time da je u pomenutoj studiji ispitivan značaj H₂S za Treg u kontekstu njegovog nedostatka u uslovima homeostaze u organizmu. S druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je uticaj dodatnih, ali ipak fizioloških, količina H₂S u *ex vivo* eksperimentima na Treg ćelije izolovane iz tkiva u stanju inflamacije. S obzirom na to da je GYY4137 imao različit uticaj na Treg poreklom iz sekundarnih limfnih organa i iz CNS-a, može se pretpostaviti da je po sličnom principu usled razlika između Treg izolovanih u različitim uslovima, H₂S ostvario različit efekat u dvema studijama. Suprotni rezultati dobijeni u različitim studijama ukazuju na potrebu da se uticaj GYY4137 na Treg u EAE-u ispita u *in vivo* uslovima.

Uprkos tome što je prošlo skoro dve decenije od otkrivanja biološke aktivnosti H₂S, uloga ovog gasotransmitera u homeostazi i patofiziološkim procesima i dalje nije u potpunosti razjašnjena i često se u literaturi može naići na kontradiktorne podatke. S druge strane, MS je kompleksna bolest, a brojni činioci koji doprinose njenoj patogenezi i danas nisu dovoljno poznati. U cilju što adekvatnije modulacije ove bolesti i omogućavanja maksimalnog kvaliteta života pacijenata neophodno je potpunije razumeti unutrašnje i spoljašnje faktore koji na različite načine interferiraju sa nastankom i tokom MS-e. Zbog toga se značaj rezultata ove doktorske disertacije ne ogleda samo u ispitivanju mogućnosti primene GYY4137 u terapijske svrhe u MS-i, već i u odgovoru na bazično naučno pitanje – kakav je doprinos H₂S kao endogenog faktora patogenezi MS-e. Upravo je zbog svojih specifičnih karakteristika koje se ogledaju u sporom oslobađanju fizioloških koncentracija H₂S, GYY4137 naročito pogodan za imitaciju efekta endogenog H₂S.

Sveukupno su rezultati ove doktorske disertacije pokazali da je GYY4137 ostvario specifične efekte na različite tipove imunskih ćelija uključenih u patogenezu EAE-a i MS-e. Intenzitet i priroda ostvarenih efekata su varirali u zavisnosti od tipa imunskih ćelija, kao i u zavisnosti od specifičnog miljea iz kog ove ćelije potiču. Iako su efekti ovog jedinjenja bili pretežno antiinflamacijske prirode, GYY4137 je

ispoljio i dejstvo koje bi potencijalno moglo doprinosti patogenezi EAE-a i MS-e. Sumarno, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je najizraženiji antiinflamacijski efekat GYY4137 ostvario na rezidentne i infiltrirane ćelije CNS-a – mikrogliju i T limfocite izolovane iz kičmene moždine, dok su znatno slabiji ili čak negativni efekti ostvareni na T limfocite sekundarnih limfnih organa i DĆ-a, koje su ključne za aktivaciju naivnih T limfocita u sekundarnim limfnim organima. Prikazani rezultati ukazuju da GYY4137 poseduje značajan antiencefalitogeni potencijal, koji je neophodno dodatno ispitati u *in vivo* studijama. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju i na to da uloga H₂S kao endogenog faktora u patogenezi EAE-a i MS-e može varirati u zavisnosti od uslova mikrosredine i tipa ćelija. Značaj ovih rezultata se ogleda i u tome što su, doprinoseći razumevanju plejotropne uloge H₂S u imunskom sistemu, ukazali da pri eventualnoj primeni modulacije nivoa ovog gasa u svrhu terapije MS-e treba imati u vidu da i suplementacija H₂S i inhibicija sinteze H₂S, u zavisnosti od faze bolesti ili tkiva u u kojoj su primenjene, mogu imati povoljan učinak na tok bolesti. Uz to, prikazani rezultati ukazuju i na neophodnost opreza pri modulaciji koncentracije H₂S, s obzirom na to da ovaj molekul može ostvariti i pro- i antiinflamacijsku ulogu na ćelije uključene u patogenezu EAE-a i MS-e.

6. Zaključci

Na osnovu ciljeva postavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uticaj *in vitro* primene GYY4137 na APC-e se ogleda u:
 - i) Ostvarivanju imunomodulacijskog dejstva na aktivirane BV2 mikroglijske ćelije, tako što:
 - Ne utiče na vijabilnost ovih ćelija u koncentracijama do 200 μ M
 - Ostvaruje brz i trajan efekat na adhezivna svojstva i smanjuje sposobnost fagocitoze aktiviranih BV2 ćelija
 - Smanjuje produkciju NO i proinflamacijskog citokina TNF u ovim ćelijama
 - Povećava produkciju ROS posredstvom oslobođenog H₂S u ovim ćelijama
 - Smanjuje ekspresiju kostimulatornih molekula CD40 i CD86 u ovim ćelijama
 - ii) Ostvarivanju ograničenog imunomodulacijskog dejstva na DČ diferentovane iz ćelija kostne srži C57BL/6 miševa, tako što:
 - Ne utiče na vijabilnost ovih ćelija u koncentraciji 200 μ M
 - Povećava produkciju antiinflamacijskog citokina TGF- β i ne utiče na produkciju ROS i proinflamacijskih citokina u ovim ćelijama
 - Ne utiče na sposobnost fagocitoze ovih ćelija
 - Ne utiče na ekspresiju molekula MHC II, CD40 i CD80 na ovim ćelijama
2. *Ex vivo* primena GYY4137 ostvaruje imunomodulacijski efekat na imunske ćelije PLČ C57BL/6 miševa i DA pacova, imunizovanih emulzijom MOG₃₅₋₅₅ u CFA, tako što:
 - Ne utiče na vijabilnost ukupnih imunskih ćelija PLČ u koncentraciji 200 μ M
 - Smanjuje produkciju encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17 u ovim ćelijama
 - Smanjuje procentualnu zastupljenost Treg, a ne utiče na zastupljenost Th17 ćelija, među ćelijama PLČ pacova
 - Smanjuje procentualnu zastupljenost Treg posredstvom oslobođenog H₂S, a ne utiče na zastupljenost Th1 i Th17 ćelija, među ćelijama PLČ miševa
 - Smanjuje nivo ekspresije proteina FoxP3 u CD4⁺ T limfocitima PLČ miševa, najverovatnije posredstvom stimulacije njegove proteazomalne degradacije
 - Smanjuje aktivaciju kinaze S6, ali ne utiče na aktivaciju kinaze Akt u CD4⁺ T limfocitima PLČ miševa
 - Povećava produkciju ROS u CD4⁺ T limfocitima PLČ miševa, pri čemu je to povećanje najizraženije u populaciji Treg
3. *Ex vivo* primena GYY4137 ostvaruje imunosupresivno dejstvo na imunske ćelije izolovane iz kičmene moždine DA pacova obolelih od EAE-a tako što:
 - Smanjuje produkciju encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17 u ovim ćelijama
 - Smanjuje procentualnu zastupljenost Th17 ćelija, dok ne utiče na zastupljenost Treg, među ćelijama izolovanim iz kičmene moždine pacova obolelih od EAE-a

Na osnovu prethodno iznetih pojedinačnih zaključaka se može izvesti opšti zaključak da GYY4137 ostvaruje imunomodulacijski efekat na imunske ćelije uključene u patogenezu EAE-a, pri čemu priroda i intenzitet ovog efekta variraju u zavisnosti od tipa ćelija i miljea iz kojeg ćelije potiču. Iako su među imunomodulacijskim efektima koje je GYY4137 ostvario na ispitane imunske ćelije dominirali

imunosupresivni efekti, GYY4137 je u nekim slučajevima ostvario i potencijalno proinflamacijsko dejstvo. Najizraženiji imunosupresivni efekat GYY4137 je ostvario na rezidentne i infiltrirane imunske ćelije CNS-a, mikrogliju i CD4⁺ T limfocite izolovane iz kičmene moždine pacova, dok je ograničeno imunosupresivno dejstvo GYY4137 ostvario na DC, koje su ključne za aktivaciju naivnih T limfocita u sekundarnim limfnim organima. S druge strane, GYY4137 je ostvario dvoznačni uticaj na imunske ćelije PLČ, dovodeći do smanjenja produkcije encefalitogenih citokina IFN- γ i IL-17 u ovim ćelijama, ali i do smanjenja procentualne zastupljenosti Treg. Dakle, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da uloga H₂S kao endogenog faktora u patogenezi EAE-a i MS-e može varirati u zavisnosti od ćelijskog i sredinskog konteksta. Konačno, može se zaključiti da GYY4137 poseduje anti-encefalitogeni potencijal, ali da su neophodna dodatna istraživanja radi provere primenljivosti modulacije nivoa H₂S u svrhu terapije MS-e.

7. Literatura

- Adda DH, Beraud E, Depieds R. Evidence for suppressor cells in Lewis rats' experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1977 Sep;7(9):620-3. doi: 10.1002/eji.1830070908.
- Ahern GP, Hsu SF, Klyachko VA, Jackson MB. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem.* 2000 Sep 15;275(37):28810-5. doi: 10.1074/jbc.M003090200.
- Albina JE, Henry WL Jr. Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway. *J Surg Res.* 1991 Apr;50(4):403-9. doi: 10.1016/0022-4804(91)90210-d.
- Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2015 Sep 29;6:492. doi: 10.3389/fimmu.2015.00492.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* 2007 Apr;61(4):288-99. doi: 10.1002/ana.21117.
- Attene-Ramos MS-e, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res.* 2007 May;5(5):455-9. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0439. Epub 2007 May 2.
- Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(2):149-88. doi: 10.1615/critrevimmunol.v26.i2.40.
- Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):172-80. doi: 10.1038/ni1430. Epub 2007 Jan 7.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588.
- Basu R, Whitley SK, Bhaumik S, Zindl CL, Schoeb TR, Benveniste EN, Pear WS, Hatton RD, Weaver CT. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat Immunol.* 2015 Mar;16(3):286-95. doi: 10.1038/ni.3099. Epub 2015 Feb 2.
- Beier UH, Angelin A, Akimova T, Wang L, Liu Y, Xiao H, Koike MA, Hancock SA, Bhatti TR, Han R, Jiao J, Veasey SC, Sims CA, Baur JA, Wallace DC, Hancock WW. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3⁺ T-regulatory cell function and allograft survival. *FASEB J.* 2015 Jun;29(6):2315-26. doi: 10.1096/fj.14-268409. Epub 2015 Feb 13.
- Belikov AV, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci.* 2015 Oct 15;22:85. doi: 10.1186/s12929-015-0194-3.
- Beltowski J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. *Pharmacol Rep.* 2015 Jun;67(3):647-58. doi: 10.1016/j.pharep.2015.01.005. Epub 2015 Jan 22.
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 22;113(12):E1738-46. doi: 10.1073/pnas.1525528113. Epub 2016 Feb 16.

- Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun*. 2004 Jan;18(1):7-12. doi: 10.1016/j.bbi.2003.09.001.
- Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Lington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1073-81. doi: 10.1084/jem.20021603.
- Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009 Dec;21(6):612-8. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.011. Epub 2009 Oct 23.
- 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 May;27(2-3):229-37. doi: 10.1016/0165-5728(90)90073-v.
- Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1982 Sep-Oct;8(5):365-75. doi: 10.1111/j.1365-2990.1982.tb00305.x.
- Brancaleone V, Mitidieri E, Flower RJ, Cirino G, Perretti M. Annexin A1 mediates hydrogen sulfide properties in the control of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Oct;351(1):96-104. doi: 10.1124/jpet.114.217034. Epub 2014 Jul 30.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia*. 1998 Jan;22(1):72-85. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199801)22:1<72::aid-glia7>3.0.co;2-a.
- Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1295-311. doi: 10.2217/imt.14.84.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86. doi: 10.1084/jem.20030152.
- Chen YH, Yao WZ, Geng B, Ding YL, Lu M, Zhao MW, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest*. 2005 Nov;128(5):3205-11. doi: 10.1378/chest.128.5.3205.
- Chen YH, Wu R, Geng B, Qi YF, Wang PP, Yao WZ, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine*. 2009 Feb;45(2):117-23. doi: 10.1016/j.cyto.2008.11.009. Epub 2008 Dec 30.
- Choi SH, Aid S, Kim HW, Jackson SH, Bosetti F. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *J Neurochem*. 2012 Jan;120(2):292-301. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07572.x. Epub 2011 Nov 28.
- Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2018 May 15;318:1-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.015. Epub 2018 Feb 27.
- Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DA; CARE-MS-e I investigators. Alemtuzumab versus interferon beta

- Ia as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012 Nov 24;380(9856):1819-28. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61769-3. Epub 2012 Nov 1.
- Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006 Mar;129(Pt 3):606-16. doi: 10.1093/brain/awl007. Epub 2006 Jan 16.
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS-e). *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(4):1079-106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
- Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiernemann C. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol*. 2005 Oct;146(4):498-505. doi: 10.1038/sj.bjp.0706367.
- Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E, Harms L, Then Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T, Heuschmann P, Rosche B. Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol*. 2011 Oct 6;11:123. doi: 10.1186/1471-2377-11-123.
- Cortese I, Chaudhry V, So YT, Cantor F, Cornblath DR, Rae-Grant A. Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2011 Jan 18;76(3):294-300. doi: 10.1212/WNL.0b013e318207b1f6.
- Corvino A, Frecentese F, Magli E, Perissutti E, Santagada V, Scognamiglio A, Caliendo G, Fiorino F, Severino B. Trends in H₂S-Donors Chemistry and Their Effects in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Mar 11;10(3):429. doi: 10.3390/antiox10030429.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8. doi: 10.1038/nature01355.
- Dang PT, Bui Q, D'Souza CS, Orian JM. Modelling MS-e: Chronic-Relapsing EAE in the NOD/Lt Mouse Strain. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;26:143-77. doi: 10.1007/7854_2015_378.
- Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, de Courten M, Matsoukas J, Apostolopoulos V. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci*. 2017 Jul 7;7(7):78. doi: 10.3390/brainsci7070078.
- Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience*. 2008 Mar 3;152(1):169-77. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.008.
- Day, M. "Histopathology of EAE. Experimental Models of Multiple Sclerosis. LE and C C." (2005): 25-43.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73

- expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1257-65. doi: 10.1084/jem.20062512. Epub 2007 May 14.
- Dilek N, Papapetropoulos A, Toliver-Kinsky T, Szabo C. Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system. *Pharmacol Res.* 2020 Nov;161:105119. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105119. Epub 2020 Aug 8.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012 May 25;149(5):1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- De Cicco P, Ercolano G, Rubino V, Terrazzano G, Ruggiero G, Cirino G, Ianaro A. Modulation of the functions of myeloid-derived suppressor cells : a new strategy of hydrogen sulfide anti-cancer effects. *Br J Pharmacol.* 2020 Feb;177(4):884-897. doi: 10.1111/bph.14824. Epub 2019 Nov 27.
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Sep 15;15(9):545-58. doi: 10.1038/nri3871. Epub 2015 Aug 7.
- Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS-e. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med.* 2002 Jan 7;195(1):59-70. doi: 10.1084/jem.20010659.
- Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019 Jan;26(1):27-40. doi: 10.1111/ene.13819. Epub 2018 Nov 18.
- Dogan RN, Long N, Forde E, Dennis K, Kohm AP, Miller SD, Karpus WJ. CCL22 regulates experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling inflammatory macrophage accumulation and effector function. *J Leukoc Biol.* 2011 Jan;89(1):93-104. doi: 10.1189/jlb.0810442. Epub 2010 Oct 12.
- Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2010 Nov 29;5(11):e15531. doi: 10.1371/journal.pone.0015531.
- Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol.* 2017 Dec 11;8:1764. doi: 10.3389/fimmu.2017.01764.
- Dong XB, Yang CT, Zheng DD, Mo LQ, Wang XY, Lan AP, Hu F, Chen PX, Feng JQ, Zhang MF, Liao XX. Inhibition of ROS-activated ERK1/2 pathway contributes to the protection of H₂S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cells. *Mol Cell Biochem.* 2012 Mar;362(1-2):149-57. doi: 10.1007/s11010-011-1137-2. Epub 2011 Dec 2.
- Eghbal MA, Pennefather PS, O'Brien PJ. H₂S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology.* 2004 Oct 15;203(1-3):69-76. doi: 10.1016/j.tox.2004.05.020.
- El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010 Jun;5(2):189-97. doi: 10.1007/s11481-009-9188-9. Epub 2010 Jan 27.

- Esechie A, Kiss L, Olah G, Horváth EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Aug;115(3):91-7. doi: 10.1042/CS20080021.
- Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Döpp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*. 2005 Sep;51(4):297-305. doi: 10.1002/glia.20208.
- Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, Wiendl H. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2007 Mar;147(3):412-8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03271.x.
- Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 2001 May;14(5):547-60. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00143-1.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6. doi: 10.1038/ni904. Epub 2003 Mar 3.
- Freedman SN, Shahi SK, Mangalam AK. The "Gut Feeling": Breaking Down the Role of Gut Microbiome in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2018 Jan;15(1):109-125. doi: 10.1007/s13311-017-0588-x.
- French HM, Reid M, Mamontov P, Simmons RA, Grinspan JB. Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *J Neurosci Res*. 2009 Nov 1;87(14):3076-87. doi: 10.1002/jnr.22139.
- Freseghna D, Bullitta S, Musella A, Rizzo FR, De Vito F, Guadalupi L, Caioli S, Balletta S, Sanna K, Dolcetti E, Vanni V, Bruno A, Buttari F, Stampanoni Bassi M, Mandolesi G, Centonze D, Gentile A. Re-Examining the Role of TNF in MS-e Pathogenesis and Therapy. *Cells*. 2020 Oct 14;9(10):2290. doi: 10.3390/cells9102290.
- Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1940-52. doi: 10.1093/brain/awl083. Epub 2006 Apr 24.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1175-89. doi: 10.1093/brain/awp070. Epub 2009 Mar 31.
- Frossi B, De Carli M, Piemonte M, Pucillo C. Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells. *Mol Immunol*. 2008 Jan;45(1):58-64. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.008. Epub 2007 Jun 22.
- Fu LH, Wei ZZ, Hu KD, Hu LY, Li YH, Chen XY, Han Z, Yao GF, Zhang H. Hydrogen sulfide inhibits the growth of *Escherichia coli* through oxidative damage. *J Microbiol*. 2018 Apr;56(4):238-245. doi: 10.1007/s12275-018-7537-1.

- Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2015 Sep;5(9):e00362. doi: 10.1002/brb3.362. Epub 2015 Aug 3.
- Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 2016 Mar 15;44(3):439-449. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.024.
- Giovinazzo D, Bursac B, Sbodio JJ, Nalluru S, Vignane T, Snowman AM, Albacarys LM, Sedlak TW, Torregrossa R, Whiteman M, Filipovic MR, Snyder SH, Paul BD. Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer's disease by sulfhydrating GSK3 β and inhibiting Tau hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jan 26;118(4):e2017225118. doi: 10.1073/pnas.2017225118.
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* 2010 Oct 21;467(7318):967-71. doi: 10.1038/nature09447.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71. doi: 10.1093/brain/awl075. Epub 2006 Apr 21.
- Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT; DEFINE Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012 Sep 20;367(12):1098-107. doi: 10.1056/NEJMoa1114287. Erratum in: *N Engl J Med.* 2012 Dec 13;367(24):2362.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1783-6. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1783.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* 2002 Jun 3;195(11):1499-505. doi: 10.1084/jem.20012076.
- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012 Jul;248(1):87-103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x.
- Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. *Platelets.* 2014;25(3):166-74. doi: 10.3109/09537104.2013.786823. Epub 2013 Apr 15.
- Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005 Jun 3;121(5):671-4. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.019.
- Grytten Torkildsen N, Lie SA, Aarseth JH, Nyland H, Myhr KM. Survival and cause of death in multiple sclerosis: results from a 50-year follow-up in Western Norway. *Mult Scler.* 2008 Nov;14(9):1191-8. doi: 10.1177/1352458508093890. Epub 2008 Jul 16.

- Guo R, Lin J, Xu W, Shen N, Mo L, Zhang C, Feng J. Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of the p38 MAPK pathway in H9c2 cells. *Int J Mol Med*. 2013 Mar;31(3):644-50. doi: 10.3892/ijmm.2013.1246. Epub 2013 Jan 15.
- Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005 Nov;35(11):3343-52. doi: 10.1002/eji.200526065.
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010 Sep 1;5(9):e12496. doi: 10.1371/journal.pone.0012496.
- Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler*. 2005 Oct;11(5):504-10. doi: 10.1191/1352458505ms1220oa.
- Hasan Z, Koizumi SI, Sasaki D, Yamada H, Arakaki N, Fujihara Y, Okitsu S, Shirahata H, Ishikawa H. JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun*. 2017 May 30;8:15628. doi: 10.1038/ncomms15628.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792-804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- Hayes CE, Hubler SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE. Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2015 Mar 18;6:100. doi: 10.3389/fimmu.2015.00100.
- He T, Liu S, Chen S, Ye J, Wu X, Bian Z, Chen X. The p38 MAPK Inhibitor SB203580 Abrogates Tumor Necrosis Factor-Induced Proliferative Expansion of Mouse CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2018 Jul 9;9:1556. doi: 10.3389/fimmu.2018.01556.
- 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. doi: 10.14573/altex.2009.2.83.
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rüllicke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):146-52. doi: 10.1038/nm1177. Epub 2005 Jan 23. Erratum in: *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):455.
- Hickman SE, El Khoury J. TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014 Apr 15;88(4):495-8. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.021. Epub 2013 Dec 16.
- Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015 Nov;64:13-25. doi: 10.1016/j.jaut.2015.06.010. Epub 2015 Jul 2.

- Hood JD, Zarnitsyna VI, Zhu C, Evavold BD. Regulatory and T Effector Cells Have Overlapping Low to High Ranges in TCR Affinities for Self during Demyelinating Disease. *J Immunol.* 2015 Nov 1;195(9):4162-70. doi: 10.4049/jimmunol.1501464. Epub 2015 Sep 18.
- Hou X, Yuan Y, Sheng Y, Yuan B, Wang Y, Zheng J, Liu CF, Zhang X, Hu LF. GYY4137, an H₂S Slow-Releasing Donor, Prevents Nitrate Stress and α -Synuclein Nitration in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Pharmacol.* 2017 Oct 30;8:741. doi: 10.3389/fphar.2017.00741.
- Howie D, Cobbold SP, Adams E, Ten Bokum A, Necula AS, Zhang W, Huang H, Roberts DJ, Thomas B, Hester SS, Vaux DJ, Betz AG, Waldmann H. Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight.* 2017 Feb 9;2(3):e89160. doi: 10.1172/jci.insight.89160.
- Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J Neurochem.* 2007 Feb;100(4):1121-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04283.x. Epub 2006 Dec 22.
- Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect.* 2003 Aug;47(2):155-60. doi: 10.1016/s0163-4453(03)00043-4.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 2010 Apr;24(4):1023-34. doi: 10.1096/fj.09-141978. Epub 2009 Nov 25.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009 Oct 30;139(3):485-98. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
- Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. *PLoS One.* 2012;7(12):e48798. doi: 10.1371/journal.pone.0048798. Epub 2012 Dec 12.
- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011 Sep;33(3):545-67. doi: 10.3109/08923973.2010.513391. Epub 2011 Feb 2.
- Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One.* 2008 Feb 20;3(2):e1612. doi: 10.1371/journal.pone.0001612.
- Jeffery ND, Blakemore WF. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol.* 1995 Oct;24(10):775-81. doi: 10.1007/BF01191213.
- Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Lington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Jul;42(7):1804-14. doi: 10.1002/eji.201141947. Epub 2012 Jun 12.

- Joyner-Matos J, Predmore BL, Stein JR, Leeuwenburgh C, Julian D. Hydrogen sulfide induces oxidative damage to RNA and DNA in a sulfide-tolerant marine invertebrate. *Physiol Biochem Zool.* 2010 Mar-Apr;83(2):356-65. doi: 10.1086/597529.
- Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015 Apr 22;69:496-502. doi: 10.5604/17322693.1150133.
- Juurlink BH, Sweeney MI. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Mar;21(2):121-8. doi: 10.1016/s0149-7634(96)00001-2.
- Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem.* 2010 Jul 16;285(29):21903-7. doi: 10.1074/jbc.R110.128363. Epub 2010 May 6.
- Kahl KG, Zielasek J, Uttenthal LO, Rodrigo J, Toyka KV, Schmidt HH. Protective role of the cytokine-inducible isoform of nitric oxide synthase induction and nitrosative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis of the DA rat. *J Neurosci Res.* 2003 Jul 15;73(2):198-205. doi: 10.1002/jnr.10649.
- Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol.* 2014;72(3-4):132-41. doi: 10.1159/000360528. Epub 2014 Jul 30.
- Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016 Nov;37(11):803-811. doi: 10.1016/j.it.2016.08.012. Epub 2016 Sep 9.
- Kapellos TS, Iqbal AJ. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6591703. doi: 10.1155/2016/6591703. Epub 2016 Apr 10.
- Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P; FREEDOMS-e Study Group. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):387-401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494. Epub 2010 Jan 20.
- Karpus WJ, Swanborg RH. CD4+ suppressor cells differentially affect the production of IFN-gamma by effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1989 Dec 1;143(11):3492-7.
- Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Apr 2;8(4):a029025. doi: 10.1101/cshperspect.a029025.
- Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):309-14. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.012. Epub 2007 Apr 12.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):337-42. doi: 10.1038/ni909. Epub 2003 Mar 3.
- Kim SJ, Diamond B. Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 May;41:49-58. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.020. Epub 2014 Apr 18.

- Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jan 7;267(1):129-33. doi: 10.1006/bbrc.1999.1915.
- Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010 Jul;40(7):1830-5. doi: 10.1002/eji.201040391.
- Kloesch B, Liszt M, Broell J. H₂S transiently blocks IL-6 expression in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes and deactivates p44/42 mitogen-activated protein kinase. *Cell Biol Int.* 2010 Mar 29;34(5):477-84. doi: 10.1042/CBI20090436.
- Ko HJ, Brady JL, Ryg-Cornejo V, Hansen DS, Vremec D, Shortman K, Zhan Y, Lew AM. GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2202-9. doi: 10.4049/jimmunol.1302040. Epub 2014 Jan 31.
- Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010 May;9(5):520-32. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
- Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):4712-6. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.4712.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):423-31. doi: 10.1038/nm1564. Epub 2007 Mar 25.
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med.* 2008 Jul 7;205(7):1535-41. doi: 10.1084/jem.20080159. Epub 2008 Jun 23. PMID: 18573909; PMCID: PMC2442630.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4651-5. doi: 10.1073/pnas.88.11.4651.
- Kuemmerle JF. IGF-I elicits growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of PI3K, PDK-1, and p70S6 kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Mar;284(3):G411-22. doi: 10.1152/ajpgi.00310.2002. Epub 2002 Nov 20.
- Kumar M, Sandhir R. Neuroprotective Effect of Hydrogen Sulfide in Hyperhomocysteinemia Is Mediated Through Antioxidant Action Involving Nrf2. *Neuromolecular Med.* 2018 Dec;20(4):475-490. doi: 10.1007/s12017-018-8505-y. Epub 2018 Aug 13.
- Kurschus FC. T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomed J.* 2015 May-Jun;38(3):183-93. doi: 10.4103/2319-4170.155590.
- Kurts C, Heath WR, Kosaka H, Miller JF, Carbone FR. The peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):415-20. doi: 10.1084/jem.188.2.415.
- Kurtzke JF. MS-e epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1995;161:23-33. doi: 10.1111/j.1600-0404.1995.tb05853.x.

- Lan A, Liao X, Mo L, Yang C, Yang Z, Wang X, Hu F, Chen P, Feng J, Zheng D, Xiao L. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e25921. doi: 10.1371/journal.pone.0025921. Epub 2011 Oct 5.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233-40. doi: 10.1084/jem.20041257.
- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):210-8. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.
- Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017 Feb;133(2):223-244. doi: 10.1007/s00401-016-1631-4. Epub 2016 Oct 20.
- Lattanzi S, Cagnetti C, Danni M, Provinciali L, Silvestrini M. Oral and intravenous steroids for multiple sclerosis relapse: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2017 Aug;264(8):1697-1704. doi: 10.1007/s00415-017-8505-0. Epub 2017 May 10.
- Laurent S, Carrega P, Saverino D, Piccioli P, Camoriano M, Morabito A, Dozin B, Fontana V, Simone R, Mortara L, Mingari MC, Ferlazzo G, Pistillo MP. CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum Immunol*. 2010 Oct;71(10):934-41. doi: 10.1016/j.humimm.2010.07.007. Epub 2010 Aug 1.
- Lazarević M, Battaglia G, Jevtić B, Đedović N, Bruno V, Cavalli E, Miljković Đ, Nicoletti F, Momčilović M, Fagone P. Upregulation of Tolerogenic Pathways by the Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 and Impaired Expression of H₂S-Producing Enzymes in Multiple Sclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 10;9(7):608. doi: 10.3390/antiox9070608.
- Lee ZW, Zhou J, Chen CS, Zhao Y, Tan CH, Li L, Moore PK, Deng LW. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011;6(6):e21077. doi: 10.1371/journal.pone.0021077. Epub 2011 Jun 20.
- Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med*. 2018 Mar 9;50(3):e456. doi: 10.1038/emm.2017.313.
- Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, Edan G. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010 Jul;133(Pt 7):1900-13. doi: 10.1093/brain/awq076. Epub 2010 Apr 27.
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*. 2005 Jul;19(9):1196-8. doi: 10.1096/fj.04-3583fje. Epub 2005 Apr 29.
- Li L, Bhatia M, Moore PK. Hydrogen sulphide--a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Apr;6(2):125-9. doi: 10.1016/j.coph.2005.10.007. Epub 2006 Feb 17.

- Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2008 May 6;117(18):2351-60. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467. Epub 2008 Apr 28.
- Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jul 1;47(1):103-13. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.014. Epub 2009 Apr 15.
- Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, Moore PK, Whiteman M. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med*. 2013 Mar;17(3):365-76. doi: 10.1111/jcmm.12016. Epub 2013 Jan 28.
- Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):845-58. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021.
- Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med*. 2006 May;12(5):518-25. doi: 10.1038/nm1402. Epub 2006 Apr 23.
- Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol*. 2013;120:163-84. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002 May;8(5):500-8. doi: 10.1038/nm0502-500.
- van Loosdregt J, Coffey PJ. Post-translational modification networks regulating FOXP3 function. *Trends Immunol*. 2014 Aug;35(8):368-78. doi: 10.1016/j.it.2014.06.005. Epub 2014 Jul 18.
- Lopez A, Prior MG, Reiffenstein RJ, Goodwin LR. Peracute toxic effects of inhaled hydrogen sulfide and injected sodium hydrosulfide on the lungs of rats. *Fundam Appl Toxicol*. 1989 Feb;12(2):367-73. doi: 10.1016/0272-0590(89)90053-5.
- Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):725-30. doi: 10.1172/JCI1528. Erratum in: *J Clin Invest* 1998 Apr 1;101(7):1542.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):246-51. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.05.012. Epub 2010 Jun 18.
- Lu P, Cao Y, Wang M, Zheng P, Hou J, Zhu C, Hu J. Mature dendritic cells cause Th17/Treg imbalance by secreting TGF- β 1 and IL-6 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cent Eur J Immunol*. 2016;41(2):143-52. doi: 10.5114/ceji.2016.60987. Epub 2016 Jul 15.

- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907-11. doi: 10.1212/wnl.46.4.907.
- Luo Y, Yang X, Zhao S, Wei C, Yin Y, Liu T, Jiang S, Xie J, Wan X, Mao M, Wu J. Hydrogen sulfide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase-3 pathway in cortical neurons. *Neurochem Int*. 2013 Dec;63(8):826-31. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.004. Epub 2013 Jun 14.
- Ma S, Zhong D, Ma P, Li G, Hua W, Sun Y, Liu N, Zhang L, Zhang W. Exogenous Hydrogen Sulfide Ameliorates Diabetes-Associated Cognitive Decline by Regulating the Mitochondria-Mediated Apoptotic Pathway and IL-23/IL-17 Expression in db/db Mice. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(5):1838-1850. doi: 10.1159/000471932. Epub 2017 Apr 3.
- Marigiò MA, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, De Rinaldis P, Fumarulo R. Sulfide enhancement of PMN apoptosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1998 Aug;20(3):399-408. doi: 10.3109/08923979809034822.
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993 Oct;92(4):1866-74. doi: 10.1172/JCI116778.
- Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, Mizumoto N, Yang C, Mummert ME, Oeda J, Masayasu H, Takashima A. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol*. 2003 Sep 15;171(6):3010-8. doi: 10.4049/jimmunol.171.6.3010.
- Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999 Apr;5(2):101-4. doi: 10.1177/135245859900500206.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3025-32. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.3025.
- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1390-7. doi: 10.1038/ni1539. Epub 2007 Nov 11.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2001 Oct 1;194(7):873-82. doi: 10.1084/jem.194.7.873.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74. doi: 10.1038/nri1457.
- Miljković D, Stanojević Z, Momcilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune

- encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology*. 2011 Sep;216(9):979-87. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.013. Epub 2011 Apr 7.
- Miljković D, Blaževski J, Petković F, Djedović N, Momčilović M, Stanisavljević S, Jevtić B, Mostarica Stojković M, Spasojević I. A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant anti-inflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. *J Immunol*. 2015 Mar 15;194(6):2493-503. doi: 10.4049/jimmunol.1402302. Epub 2015 Feb 13.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestruque S, Smoll A, Merrill JE. Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. *Neuroscience*. 1994 Aug;61(3):575-85. doi: 10.1016/0306-4522(94)90435-9.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009 Jun 19;30(6):899-911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019. Epub 2009 May 21.
- Mondanelli G, Bianchi R, Pallotta MT, Orabona C, Albini E, Iacono A, Belladonna ML, Vacca C, Fallarino F, Macchiarulo A, Ugel S, Bronte V, Gevi F, Zolla L, Verhaar A, Peppelenbosch M, Mazza EMC, Bicciato S, Laouar Y, Santambrogio L, Puccetti P, Volpi C, Grohmann U. A Relay Pathway between Arginine and Tryptophan Metabolism Confers Immunosuppressive Properties on Dendritic Cells. *Immunity*. 2017 Feb 21;46(2):233-244. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.005. Epub 2017 Feb 14.
- Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis*. 2005 Jan;10(1):209-17. doi: 10.1007/s10495-005-6076-5.
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009 Nov 10;2(96):ra72. doi: 10.1126/scisignal.2000464.
- Mustafina AN, Yakovlev AV, Gaifullina AS, Weiger TM, Hermann A, Sitdikova GF. Hydrogen sulfide induces hyperpolarization and decreases the exocytosis of secretory granules of rat GH3 pituitary tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Oct 2;465(4):825-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.095. Epub 2015 Aug 28.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. 2002 Jun;25(6):313-9. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02154-9.
- O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS-e; TEMS-eO Trial Group. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1293-303. doi: 10.1056/NEJMoa1014656.
- Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺

regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):240-9. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x.

Oh U, Blevins G, Griffith C, Richert N, Maric D, Lee CR, McFarland H, Jacobson S. Regulatory T cells are reduced during anti-CD25 antibody treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009 Apr;66(4):471-9. doi: 10.1001/archneurol.2009.16.

Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 2006 Nov;5(11):932-6. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70581-6.

Ottum PA, Arellano G, Reyes LI, Iruretagoyena M, Naves R. Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation. *Front Immunol*. 2015 Oct 30;6:539. doi: 10.3389/fimmu.2015.00539.

Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol*. 2010 Mar;30(2):185-95. doi: 10.1007/s10875-010-9369-6. Epub 2010 Feb 23.

Park JH, Eberl G. Type 3 regulatory T cells at the interface of symbiosis. *J Microbiol*. 2018 Mar;56(3):163-171. doi: 10.1007/s12275-018-7565-x. Epub 2018 Feb 28.

Perry MM, Hui CK, Whiteman M, Wood ME, Adcock I, Kirkham P, Michaeloudes C, Chung KF. Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Oct;45(4):746-52. doi: 10.1165/rcmb.2010-0304OC. Epub 2011 Feb 4.

Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Mostarica Stojkovic M, Miljković D. Nitric oxide inhibits CXCL12 expression in neuroinflammation. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jul;91(6):427-34. doi: 10.1038/icb.2013.23. Epub 2013 Jun 4.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993 May 7;73(3):457-67. doi: 10.1016/0092-8674(93)90134-c.

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 May;14:35-45. doi: 10.1016/j.msard.2017.03.014. Epub 2017 Mar 29.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899-910. doi: 10.1056/NEJMoa044397.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):374-89. doi: 10.1002/jnr.20488.

Popescu, B. F. G., & Lucchinetti, C. F. (2012). Pathology of demyelinating diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 185-217.

- Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol*. 2018 Mar;149:110-123. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014. Epub 2017 Nov 23.
- Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Nov;47:485-505. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004.
- Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002 Jul;104(3):182-91. doi: 10.1016/s0303-8467(02)00036-7.
- 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 Nov 1;106(9):3114-22. doi: 10.1182/blood-2005-02-0759. Epub 2005 Jul 14.
- Qu K, Chen CP, Halliwell B, Moore PK, Wong PT. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*. 2006 Mar;37(3):889-93. doi: 10.1161/01.STR.0000204184.34946.41. Epub 2006 Jan 26.
- Richards SA, Fu J, Romanelli A, Shimamura A, Blenis J. Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr Biol*. 1999 Jul 29-Aug 12;9(15):810-20. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80364-9.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*. 1933 Jun 30;58(1):39-53. doi: 10.1084/jem.58.1.39.
- Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain*. 1996 Apr;119 (Pt 2):449-55. doi: 10.1093/brain/119.2.449.
- Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS-e: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:173-89. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X.
- Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol*. 2008 Apr;38(4):925-7. doi: 10.1002/eji.200838168.
- Rose P, Dymock BW, Moore PK. GYY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule. *Methods Enzymol*. 2015;554:143-67. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.014. Epub 2015 Jan 10.
- Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jan;26(1-2):232-8. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00194-4.
- de Sa JC, Airas L, Bartholome E, Grigoriadis N, Mattle H, Oreja-Guevara C, O'Riordan J, Sellebjerg F, Stankoff B, Vass K, Walczak A, Wiendl H, Kieseier BC. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: a review for a multimodal approach in clinical practice. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011 May;4(3):139-68. doi: 10.1177/1756285611403646.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single

- mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- Sawicka K, Pyronneau A, Chao M, Bennett MV, Zukin RS. Elevated ERK/p90 ribosomal S6 kinase activity underlies audiogenic seizure susceptibility in fragile X mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 11;113(41):E6290-E6297. doi: 10.1073/pnas.1610812113. Epub 2016 Sep 23.
- Schmid CD, Melchior B, Masek K, Puntambekar SS, Danielson PE, Lo DD, Sutcliffe JG, Carson MJ. Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem.* 2009 May;109 Suppl 1(Suppl. 1):117-25. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05984.x. Erratum in: *J Neurochem.* 2009 Jun;109(6):1812.
- Schreibelt G, Musters RJ, Reijkerk A, de Groot LR, van der Pol SM, Hendriks EM, Döpp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2630-7. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2630.
- Scuffi D, Nietzel T, Di Fino LM, Meyer AJ, Lamattina L, Schwarzländer M, Laxalt AM, García-Mata C. Hydrogen Sulfide Increases Production of NADPH Oxidase-Dependent Hydrogen Peroxide and Phospholipase D-Derived Phosphatidic Acid in Guard Cell Signaling. *Plant Physiol.* 2018 Mar;176(3):2532-2542. doi: 10.1104/pp.17.01636. Epub 2018 Feb 2.
- Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, Bryce PJ, Chandel NS. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity.* 2013 Feb 21;38(2):225-36. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.020. Epub 2013 Feb 15.
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 2007 Nov 26;204(12):2899-912. doi: 10.1084/jem.20071030. Epub 2007 Nov 5.
- Shemer A, Jung S. Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2015 Nov;37(6):613-23. doi: 10.1007/s00281-015-0519-z. Epub 2015 Aug 4.
- Shin T, Ahn M, Matsumoto Y. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Cell Biol.* 2012 Sep;45(3):141-8. doi: 10.5115/acb.2012.45.3.141. Epub 2012 Sep 30.
- Shukla A, Dikshit M, Srimal RC. Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain. *Experientia.* 1996 Feb 15;52(2):136-40. doi: 10.1007/BF01923358.
- Sicher SC, Vazquez MA, Lu CY. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J Immunol.* 1994 Aug 1;153(3):1293-300. Erratum in: *J Immunol* 1995 Apr 15;154(8):4223.
- Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002 Aug;1(4):232-41. doi: 10.1016/s1474-4422(02)00102-3.
- Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med.* 2008 Sep 29;205(10):2281-94. doi: 10.1084/jem.20071119. Epub 2008 Sep 8.

- Soulika AM, Lee E, McCauley E, Miers L, Bannerman P, Pleasure D. Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 2009 Nov 25;29(47):14965-79. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3794-09.2009.
- Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):281-6. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005. Epub 2007 Apr 12.
- Stojić-Vukanić Z, Pilipović I, Vujnović I, Nacka-Aleksić M, Petrović R, Arsenović-Ranin N, Dimitrijević M, Leposavić G. GM-CSF-Producing Th Cells in Rats Sensitive and Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2016 Nov 10;11(11):e0166498. doi: 10.1371/journal.pone.0166498.
- Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006a;1(4):1810-9. doi: 10.1038/nprot.2006.285.
- Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006b;1(4):1952-60. doi: 10.1038/nprot.2006.284.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):337-42. doi: 10.1038/nm1715. Epub 2008 Feb 17.
- Storch MK, Bauer J, Linington C, Olsson T, Weissert R, Lassmann H. Cortical demyelination can be modeled in specific rat models of autoimmune encephalomyelitis and is major histocompatibility complex (MHC) haplotype-related. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Dec;65(12):1137-42. doi: 10.1097/01.jnen.0000248547.13176.9d.
- Sutti S, Locatelli I, Bruzzì S, Jindal A, Vacchiano M, Bozzola C, Albano E. CX3CR1-expressing inflammatory dendritic cells contribute to the progression of steatohepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 2015 Nov;129(9):797-808. doi: 10.1042/CS20150053. Epub 2015 Jun 25.
- Talaei F. Pathophysiological Concepts in Multiple Sclerosis and the Therapeutic Effects of Hydrogen Sulfide. *Basic Clin Neurosci*. 2016 Apr;7(2):121-36. doi: 10.15412/J.BCN.03070206.
- Tan BH, Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochem Int*. 2010 Jan;56(1):3-10. doi: 10.1016/j.neuint.2009.08.008. Epub 2009 Aug 22.
- Tanuma N, Shin T, Matsumoto Y. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol*. 2000 Aug 1;108(1-2):171-80. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00309-x.
- Teitelbaum D, Webb C, Bree M, Meshorer A, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer. *Clin Immunol Immunopathol*. 1974 Nov;3(2):256-62. doi: 10.1016/0090-1229(74)90012-9.
- Vahl JC, Drees C, Heger K, Heink S, Fischer JC, Nedjic J, Ohkura N, Morikawa H, Poeck H, Schallenberg S, Rieß D, Hein MY, Buch T, Polic B, Schönle A, Zeiser R, Schmitt-Gräff A, Kretschmer K, Klein L, Korn T, Sakaguchi S, Schmidt-Supprian M. Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):722-36. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.012. Epub 2014 Nov 6.

- Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Oct-Dec;22(5-6):311-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.09.004. Epub 2011 Oct 1.
- Vasileiadis GK, Dardiotis E, Mavropoulos A, Tsouris Z, Tsimourtou V, Bogdanos DP, Sakkas LI, Hadjigeorgiou GM. Regulatory B and T lymphocytes in multiple sclerosis: friends or foes? *Auto Immun Highlights.* 2018 Nov 10;9(1):9. doi: 10.1007/s13317-018-0109-x.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179-89. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Hupperts R, Stinissen P. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 2008 Jan;123(1):79-89. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x. Epub 2007 Sep 25.
- Waight JD, Takai S, Marelli B, Qin G, Hance KW, Zhang D, Tighe R, Lan Y, Lo KM, Sabzevari H, Hofmeister R, Wilson NS. Cutting edge: epigenetic regulation of Foxp3 defines a stable population of CD4+ regulatory T cells in tumors from mice and humans. *J Immunol.* 2015 Feb 1;194(3):878-82. doi: 10.4049/jimmunol.1402725. Epub 2014 Dec 29.
- Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology.* 2009 Aug;137(2):569-78, 578.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.012. Epub 2009 Apr 16.
- Wallace JL, Blackler RW, Chan MV, Da Silva GJ, Elsheikh W, Flannigan KL, Gamaniek I, Manko A, Wang L, Motta JP, Buret AG. Anti-inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Feb 10;22(5):398-410. doi: 10.1089/ars.2014.5901. Epub 2014 Apr 15.
- Wang SS, Chen YH, Chen N, Wang LJ, Chen DX, Weng HL, Dooley S, Ding HG. Hydrogen sulfide promotes autophagy of hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2017 Mar 23;8(3):e2688. doi: 10.1038/cddis.2017.18.
- Weng Y, Wang H, Li L, Feng Y, Xu S, Wang Z. Trem2 mediated Syk-dependent ROS amplification is essential for osteoclastogenesis in periodontitis microenvironment. *Redox Biol.* 2021 Apr;40:101849. doi: 10.1016/j.redox.2020.101849. Epub 2020 Dec 28.
- Wennström M, Janelidze S, Bay-Richter C, Minthon L, Brundin L. Pro-inflammatory cytokines reduce the proliferation of NG2 cells and increase shedding of NG2 in vivo and in vitro. *PLoS One.* 2014 Oct 6;9(10):e109387. doi: 10.1371/journal.pone.0109387.
- Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord.* 2012 Jan;5(1):13-22. doi: 10.1177/1756285611425694.
- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2010a May 15;12(10):1147-54. doi: 10.1089/ars.2009.2899.

- Whiteman M, Haigh R, Tarr JM, Gooding KM, Shore AC, Winyard PG. Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010b Aug;1203:146-50. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05556.x.
- Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011 Jan;4(1):13-32. doi: 10.1586/ecp.10.134.
- Wiendl H, Neuhaus O, Kappos L, Hohlfeld R. Multiple Sklerose. Aktuelle Übersicht zu fehlgeschlagenen und abgebrochenen Therapiestudien [Multiple sclerosis. Current review of failed and discontinued clinical trials of drug treatment]. *Nervenarzt.* 2000 Aug;71(8):597-610. German. doi: 10.1007/s001150050636.
- Wong PT, Qu K, Chimon GN, Seah AB, Chang HM, Wong MC, Ng YK, Rumpel H, Halliwell B, Chen CP. High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: possible involvement of hydrogen sulfide. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Feb;65(2):109-15. doi: 10.1097/01.jnen.0000199571.96472.c7.
- Xu W, Wu W, Chen J, Guo R, Lin J, Liao X, Feng J. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways. *Int J Mol Med.* 2013 Oct;32(4):917-25. doi: 10.3892/ijmm.2013.1462. Epub 2013 Aug 1..
- Yang R, Qu C, Zhou Y, Konkel JE, Shi S, Liu Y, Chen C, Liu S, Liu D, Chen Y, Zandi E, Chen W, Zhou Y, Shi S. Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity.* 2015 Aug 18;43(2):251-63. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.017. Epub 2015 Aug 11.
- Yang F, Zhang L, Gao Z, Sun X, Yu M, Dong S, Wu J, Zhao Y, Xu C, Zhang W, Lu F. Exogenous H₂S Protects Against Diabetic Cardiomyopathy by Activating Autophagy via the AMPK/mTOR Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(3):1168-1187. doi: 10.1159/000481758. Epub 2017 Oct 5.
- Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.* 2019 May;41(3):283-297. doi: 10.1007/s00281-019-00733-8. Epub 2019 Mar 19. Erratum in: *Semin Immunopathol.* 2019 Apr 29.
- Yates J, Rovis F, Mitchell P, Afzali B, Tsang J, Garin M, Lechler RI, Lombardi G, Garden OA. The maintenance of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int Immunol.* 2007 Jun;19(6):785-99. doi: 10.1093/intimm/dxm047. Epub 2007 Jun 1.
- Zehntner SP, Brickman C, Bourbonnière L, Remington L, Caruso M, Owens T. Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):5124-31. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.5124.
- Zhang J, Sio SW, Moochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med.* 2010 Sep-Oct;16(9-10):417-24. doi: 10.2119/molmed.2010.00027. Epub 2010 Apr 28.

- Zhang J, Ye J, Yuan C, Fu Q, Zhang F, Zhu X, Wang L, Gao P, Shu G, Jiang Q, Wang S. Exogenous H₂S exerts biphasic effects on porcine mammary epithelial cells proliferation through PI3K/Akt-mTOR signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2018 Oct;233(10):7071-7081. doi: 10.1002/jcp.26630. Epub 2018 May 10.
- Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* 2010 Feb 11;463(7282):808-12. doi: 10.1038/nature08750. Epub 2010 Jan 13.
- Zhou X, Cao Y, Ao G, Hu L, Liu H, Wu J, Wang X, Jin M, Zheng S, Zhen X, Alkayed NJ, Jia J, Cheng J. CaMKK β -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Oct 20;21(12):1741-58. doi: 10.1089/ars.2013.5587. Epub 2014 Mar 13.
- Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):4-12. doi: 10.1038/cr.2009.138. Epub 2009 Dec 15.
- Zozulya AL, Clarkson BD, Ortler S, Fabry Z, Wiendl H. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J Mol Med (Berl).* 2010 Jun;88(6):535-44. doi: 10.1007/s00109-010-0607-4. Epub 2010 Mar 9.

BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Lazarević je rođena 15.09.1993. u Beogradu, Republika Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne akademske studije završila je 2016. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisala je Master akademske studije na Biološkom fakultetu, smeru Imunobiologija, i završila ih 2017. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad pod naslovom: „Anti-encefalitogeni efekti ekstrakta kore ploda nara (*Punica granatum*)“ je uradila pod mentorstvom dr Miljane Momčilović na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, i odbranila ga sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2017/2018. godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,91.

Milica se u junu 2018. godine zaposlila kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na projektu ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI173035), pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića. Od momenta upisa master studija do zasnivanja radnog odnosa volontirala je u laboratoriji Odeljenja za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Zvanje istraživač saradnik stekla je u martu 2020. godine i do sada je autor/koautor 5 radova objavljenih u celosti u međunarodnim časopisima i ima dva saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Milica Lazarević je član Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Internacionalne unije imunoloških društava (International Union of Immunological Societies, IUIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).