

# Utjecaj različitih puteva aplikacije somatostatina na eksperimentalni alergijski encefalomijelitis

---

Muhvić, Damir

Doctoral thesis / Disertacija

1996

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:115814>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**DAMIR MUHVIĆ**

**UTJECAJ RAZLIČITIH PUTEVA APLIKACIJE  
SOMATOSTATINA NA EKSPERIMENTALNI  
ALERGIJSKI ENCEFALOMIJELITIS**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**930024903**

**RIJEKA, travanj 1996.**

## I AUTOR

Ime i prezime DAMIR MUHVIĆ  
Datum i mjesto rođenja 10. listopada 1959, Rijeka  
Naziv fakulteta, odnosno Medicinski fakultet u Rijeci  
organizacije za postdiplomski 1984.  
studij i datum završene nastave Medicinski fakultet u Rijeci  
II i III stupnja 1991.  
Sadašnje zaposlenje asistent Medicinskog fakulteta  
u Rijeci

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada UTJECAJ RAZLIČITIH PUTEVA APLI  
KACIJE SOMATOSTATINA NA EKSPE  
RIMENTALNI ALERGIJSKI ENCEFALO  
MIJELITIS  
Broj stranica, slika, tabela, 130 str., 22 slike, 2 tab.,  
bibliografskih podataka  
Ustanova i mjesto gdje je Medicinski fakultet u Rijeci  
disertacija izrađena  
Znanstvena disciplina Medicina  
Mentori Prof.dr.sc.Daniel Rukavina  
Prof.dr.sc.Biserka Radošević  
Stašić  
Fakultet na kojem je Medicinski fakultet u Rijeci  
disertacija obranjena

## III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme 15. rujna 1993.  
Datum predaje rada 10. siječnja 1996.  
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen 12. ožujka 1996.  
Sastav povjerenstva koje prof.dr.Juraj Sepčić, dr.sc.  
disertaciju ocijenilo Tanja Marotti, ZVS, prof.dr.sc.  
Biserka Radošević-Stašić i  
prof.dr.sc.Daniel Rukavina  
Datum obrane disertacije 19. travnja 1996.  
Sastav povjerenstva pred I s t i  
kojim je disertacija  
obranjena  
Datum promocije

Rad je u cjelosti izrađen na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Voditelji:

Prof. dr. Daniel Rukavina

Prof. dr. Biserka Radošević-Stašić

Rad ima 2 tablice, 22 slike i 29 fotografija

Želim iskazati iskrenu zahvalnost svima koji su mi pomogli pri izradi ove doktorske disertacije, a posebice mojim mentorima:

Prof. dr. Danielu Rukavini, predstojniku Zavoda za fiziologiju i imunologiju, koji mi je svojim velikim znanstveno-istraživačkim iskustvom pomogao u izboru teme, dok je svojim savjetima i kritičkim primjedbama doprinijeo uspješnoj izradi ove disertacije.

Prof. dr. Biserka Radošević-Stašić, osobi čije je veliko iskustvo u poznavanju navedene tematike bilo od velike važnosti kao i na značajnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Doc. dr. Tanji Marotti na kritičkim primjedbama prilikom izrade ovog rada.

Prof. dr. Juraju Sepčiću na dugogodišnjem prijateljstvu, podršci i razumijevanju.

Prof. dr. Suadu Efendiću čijom sam uslužnošću dobio somatostatinski analog SMS201-995 potreban za izvođenje pokusa.

Prof. dr. Gordani Župan na dugogodišnjem prijateljstvu i pomoći prilikom izvođenja intracerebroventrikularnih aplikacija.

Mr. sc. Ester Pernjak-Pugel na pomoći prilikom izrade histoloških preparata i fotografija.

Osoblju Zavoda za fiziologiju i imunologiju na godinama koje smo zajedno proveli.

Svima koji su mi pomogli da istrajem.

## POPIS KRATICA

(EAE)	=eksperimentalni alergijski encefalomijelitis
(CNS)	=centralni nervni sistem
(MS)	=multipla skleroza
(MBP)	=mijelinski bazični protein
(osovina-HHNŽ)	=osovina između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde
(DA)	=Dark August
(AO)	=Albino Oxford
(OX1)	=monoklonsko antitijelo za panleukocitni biljeg štakora
(W3/25)	=monoklonsko antitijelo za CD4 stanični biljeg štakora
(OX8)	=monoklonsko antitijelo za CD8 stanični biljeg štakora
(OX39)	=monoklonsko antitijelo za IL2-R štakora
(IL2-R)	=interleukin dva receptor
(GHK)	=glavni histokompatibilni kompleks
(CRF)	=kortikotropin oslobađajući čimbenik
(ACTH)	=adrenokortikotropni hormon
(SOM)	=somatostatin
(TSH)	=tireoidni stimulirajući hormon
(IL-1)	=interleukin jedan
(IL-2)	=interleukin dva
(IL-4)	=interleukin četiri
(IL-5)	=interleukin pet
(IL-6)	=interleukin šest
(IL-8)	=interleukin osam
(IL-10)	=interleukin deset
(IL-12)	=interleukin dvanaest
(TNF- $\alpha$ )	=čimbenik nekroze tumora alfa
(IFN- $\gamma$ )	=interferon gama
(CREAE)	=kronični relapsirajući eksperimentalni alergijski encefalomijelitis
(PLP)	=proteolipidni protein
(MOG)	=mijelinski oligodendrocitni glikoprotein
(HLA)	=eng. human leucocyte antigen
(RNA)	=glasnička ribonukleinska kiselina
(TGF- $\beta$ )	=transformirajući čimbenik rasta beta
(HEAE)	=hiperakutni eksperimentalni alergijski encefalomijelitis
(K stanice)	=stanice ubojice
(S-Ag)	=S antigen
(PGE <sub>2</sub> )	=prostaglandin E <sub>2</sub>
(LPS)	=lipopolisaharid
(Cop1)	=sintetski kopolimer jedan

(cGy)	=centi Gray
(PPD)	=pročišćeni proteinski derivat
(Con A)	=konkanavalin A
(Ag)	=antigen
(APS)	=antigen prezentirajuće stanice
(VCAM-1)	=vaskularna stanična adhezijska molekula jedan
(ICAM-1)	=međustanična adhezijska molekula 1
(TNF- $\beta$ )	=čimbenik nekroze tumora beta
(VLA-4)	=eng. very late antigen 4
(CGRP)	=eng. calcitonin gene-related pepptid
(GM-CSF)	=eng. granulocyte macrophage colony stimulating factor
(BN)	=Brown Norway
(kD)	=kiloDalton
(N-CAM)	=eng. neural cell adhesion molecule
(NK)	=eng. natural killer
(hCG)	=horionskog gonadotropina
(VIP)	=vazointestinalni polipeptid
(SP)	=supstancija P
(cDNA)	=komplementarna DNA
(SOM28)	=somatostatin 28
(AIDS)	=eng. acquired immunodeficiency syndrome
(SOM-8)	=somatostatin osam=oktapeptid
(SOM-I)	=somatostatin imunoreaktivne strukture
(IGF)	=eng. insulin-like growth factor
(EGF)	=eng. epidermal growth factor
(c-AMP)	=ciklički adenzin monofosfat
(PFS)	=stanica koje formiraju plakove
(i.c.v.)	=intracerebroventrikularno
(s.c.)	=supkutano
(a.i.)	=aktivna imunizacija
(SMS)	=somatostatinski analog SMS201-995

## SADRŽAJ



1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME .....	1
2. OPĆI DIO .....	4
2.1. EKSPERIMENTALNI ALERGIJSKI ENCEFALOMIJELITIS (EAE) - ŽIVOTINJSKI MODEL MULTIPLE SKLEROZE .....	4
2.1.1. GENETSKA PREDODREĐENOST .....	5
2.1.2. IMUNOPATOGENEZA EAE-A .....	6
2.1.2.1. STATUS CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA UNUTAR IMUNOLOŠKOG SISTEMA .....	8
2.1.2.2. MEHANIZMI NASTANKA TOLERANCIJE I AUTOIMUNOSTI .....	8
2.1.2.2.1. MEHANIZMI NASTANKA SUPRESIJE, TOLERANCIJE I AUTOIMUNOSTI U EAE-U .....	11
2.1.2.3. MEHANIZMI DJELOVANJA STANICA U PATOGENEZI EAE-A ...	14
2.1.2.3.1. ULOGA ANTIGEN PREZENTIRAJUĆIH STANICA (APS) I ADHEZIJSKIH MOLEKULA .....	14
2.1.2.3.2. ULOGA T I B LIMFOCITA U EAE-U .....	20
2.1.2.4. ULOGA CITOKINA U EAE-U .....	22
2.2. ULOGA NEUROENDOKRINOG SUSTAVA U KONTROLI IMUNOLOŠKOG ODGOVORA .....	28
2.2.1. SOMATOSTATIN .....	30
2.2.1.1. LOKALIZACIJA I DJELOVANJE U CNS-U .....	30
2.2.1.2. LOKALIZACIJA I DJELOVANJE U IMUNOLOŠKOM SISTEMU	33
3. MATERIJAL I METODE .....	37
3.1. POKUSNE ŽIVOTINJE .....	37
3.2. PRIPREMA ENCEFALITOGENIČNOG HOMOGENATA .....	37

3.3. ANESTEZIJA .....	37
3.4. SENZIBILIZACIJA .....	37
3.5. HORMONSKI PRIPRAVCI .....	37
3.6. INTRACEREBROVENTRIKULARNA APLIKACIJA .....	38
3.7. PLAN POKUSA .....	38
3.8. EVALUACIJA KLINIČKE SLIKE EAE-A .....	39
3.9. STATISTIČKE METODE .....	40
3.10. PATOHISTOLOGIJA .....	40
3.11. IMUNOHISTOLOGIJA .....	40
3.12. BLASTIČNA TRANSFORMACIJA LIMFOCITA .....	41
3.13. PROTOČNA CITOMETRIJA .....	41
4. REZULTATI .....	42
4.1. UČINCI SOMATOSTATINA INJICIRANOG CENTRALNO ILI PERIFERNO U ŠTAKORA SOJA DA (OSJETLJIVI SOJ) .....	42
4.1.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA U MOŽDANE VENTRIKULE .....	42
4.1.1.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PRVOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	42
4.1.1.1.1. KLINIČKA SLIKA .....	42
4.1.1.2. INJICIRANJE SOMATOSTATINA DRUGOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	45
4.1.1.2.1. KLINIČKA SLIKA .....	45
4.1.1.3. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	46
4.1.1.3.1. KLINIČKA SLIKA .....	46

4.1.1.4. INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	47
4.1.1.4.1. KLINIČKA SLIKA .....	47
4.1.1.5. INJICIRANJE SOMATOSTATINA DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	47
4.1.1.5.1. KLINIČKA SLIKA .....	47
4.1.1.5.2. UTJECAJ INTRACEREBROVENTRIKULARNE APLIKACIJE SOMATOSTATINA NA PREŽIVLJAVANJE .....	49
4.1.2. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PERIFERNO (SUBKUTANO) U DA ŠTAKORA (OSJETLJIVI SOJ) .....	49
4.1.2.1. INJICIRANJE PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	50
4.1.2.1.1. KLINIČKA SLIKA .....	50
4.1.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	51
4.1.2.2.1. KLINIČKA SLIKA .....	51
4.2. UČINCI SOMATOSTATINA INJICIRANOG CENTRALNO ILI PERIFERNO U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ) ...	53
4.2.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA U MOŽDANE VENTRIKULE .....	53
4.2.1.1 INJICIRANJE SOMATOSTATINA U AO ŠTAKORA DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	53
4.2.1.1.1. KLINIČKA SLIKA .....	53
4.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ) .....	54
4.2.2.1. UTJECAJ DOZE I VREMENA INJICIRANJA SOMATOSTATINA NA INDUKCIJU KLINIČKIH ZNAKOVA EAE-A U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ) .....	54
4.2.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	55
4.2.2.2.1. KLINIČKA SLIKA .....	55

4.2.2.3. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	55
4.2.2.3.1. KLINIČKA SLIKA .....	55
4.2.2.4. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI .....	56
4.2.2.4.1. KLINIČKA SLIKA I INCIDENCIJA EAE-A .....	56
4.2.2.4.2. ANALIZA ZASTUPLJENOSTI BILJEGA NA POVRŠINI STANICA POPLITEALNIH LIMFNIH ČVOROVA I SLEZENE PROTOČNOM CITOMETRIJOM .....	64
4.2.2.4.3. ANALIZA FUNKCIONALNE REAKTIVNOSTI SPLENOCITA NA KONKANAVALIN A I MIJELINSKI BAZIČNI PROTEIN .....	66
4.3. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA CNS-A .....	66
4.4. IMUNOHISTOLOŠKA ANALIZA CNS-A .....	66
5. RASPRAVA .....	67
6. ZAKLJUČCI .....	72
7. POPIS LITERATURE .....	75

## SAŽETAK

Eksperimentalni alergijski encefalomijelitis (EAE) predstavlja jedan od najčešće korištenih eksperimentalnih modela autoimunih bolesti. Njegova patologija, a posebno patologija njegovog kronično relapsirajućeg tipa je nalik multiploj sklerozi u čovjeka. Patogeneza ove bolesti je još uvijek nepoznata. Štoviše, postoje mišljenja koja govore o tome da je multipla skleroza sindrom, a ne bolest.

Inducibilnost EAE-a ovisna je o soju životinja. U našim istraživanjima ispitivali smo inducibilnost EAE-a u osjetljivog Dark August (DA) soja štakora i Albino Oxford (AO) soja štakora koji je relativno rezistentan na indukciju EAE-a. Mehanizmi indukcije EAE-a, kao i mehanizmi rezistencije na indukciju, ovise o brojnim imunološkim i neimunološkim mehanizmima koji djeluju u aferentnoj i eferentnoj fazi imunološkog odgovora na specifične antigene. Ovi mehanizmi ovise o slijedećim faktorima: vrsti primjenjenog antigena i načinu njegove aplikacije, o mehanizmima prezentacije na periferiji, indukciji ekspresije adhezivnih molekula, propusnosti krvno-moždane barijere, mehanizmima prezentacije unutar CNS-a, kao i o vrsti i broju upalnih stanica, te mjestu njihove infiltracije. Na mnoge od navedenih komponenti mogu djelovati hormoni, a među njima smo odlučili analizirati utjecaj somatostatina, koji je u našim ranijim istraživanjima pokazao značajne imunomodulacijske učinke u eksperimentalnom alergijskom encefalomijelitisu, kako u osjetljivog DA soja tako i u relativno rezistentnog AO soja. Kako bismo utvrdili značaj različitih puteva aplikacije somatostatina, aplicirali smo ga na dva različita načina: periferno (subkutano) ili centralno (intracerebroventrikularno). Aplikacije smo izvršili u različitim stadijima po injiciranju antigena, jer smo željeli analizirati utjecaj somatostatina na aferentnu ili eferentnu fazu imunološke reakcije. Nadalje, nastojali smo istražiti značaj permeabilnosti krvno moždane barijere. Zbog toga pa smo injiciranje somatostatina vršili prije i poslije sedmog dana po aktivnoj imunizaciji, odnosno u periodu za koji se zna da je praćen sa povećanom permeabilnošću krvno-moždane barijere.

Rezultate smo procjenjivali na osnovu kliničke slike EAE-a, histološke i imunohistološke analize CNS-a, te fenotipske analize stanica u perifernim limfatičkim organima. U nekim pokusima pratili smo i funkcijsku aktivnost perifernih limfatičkih stanica na poliklonske mitogene i specifični antigen-mijelinski bazični protein. Naši rezultati su pokazali da je inducibilitet i klinički tijek EAE-a ovisan o vremenu i dozi periferne aplikacije somatostatina. Periferna aplikacija somatostatina od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji provocirala je statistički značajno povećanje incidencije EAE-a od devet % u aktivno imuniziranih do 55% u somatostatinom tretiranih AO štakora. Fenotipska analiza stanica poplitealnih limfnih čvorova i stanica slezene na panel monoklonskih antitijela (OX1, W3/25, OX8 i OX39) pokazala je statistički značajne promjene u postotoku pozitivnih stanica za vrijeme različitih intervala po aktivnoj imunizaciji. Blastična transformacija konkanavalinom A tretiranih splenocita iz AO štakora koji su bili tretirani somatostatinom, pokazala je značajne promjene koje su bile ovisne o kliničkoj fazi EAE-a.

Histološka i imunohistološka analiza CNS-a potvrdila je prisustvo perivaskularnih mononuklearnih infiltrata. Drugi protokoli periferne aplikacije somatostatina bili su manje efektivni u indukciji EAE-a u AO štakora.

Periferna aplikacija somatostatina pokazala je statistički značajno povećanje kliničkog tijeka u komparaciji sa grupom tretiranom fiziološkom otopinom.

Intracerebroventrikularna aplikacija somatostatina za vrijeme različitih intervala po aktivnoj imunizaciji u DA štakora pokazala je da somatostatin provocira statistički značajne promjene kliničkog tijeka, smanjuje postotak preživljavanja i mijenja postotak pojavljivanja prvih kliničkih znakova. Histološka analiza CNS-a otkrila je prisustvo upalnih stanica u CNS-u u svim grupama štakora koji su intracerebroventrikularno tretirani somatostatinom. Intracerebroventrikularna aplikacija somatostatina u aktivno imuniziranih AO štakora izazvala je statistički značajne promjene kliničkog tijeka EAE-a. Naši rezultati su pokazali da unatoč različitom načinu njegove aplikacije (perifernom ili centralnom), somatostatin ima značajan utjecaj na razvoj EAE-a u relativno rezistentnog AO soja i osjetljivog DA soja. Štoviše, ovi rezultati naglašavaju značaj somatostatina u neuro-immuno-endokrinoj mreži i pokazuju da osjetljivost na razvoj autoimunih bolesti može biti promjenjena hormonima.

## SUMMARY



Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is one of the most often used experimental models for autoimmune diseases. Its pathology, and particularly the pathology of the chronic relapsing type is very similar to multiple sclerosis in humans. Moreover, there are opinions that speak about multiple sclerosis as a syndrome, and not as a disease. Inducibility of EAE is strain dependent. In our experiments we investigated the inducibility of EAE in susceptible Dark August (DA) strain of rats and Albino Oxford (AO) strain of rats that are relatively resistant to the EAE induction. The mechanisms of EAE induction and the mechanisms of the resistance to the induction depend on the numerous immune and nonimmune mechanisms that are effective in afferent and efferent phase of immune response on specific antigens. These mechanisms depend on the following factors: the kind of used antigen and the way of its application, the presentation mechanisms on the periphery, the induction of the adhesive molecule expression, the permeability of blood brain barrier, the presentation mechanisms inside the CNS, and the kind and the number of inflammatory cells and the place of their infiltration. Hormones have an influence on the numerous cited components and among them, we decided to investigate the influence of somatostatin which in our previous investigations has shown the important immunomodulatory effects in EAE in susceptible DA and relatively resistant AO strain. In order to find the importance of the application route of somatostatin administration we applied somatostatin in two ways: peripherally (subcutaneously) and centrally (intracerebroventricularly). Applications were performed during the different phases after antigen application because we wanted to analyse the influence on afferent and efferent phase of immune reaction. Furthermore, we tried to investigate the importance of the permeability of blood brain barrier. Therefore we injected somatostatin before and after the seventh day of post active immunisation, that is in the period that it is followed by increased permeability of blood brain barrier.

We estimated the results according to the clinical signs of EAE, histology and immunohistology of CNS, and phenotype of the cells in peripheral lymphatic organs. In some experiments we analysed the functional activity of peripheral lymphatic cells on polyclonal mitogens and specific antigens-myelin basic protein. Our results have shown that the inducibility and the clinical course of EAE in AO rats are dependent of a dose and time of peripheral somatostatin administration. Peripheral somatostatin administration from the seventh to the ninth day of post active immunisation provoked statistically significant increase in the incidence of EAE from 9% in actively immunised to 55% in somatostatin treated AO rats. We performed the FACS analysis of popliteal lymph node and spleen cells to the panel of monoclonal antibodies (OX1, W3/25, OX8 and OX39) and observed the statistically significant changes in the percentage of positive cells during different intervals of post active immunisation. Blastic transformation of concanavalin A treated splenocytes from *in vivo* somatostatin treated AO rats showed significant changes that were dependent of the clinical phase of EAE. Histology and immunohistology

of the CNS revealed the presence of perivascular mononuclear infiltrates. The other protocols of peripheral somatostatin administration were less effective in the induction of EAE in AO rats.

Peripheral somatostatin administration in DA rats has shown statistically significant increase of the clinical course of EAE in comparison with saline treated group.

Intracerebroventricular administration of somatostatin during different intervals of post active immunisation in DA rats has shown that somatostatin provokes the statistically significant changes the period of the clinical course, decreases the percentage of survival and changes the period of appearance of the first clinical signs. Histology of the CNS revealed the presence of the inflammatory cells in the CNS in all groups of DA rats that were intracerebroventricularly treated with somatostatin.

Intracerebroventricular administration of somatostatin in acitively immunised AO rat has provoked the statistically significant changes of the clinical course of EAE.

Our results have shown that in spite of the different ways of its administration (peripheral or central) somatostatin has a strong influence on the development of EAE in relatively resistant AO and susceptible DA rats. Furthermore, these results have shown that the susceptibility to the development of an autoimmune disease could be changed by hormones and emphasise the importance of somatostatin in the neuro-immuno-endocrine network.

## 1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Eksperimentalni alergijski encefalomijelitis (EAE) je antigen specifična, T stanicama posredovana bolest centralnog nervnog sistema (CNS-a), koja svojim kliničkim tijekom i patohistološkim promjenama osobitim po perivaskularnim nakupinama mononuklearnih stanica i demijelinizacijom najviše naliči multiploj sklerozi (MS) u čovjeka. U kronično relapsirajućoj formi može se inducirati nakon imunizacije sa specifičnim antigenom - mijelinskim bazičnim proteinom (MBP-om) (278) ili po pasivnom prijenosu antigenom senzibiliziranih splenocita (96).

U eksperimentalnom modelu to je dakle dobro definirana bolest u kojoj, ovisno o fazi, učestvuju različite subpopulacije limfocita i ostalih stanica. Njihov ulazak u središnji živčani sustav je stupnjeviti proces, koji je praćen diferencijacijom krvnih žila mozga, promjenama u ekspresiji adhezijskih molekula, procesima proliferacije i diferencijacije stanica, te lučenjem različitih citokina, pa su aktivirani imunološki mehanizmi različiti u induktivnoj, centralnoj i završnoj fazi autoimune bolesti. Prijemčivost za razvoj EAE-a ovisi, osim toga i o vrsti životinja (11), soju (72), starosnoj dobi životinja (126), te o spolu (115). Razlike među sojevima štakora temelje se na različitoj sposobnosti prepoznavanja encefalitogeničnih determinanata MBP-a, a postoje i razlike u djelovanju primjenjenog adjuvansa, te razlike u aktivnosti T supresijskih stanica (163), produkciji interleukina dva (IL-2), ekspresiji antigena drugog razreda glavnog histokompatibilnog kompleksa (GHK), kao i razlike u broju stanica koje infiltriraju regionalne limfne čvorove i uzrokuju oštećenja u CNS-u.

Nedavno je pronađeno da genetski urođene osobine uključuju i moguće abnormalnosti osovine između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde (238), kao i različite sposobnosti jedinke da odgovori na upalne i stresu pridružene procese (237). Tako je pokazano da je osjetljivost na indukciju poststreptokoknog artritisa u Lewis štakora vezana za poremećaj u biosintezi kortikotropin oslobađajućeg čimbenika (eng. corticotropin releasing factor-CRF), odnosno uz smanjenu sposobnost izlučivanja adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikosterona na upalni stimulus, dok je rezistenciju na indukciju artritisa u Fisherovom soju, koji je istog haplotipa, bilo moguće ukinuti davanjem antagonista glukokortikoida i serotonina (238).

Slične, o neuro-endokrinom sustavu ovisne promjene mi smo ustanovili i na modelu EAE-a (165). Utvrdili smo da se klinički tijek EAE-a može modulirati u DA i u AO štakora, odnosno u dva soja štakora, koji su genetski različito osjetljivi na indukciju ove autoimune bolesti. Učinak je ovisio o vremenu aplikacije somatostatina i trajanju tretmana, no u obje grupe somatostatinom (SOM) se izazvala statistički značajna promjena u intenzitetu ili obliku EAE-a. U AO štakora, koji su prirodno rezistentni na indukciju EAE, somatostatinom se čak uspješno potencirali razvoj bolesti.

U ovom radu nastojali smo doći do novih spoznaja o djelovanju somatostatina. Posebnu pažnju poklonili smo načinu aplikacije somatostatina, jer su predhodni rezultati sugerirali da bi njegovi lokalni i sistemski učinci mogli biti različiti. Budući da je on nakon istovremene supkutane primjene sa encefalitogenom u DA štakora odgađao pojavu bolesti pokušali smo ga primjeniti intraceberoventrikularno. Pritom smo nastojali razlučiti njegovo djelovanje na aferentnu, centralnu i eferentnu fazu u razvoju autoimunog procesa, pa smo ga injicirali: a) neposredno po senzibilizaciji MBP-om; b) u vrijeme najvećeg ulaska stanica u CNS te c) u fazi početnih kliničkih simptoma bolesti. Učinke ove centralne aplikacije uspoređivali smo sa učincima periferne aplikacije somatostatina.

Osim u DA štakora, modulacijske sposobnosti SOM-a analizirali smo i u AO štakora. Budući da su oni prirodno rezistentni na indukciju EAE-a, smatrali smo da bi promjene u limfatičkom sustavu izazvane somatostatinom mogle vjerodostojno ukazati na mehanizam njegovog djelovanja u EAE-u. U ovoj eksperimentalnoj grupi smo, stoga, rezultate procjenjene na temelju promjena u kliničkoj slici i imunohistološkim nalazima nadopunili promjenama u fenotipskoj zastupljenosti perifernih limfatičkih stanica, te promjenama u njihovoj funkcionalnoj aktivnosti.

Očekivali smo da ćemo ovakvim eksperimentalnim planom doći do novih spoznaja o mogućnostima modulacije EAE-a. Pritom bi somatostatin mogao djelovati na autoimunu bolest neizravnim i izravnim putem. Poznato je naime, da on mijenja neuro-endokrinu homeostazu blokirajući izlučivanje hormona rasta, ACTH, prolaktina, tireoidnog stimulirajućeg hormona (TSH) i melatonina, te svojim učincima na izlučivanje inzulina, glukagona i brojnih drugih lokalnih hormona u gastrointestinalnom traktu (22,53,235). Hormonska neravnoteža, te promjena u nutritivnoj homeostazi, mogle bi indirektnim putem promijeniti aktivnost imunološkog sustava. Slične, indirektno posljedice, mogli bi imati i neurotransmiterski učinci somatostatina, kojima on mijenja tonus serotoninergičkih, dopaminergičkih, gabaerģičkih, adrenerģičkih i sličnih puteva, preko kojih neurotransmitori posredstvom svojih receptora utječu na limfatičke stanice. Indirektno posljedice mogle bi biti vezane i uz sposobnost somatostatina da mijenja tonus i permeabilitet krvnih žila, čime bi se moglo utjecati na migracijske puteve limfatičkih stanica, te posebno u modelu EAE-a, na prolaz stanica kroz krvno-moždanu barijeru. Posebnu imunoregulacijsku ulogu imalo bi i lokalno oslobađanje somatostatina iz peptiderģičkih živčanih završetaka u limfatičkim organima, gdje bi, zatim, somatostatin posredstvom svojih specifičkih membranskih receptora ostvario svoje izravne imunomodulacijske učinke.

Receptori za somatostatin pronađeni su na različitim vrstama limfatičkih stanica. Njihov broj i afinitet varira ovisno o vrsti i podrijetlu limfatičkih stanica, pa ih više ima na onima iz Payerovih ploča, nego li u perifernoj krvi, više na B nego na T limfocitima, a sličan selektivan učinak je primjećen i na

sekreciju pojedinih vrsta imunoglobulina (233). Moguće je da ovaj učinak ovisi i o vrsti SOM receptora, prisutnih na ciljnim stanicama, jer je opisano da aktivacija različitih receptorskih podvrsta pokreće različite unutarstanične mehanizme, koji potom rezultiraju i različitim učincima (123). Posredstvom svojih receptora SOM, stoga, može utjecati na procese proliferacije i diferencijacije limfatičkih stanica, kao i na njihovu aktivnost. Među ostalim procesima on može promijeniti i sekreciju citokina, poput IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ili drugih medijatora (273) koji su, pak, posrednici u povratnoj spregi između imunološkog i neuroendokrinog sustava, čime se ponovno mijenja neuroendokrina homeostaza.

Ovim složenim odnosima treba pridodati i činjenicu da limfatičke stanice imaju i sposobnost stvaranja vlastitog somatostatina (227). Njegova produkcija je posebno značajna u primarnim limfatičkim organima (70), gdje bi on mogao izravno utjecati na procese proliferacije i diferencijacije stanica, procese klonske selekcije i delecije, te ostale bitne djelove u mehanizmima koji osiguravaju normalnu aktivnost imunološkog sustava i preveniraju razvoj autoimunosti.

Iz ovog sažetog pregleda aktivnosti somatostatina vidljivo je da bi on višestrukim mehanizmima mogao utjecati na razvitak autoimunog procesa u štakora, odnosno da ćemo odabranim eksperimentalnim planom analizirati samo neke od mogućih aspekata somatostatinskog djelovanja. Vjerujemo, međutim, da ćemo i ovim rezultatima pridonijeti osvjetljavanju kompleksnih međuodnosa između neuro-endokrinog i imunološkog sustava na modelu EAE-a, koji je eksperimentalni model za multiplu sklerozu i time doprinijeti istraživanjima patogeneze jedne od najčešćih autoimunih bolesti CNS-a u humanoj medicini.

## 2. OPĆI DIO

## 2.1. EKSPERIMENTALNI ALERGIJSKI ENCEFALOMIJELITIS (EAE) - ŽIVOTINJSKI MODEL MULTIPLE SKLEROZE

EAE je autoimuna demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema osobita po akutnom nastupu paralize, perivaskularnoj i parenhimatoznoj infiltraciji mozga i leđne moždine mononuklearnim stanicama i upalom u lezijama koja jako naliči reakcijama kasne preosjetljivosti. EAE se može inducirati nakon imunizacije sa specifičnim antigenom mijelinskim bazičnim proteinom (MBP-om)

(278) ili po pasivnom prijenosu antigenom senzibiliziranih splenocita (96,66). Prijemčivost za razvoj EAE-a ovisi o vrsti životinja (11), soju (72) starosnoj dobi životinje (126) i o spolu (115).

Razlike među sojevima štakora temelje se na različitoj sposobnosti prepoznavanja encefalitogeničnih determinanata MBP-a; postoje i razlike u djelovanju primjenjenog adjuvansa, te razlike u aktivnosti T supresijskih stanica (163), produkciji interleukina dva (IL-2), ekspresiji adhezijskih molekula (37), ekspresiji antigena drugog razreda GHK kao i razlike u broju stanica koje infiltriraju regionalne limfne čvorove i uzrokuju oštećenja u CNS-u (130,243,271).

EAE je bolest posredovana CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Ovo je dokazano pasivnim prijenosom bolesti stanicama limfnih čvorova (181), te izolacijom encefalitogeničnih T staničnih klonova (260). Da bi došlo do razvoja bolesti (EAE-a te MS-e) potrebno je da T stanice uđu u moždani parenhim. Pokazano je ujedno da T stanice specifične za encefalitogenični peptid MBP-a moraju secernirati limfotoksin da bi uzrokovale bolest (188). Ujedno, izgleda da CD4<sup>+</sup>Th-1 stanice specifične za encefalitogenični MBP peptid secerniraju velike količine IL-4, ali ne i IFN- $\gamma$  ili limfotoksin, ali nisu sposobne inducirati bolest (6).

Osim produkcije navedenih citokina ujedno je pokazano da povećana sekrecija negativnih dušikovih i kisikovih međuspojeva postoji u leukocitima što je vidljivo u hiperakutnom eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (144).

Zbog svojih osobitosti kronični relapsirajući eksperimentalni alergijski encefalomijelitis (CREAE) predstavlja najbolji model za humanu demijelinizirajuću bolest MS-u (3). U upalnim lezijama u EAE-u i MS-i prisutni su T pomoćnički limfociti (231). Osjetljivost prema EAE-u i MS-i kontrolirana je genima imunološkog odgovora (35).

Mijelinski bazični protein je dugo smatran jedinim mogućim primarnim ciljnim antigenom u MS-i. Čini 30% ukupnih mijelinskih proteina. Međutim, posljednjih nekoliko godina sve se više ispituje encefalitogenična aktivnost proteolipidnog proteina (PLP) koji čini 50% ukupnih mijelinskih proteina. PLP koji inducira kronični EAE u laboratorijskih životinja smatra se mogućim ciljnim antigenom



u MS-i (140). U pacijenata sa multiplom sklerozom primjećen je snažan odgovor na mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG). Eksperimenti su pokazali da je od MOG peptida jedino pMOG 35-55 peptid sposoban izazvati neurološko oštećenje (140).

### 2.1.1. GENETSKA PREDODREĐENOST

Osjetljivost na indukciju ovisna je u soju (72). Dark August (DA) štakori su osjetljivi na indukciju CREAE-a, dok su Albino Oxford (AO) štakori relativno rezistentni. DA štakori nakon aktivne indukcije homogenatom heterolognog (junećeg) mozga u kompletnom Freund-ovom adjuvansu (CFA) razvijaju kliničku sliku CREAE-a za razliku od AO štakora u kojih se klinička slika ne razvija ili se pojavljuju klinički znakovi slabijeg intenziteta. Smanjena osjetljivost za indukciju CREAE-a korelira s nižom *in vitro* produkcijom IL-2 iz splenocita i stanica limfnih čvorova, sa manjom frekvencijom CD4+ IL2R+ T stanica kao i s prevalencijom CD8 pozitivnih stanica (CD8+) u perivaskularnim mononuklearnim staničnim infiltratima u centralnom nervnom sistemu (163). Ove razlike između DA i AO soja naglašavaju abnormalnosti u regulaciji imunih funkcija u kontroli imunološkog odgovora, ali nije jasno jesu li one primarne ili sekundarne prirode.

Određeni sojevi životinja su rezistentni na razvoj EAE-a, a njihova osjetljivost je vezana za gene GHK (73,157).

Slična situacija se javlja u ljudi gdje su određeni tipovi HLA (eng. human leucocyte antigen) praćeni sa specifičnim autoimunim bolestima npr. multipla skleroza sa DR2, DQW1), diabetes (DR3, DR4), reumatoidni artritis (DR4) (255). Udruženost određenih autoimunih bolesti i određenih alela GHK sugerira da su T stanice ograničene sa genskim produktima GHK upletene u proces bolesti. Daljna podrška uloge T stanica u autoimunim bolestima je udruženost T stanica sa određenim alelima  $\beta$  lanca T staničnog receptora (216).

Mehanizam kojim su molekule GHK udružene s osjetljivošću prema autoimunim bolestima je nejasan, ali vjerojatno ovisi o većem broju gena gdje i geni izvan GHK utječu na osjetljivost (85).

Polimorfizam GHK utječe na osjetljivost na EAE induciran mijelinskim bazičnim proteinom u štakora. Među štakorskim sojevima najčešće je za indukciju EAE korišten soj Lewis štakora. Analizom sa imunodominantnim peptidom u Lewis soja štakora (MBP 63-88) pokazala je da su GHK-kongenični Lewis sojevi RT1<sup>a</sup>, RT1<sup>c</sup> i RT1<sup>l</sup> haplotipovi permisivni za indukciju bolesti, dok su RT1<sup>d</sup> i RT1<sup>u</sup> sojevi rezistentni. Svi sojevi koji razvijaju EAE pokazali su peptid specifičnu proliferaciju i IFN- $\gamma$  sekreciju, ali ne i ranu značajnu tendenciju ekspresije IL-4 ili TGF- $\beta$  mRNA u limfocitima u odgovoru na MBP 63-88 (sedmog dana po imunizaciji). Kasnije, 14-og dana po imunizaciji, indukcija IL-4 i TGF- $\beta$  specifična za peptid javlja se u RT1<sup>l</sup> štakora. Među sojevima

koji ne odgovaraju na EAE samo Rt1<sup>u</sup> haplotip štakora je pokazao imuni odgovor na MBP 63-88. Međutim, kvalitativno je ovaj odgovor bio različit od odgovora u EAE osjetljivog soja. Tako nije bilo proliferacije, a primjećena je samo umjerena produkcija IFN- $\gamma$  prilikom odgovora na peptid. Nasuprot tome primjećena je značajna i peptidom vrlo rano inducirana produkcija IL-4 i TGF- $\beta$ . Ovi rezultati ukazuju da je osjetljivost za EAE povezana sa GHK te da djelomično ovisi o sposobnosti razvijanja TH1-tipičnog imunološkog odgovora, dok se EAE rezistencija vezana za GHK može odnositi na MBP specifičnu reaktivnost ili za prepoznavanje peptida i indukciju kvalitativno različitih mehanizama koji dovode do slabljenja imunološkog odgovora (168).

### 2.1.2. IMUNOPATOGENEZA EAE-A

U posljednje vrijeme sve se veća uloga u patogenezi EAE-a pridaje astrocitima - antigen prezentirajućim stanicama u CNS-u. Pokazano je da astrociti mogu prezentirati MBP encefalitogeničnim T staničnim linijama *in vitro* (62), dok su perivaskularne mikroglia stanice u CNS-u porijeklom iz koštane srži pokazale da mogu prezentirati antigen *in vivo* (91). *In vivo* studije pokazale su potrebu za histokompatibilnošću između encefalitogeničnih stanica koje prodiru u CNS i perivaskularnih mikroglialnih stanica prilikom indukcije EAE-a (91). Nedavni rezultati također govore da rezistencija ili osjetljivost za autoimuni proces može biti dovedena u vezu sa sposobnošću moždanog endotela ili glija stanica osjetljivih sojeva štakora i miševa da eksprimiraju dovoljnu razinu molekula GHK potrebnih za stimulaciju autoreaktivnih T stanica (154).

Ove razlike u sposobnosti stimulacije unutar vrste čine se specifičnim za tkivo jer stanice koje nisu glija iz različitih sojeva imaju ekvivalentne sposobnosti za stimulaciju T staničnih linija. Ove činjenice govore ujedno i o mogućnosti da su antigeni GHK na glija stanicama i stanicama koje nisu glija različiti, te da ova razlika može biti važna u određivanju T stanicama posredovane, organ specifične autoimunosti. Aberantna MHC ekspresija bi također mogla imati ulogu u endokrinoj autoimunosti (24).

Uz prezentaciju antigena T staničnim receptorom pomoću antigen-prezentirajućih stanica važni su i kostimulacijski signali jer se T stanična anergija može razviti ukoliko se antigen prezentira T stanicama u odsutnosti takvih signala (196).

Usto je moguće da antigen prezentirajuće stanice u CNS-u konstitutivno anergiziraju autoreaktivne T stanice koje migriraju u CNS time što im ne omogućavaju adekvatne kostimulacijske signale. Događaji koji dovode do razvoja autoimune bolesti koja se spontano pojavljuje su nepoznati. Vjerojatno imunološki sistem reagira na vanjske čimbenike kao što su virusi i bakterije. Mogući mehanizmi uključuju infekciju CNS-a virusom uz oslobađanje autoantigena (106), molekularnu mimikriju gdje su dijelovi virusa homologni CNS proteinima (68), ili opću aktivaciju imunološkog sistema preko citokina, kao IFN- $\gamma$ -a koji se oslobađa prilikom virusne infekcije (106).

MS pacijenti sa povećanim brojem kliničkih infekcija imaju više ataka (224), dok tretman MS-e sa IFN- $\gamma$  pogoršava bolest (175).

Osim astrocita, analizira se i učinak mononukleara periferne krvi i polimorfonukleara tj. stanica koje su enzimatski sposobne producirati reaktivne kisikove i dušikove međuspojeve koji u suvišku predstavljaju medijatore tkivnog oštećenja, pa prema tome imaju značajnu ulogu u patogenezi EAE-a. Tako u perivaskularnim lezijama unutar CNS-a štakora s hiperakutnim EAE-om (HEAE) postoji veliki broj mononukleara periferne krvi i polimorfonuklearnih leukocita. Periferni mononukleari i polimorfonukleari izolirani iz CNS-a i periferije životinja sa hiperakutnim EAE-om secerniraju signifikantno veću količinu od životinja tretiranih pertusisom ili fiziološkom otopinom. Koinkubacija sistemno dobivenih mononukleara periferne krvi i polimorfonukleara sa antigen stimulirajućim MBP specifičnim T staničnim linijama vodi daljnjem povećanju izlučivanja reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva između 15,3 i 83,1% što se može pripisati solubilnim produktima oslobođenim iz T staničnih linija (144).

Osim stanica, u patogenezi EAE-a značajno mjesto imaju istraživanja encefalitogeničnosti pojedinih peptida. Ranije smo spomenuli da je pMOG 35-55 peptid sposoban izazvati neurološko oštećenje (140). Bolest je u tom slučaju bila kroničnog tipa sa ascendentnom paralizom i neuropatološkim nalazom koji se može usporediti sa EAE-om induciranim sa MBP-om ili PLP-om osim što je u H-2<sup>b</sup> miša bolest bila konstantno remitirajuća. Ove osobine se značajno razlikuju od onih koje su primjećene u PL (H-2<sup>u</sup>) miša u kojeg je bolest inducirana sa p-MOG 35-55 fragmentom mijelinskog oligodendrocitnog proteina. U PL miša pMOG 35-55 inducira atipični kronični relapsirajući EAE čija ekspresija i progresija nije predvidiva. Prema navedenom, vidljivo je da isti MOG peptid može inducirati tipični EAE sa nepredvidivim kliničkim znakovima.

pMOG 35-55 specifične stanice iz H-2<sup>b</sup> miša prepoznale su epitop unutar aminokiselina 40-55 MOG molekule, dok su pMOG 40-55 reaktivne T stanične linije bile encefalitogenične nakon transfera u singenične primaoce. Encefalitogenične pMOG 35-55 reaktivne C57BL/6JT stanične linije ekspimiraju V $\beta$ 1, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8, V $\beta$ 14 i V $\beta$ 15 genske segmente, a pMOG 35-55 reaktivne C3H/57 T stanične linije ekspimiraju V $\beta$ 1, V $\beta$ 2, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8, V $\beta$ 10, V $\beta$ 14 i V $\beta$ 15 genske segmente. U oba mišja soja je korištenje V $\beta$ 8 genskog produkta bilo predominantno (40-43%) (140).

U intenciji da se odgovori na brojna pitanja nađu na genskoj razini konstruiran je i transgenični miš koji oponaša humanu autoimunu bolest multiplu sklerozu u njenoj spontanoj indukciji i patologiji. Transgenični miševi su konstruirani ekspimiranjem gena koji kodira rearanžirani T stanični receptor specifičan za MBP. U ovakvih miševa T stanična tolerancija nije inducirana na periferiji, a funkcionalne autoreaktivne stanice su pronađene u slezeni i limfnom čvoru. Transgenični miševi razvijaju EAE nakon imunizacije sa MBP-om i adjuvansom plus pertusis toksinom kao i nakon davanja samog pertusis toksina. Spontani EAE može se razviti u transgeničnog miša držanog u

nesterilnim uvjetima, ali ne u onih držanih u sterilnim, specifičnim patogen-slobodnim uvjetima. Ovaj model omogućava razdvajanje genetskih i okolnih varijabli koje mogu doprinijeti razvoju autoimune bolesti (83).

### **2.1.2.1. STATUS CENTRALNOG NERVOG SISTEMA UNUTAR IMUNOLOŠKOG SISTEMA**

Dugo se je vremena važila dogma da je CNS imunološki privilegirano mjesto. S obzirom na navedenu dogmu Cserr i suradnici (82) smatrali su važnim prethodno provjeriti intaktnost krvno-moždane barijere. Oni su pokazali da injekcija proteinskih antigena u lateralne ventrikule ili u neuropil može izazvati sistemski humoralni imunološki odgovor značajnih proporcija a budući da je pri tome je krvno-moždana barijera bila intaktna, time je pokazano da antigeni nastali na imunološki privilegiranim mjestima ipak utječu na imunološki sistem (239).

Humoralni je odgovor opisan i nakon intracerebralne injekcije humanog serumskog albumina. Prema tome humoralni odgovor na intracerebralnu antigenu prezentaciju dovodi do stvaranja većeg titra antitijela nego u slučaju aplikacije antigena drugim putem. Međutim pokazano je da infuzija malih količina mijelinskog bazičnog proteina u lateralne ventrikule mozga Lewis štakora mijenja sposobnost ovih životinja da odgovore na ponovnu imunizaciju s MBP-om (86), te da štakori intracerebroventrikularno pretretirani MBP-om razvijaju slabe ili nikakve kliničke znakove bolesti kad su imunizirani subkutano sa MBP-om u adjuvansu. Štoviše, nakon intracerebralne aplikacije antigena drenirajući limfni cervikalni čvorovi ispunjeni su velikim brojem stimuliranih T limfocita kao i B limfocita koji produciraju antitijela (87).

Prema navedenom, imunološka privilegiranost mozga koja je osobita po potpunim ili djelomičnim ispadima stanicama posredovanim imunim efektorskim mehanizmima praćena je impresivnom produkcijom antitijela.

Spomenimo usput da je u mozgu prisutna slaba ekspresija molekula razreda jedan i molekula razreda dva GHK (132).

Prema tome imunološka privilegiranost mozga ovisi o intaktnoj krvno-moždanoj barijeri, a autoimuna bolest nastaje zbog poremećaja endogenih mehanizama koji normalno induciraju razvoj tolerancije na vlastita tkiva.

### **2.1.2.2. MEHANIZMI NASTANKA TOLERANCIJE I AUTOIMUNOSTI**

Imunološka tolerancija je specifična imunološka nereaktivnost organizma na određeni antigen. Predstavlja stečeno stanje nastalo aktivnim procesom nakon kontakta imunološkog sustava s antigenom. Pritom dolazi do promjena u specifičnom klonu reaktivnih limfocita koji vode njegovoj inaktivaciji ili blokadi djelovanja. Po tome se specifična nereaktivnost - tolerancija, razlikuje od nespecifične nereaktivnosti. Naime, potonja se odnosi na sve ili većinu antigena i obično predstavlja posljedicu nasljednog poremećaja imunološke reaktivnosti (prirodne ili primarne imunodeficijencije), slabljenja imunološkog

sustava u toku nekih bolesti (sekundarne imunodeficijencije) ili primjene imunosupresivnih tvari (imunosupresija). Pri nespecifičnoj nereaktivnosti za razliku od specifične, obično postoje vidljive morfološke ili kvantitativne promjene u limfnim organima.

Imunološka tolerancija u užem smislu obuhvaća samo centralnu nereaktivnost tj. ona stanja koja dovode do inaktivacije specifičnog klona limfocita, tako da ne dolazi do njegova sazrijevanja niti stvaranja efektorskih produkata. U širem smislu ona obuhvaća i tzv. perifernu toleranciju (nereaktivnost), pri čemu, bar u početku, dolazi do aktivacije klona i stvaranja efektorskih produkata, ali je njihovo daljnje stvaranje ili djelovanje zakočeno upletanjem raznih supresijskih (imunoregulacijskih) mehanizama.

Na razvoj tolerancije utječe nekoliko različitih mehanizama koje ćemo kratko spomenuti. Prvi je zrelost imunološkog sistema. Općenito uzevši mogućnost izazivanja tolerancije na neki antigen obrnuto je razmjerna stupnju zrelosti imunološkog sustava. Lakše uspostavljanje tolerancije u odraslih životinja nakon njihove obrade imunosupresijskim sredstvima tumači se ne samo odstranjenjem zrelih imunokompetentnih stanica, nego i pojačanim stvaranjem nezrelih (regeneracijskih) stanica koje su podložne imunološkoj toleranciji. Drugi čimbenik koji utječe na toleranciju čine svojstva antigena. Obično je imunogeničnost nekog antigena veća što je slabija njegova "tolerogeničnost". Zbog toga je lakše izazvati toleranciju na tuđe serumske proteine (koji su slabi antigeni) nego na bakterijske produkte, koji su jaki antigeni.

Imunogeničnost agregiranih molekula gamaglobulina i tolerogeničnost neagregiranih molekula tumači se time što agregate, za razliku od neagregiranih molekula, lako fagocitiraju makrofagi pa time predočuju antigen limfocitima u optimalnom (imunogeničnom) obliku. Veličina (molekulska masa) antigena je obično obrnuto razmjerna tolerogeničnosti antigena. Spomenimo da na razvoj tolerancije utječu njegove kemijske značajke antigena, dok pri uspostavljanju tolerancije na transplanate važnu ulogu predstavljaju vitalnost, odnosno nativnost tkiva upotrebljenih za preimunizaciju.

Treći bitan čimbenik u razvoju tolerancije je doza antigena pa možemo govoriti o tzv. "malodoznoj" i "velikodoznoj toleranciji".

Četvrti čimbenik u razvoju tolerancije predstavlja put unosa antigena.

Pokazano je da intravenski put unosa antigena pogoduje nastanku tolerancije, dok kožni ili potkožni put pospješuje imunološki odgovor. Vjeruje se da su pri intravenskom unosu antigena limfociti izloženi velikoj količini neprerađenog antigena (prije prezentacije od strane makrofaga) što bi mehanizmom zasićenja blokade receptora dovelo do njihove inaktivacije. O putu unosa antigena ovisna je raspodjela antigena u tijelu odnosno njegova imunogeničnost, te brzina odstranjenja antigena iz organizma odnosno iz limfnog tkiva.

Među teorijama o razvoju tolerancije spomenimo teoriju o isčezlim (zabranjenim) klonovima (klonska delecija) koja govori o isčezavanju specifičnog klona limfocita nakon njegovog kontakta s antigenom u prenatalnom ili perinatalnom razdoblju. Druga teorija govori o klonskoj anergiji, a podržavaju je sljedeće činjenice: a) stanice perinatalno tolerantnih jedinki su neraktivne (*in vivo* i *in vitro*) na antigene toleriranog davaoca; b) tolerancija u

perinatalnoj dobi ne može se pasivno prenijeti u normalnog primaoca; c) ta tolerancija traje znatno duže nego što se može dokazati znatnija prisutnost davaočevih (antigena) u limfatičkim organima primaoca.

U razvoju tolerancije spominje se i značaj facilitacijskih protutijela i blokadnih čimbenika. Pokazano je da se serumom jedinice s facilitiranim transplantatom može pasivno prenijeti stanje na normalnog primaoca. Smatra se da taj učinak posreduju facilitacijska protutijela koja nisu citotoksična za ciljnu stanicu (ne aktiviraju komplement niti stanice ubojice-K stanice). Ta protutijela bi prvenstveno djelovala na taj način što bi vezanjem za ciljne stanice prekrivala antigene i na taj način priječila djelovanje efektorskih T-limfocita. Blokadni čimbenici bi mogli kočiti djelovanje efektorskih stanica na dva načina: u suvišku protutijela prekrivali bi antigene ciljnih stanica, a u suvišku antigena blokirali bi receptore efektorskih stanica. Slobodni antigen bi, naravno, djelovao samo putem blokade receptora. Ima dokaza da slobodni antigen (ili u kompleksu s malom količinom protutijela) može dovesti do trajne blokade odnosno gubitka receptora na efektorskim stanicama. Osnovni nedostatak teorije o blokadnim faktorima je da njihovo djelovanje nije nikada jasno dokazano *in vivo*.

Spomenimo da u posljednjih desetak godina prevladava mišljenje da je djelovanje supresijskih stanica glavni mehanizam koji inducira i održava toleranciju prema topljivim antigenima, a možda i prema transplantatima tkiva u odraslom organizmu i perinatalnoj toleranciji (2).

Imunološki sistem ima zadatak da reagira protiv stranih antigena, a da pritom ne reagira na vlastite antigene. U mehanizmima razlikovanja stranog i vlastitog bitno je zamjetiti odsutnost T stanica reaktivnih na vlastite antigene na periferiji (134). Eliminacija klonova T limfocita reaktivnih sa vlastitim je općenito dobro prihvaćen mehanizam indukcije centralne tolerancije u timusu, dok se mehanizam indukcije periferne tolerancije objašnjava različitim mehanizmima. To može biti periferna "anergija" (214), indukcija tolerancije imunosupresijom (43), nedostatak "drugog signala" (129), i "veto" fenomen (158).

O ispravnosti ovog mehanizma govore radovi gdje je tolerancija inducirana uklapanjem antigena u genom životinje ili njegovim injiciranjem. Možda najilustrativniji rad koji govori u prilog ovome mehanizmu ukazuje na nesposobnost T limfocita iz tolerantnih životinja da reagiraju čak i nakon njihove direktne stimulacije antigenog receptora pomoću V $\beta$ -specifičnih antitijela (33).

Nadalje, antigen specifični odgovori ne mogu biti izazvani u kulturi stanica tolerantnih životinja unatoč prisutnosti stanica koji ekspimiraju odgovarajući V $\beta$  lanac premda su neki autori pokazali da stanice koje ekspimiraju V $\beta$  lanac prepoznaju antigen, kao i što ekspimiraju p55 lanac IL-2 receptora (195). U nekim modelima anergija je udružena sa smanjenom ekspresijom nekih površnih staničnih proteina neophodnih za T staničnu aktivaciju kao T stanični receptor i/ili pomoćni proteini kao CD8 (131,212).

Indukcija anergije u antigen specifičnih T stanica opisana je i u kulturi stanica (105), te *in vivo* modelima (89).

IL-2 može stvoriti ili prevenirati indukciju tolerancije (104). Na osnovu ovih rezultata je sugerirano da su za nastavak tolerancije potrebni kostimulacijski signali (214).

#### 2.1.2.2.1. MEHANIZMI NASTANKA SUPRESIJE, TOLERANCIJE I AUTOIMUNOSTI U EAE-U

Nakon kontakta sa stranim antigenom imunološki sistem može reagirati na dva načina: razvojem tolerancije ili imuniteta. To ovisi o mnogobrojnim čimbenicima koji uključuju put aplikacije, upotrebu adjuvansa, te koncentraciju i fizičko stanje antigena.

Za supresiju EAE-a bile su korištene različite metode npr. tolerancija uzrokovana oralnom aplikacijom antigena, tolerancija uzrokovana antigenom uključujući intravensku aplikaciju antigena, aplikaciju u inkompletnom Freund-ovom adjuvansu i aplikaciju u obliku liposoma vezanih za autologne limfocite.

Supresija EAE-a je u vezi sa stvaranjem antigen specifičnih CD8 stanica koje sprečavaju razvoj EAE-a nakon pasivnog prijenosa (139), a djeluju oslobađanjem supresijskog citokina TGF- $\beta$  nakon njegovog kontakta s antigenom. Antigenom posredovana periferna tolerancija može uključiti supresijske epitope koji su različiti od imunodominantnih epitopa na antigenima koji aktiviraju CD4+ stanice. Ovaj fenomen primjećen je u EAE-u (247).

Nije jasno zašto određeni epitopi proteina mogu imati supresijska svojstva. Ipak, ovi rezultati otvaraju mogućnost da neencefalitogenični fragmenti autoantigena kao što je MBP mogu biti korišteni u liječenju MS-e, premda u različitim individua mogu biti aktivni različiti supresijski epitopi.

Oralna aplikacija antigena je klasičan metod indukcije periferne tolerancije koji može inducirati aktivnu supresiju (niska doza antigena) ili klonsku anergiju (visoka doza antigena). Ovo je ujedno biološki relevantna metoda indukcije periferne tolerancije koja uključuje fiziološku interakciju proteina sa imunim sistemom crijeva koji pak ima zadatak prevencije sistemnog imunološkog odgovora na proteine unešene oralim putem.

Premda nije definiran jasan mehanizam supresije udružene s oralnom tolerancijom mnogi eksperimenti pokazuju aktivnu supresiju posredovanu T stanicama nakon oralnog davanja antigena (164). Hranjenje antigenom utječe na humoralni i stanični imunitet. Neki istraživači su sugerirali pojavu CD4+ supresijskih induktorskih stanica koje se stvaraju u Payer-ovim pločama i onda migriraju u mezenterijalne limfne čvorove i slezenu gdje sprečavaju odgovor imunološkog sistema inducirajući CD8+ supresijske efektorske stanice (93). Oralno davanje MBP-a i mijelinskih antigena suprimira akutni i CR-EAE

(87), S-Ag suprimira eksperimentalni autoimuni uveitis (170), a kolagen II suprimira kolagenom i adjuvansom inducirani artritis (254,281).

Oralna aplikacija MBP-a suprimira EAE indukcijom periferne tolerancije. T stanični klonovi izolirani iz mezenteričnih limfnih čvorova SJL miša koji su postali tolerantni na MBP nakon oralnog hranjenja bili su strukturno identični Th1 tipu CD4+ encefalitogeničnim klonova po upotrebi T staničnog receptora, po restrikciji vezanoj za GHK, kao i po prepoznavanju epitopa. Međutim, oni produciraju TGF- $\beta$  uz različite količine IL-4 i IL-10, te suprimiraju EAE induciran sa MBP-om ili proteolipidnim proteinom (40).

Oralna tolerancija postiže se oralnim aplikacijama MBP-a koje dovode do supresije EAE-a. Ona je posredovana CD8+ T stanicama koje pasivno mogu prenijeti protekciju *in vitro* i *in vivo* oslobađanjem transformirajućeg faktora rasta TGF  $\beta$  (eng. transforming growth factor) nakon antigen specifične stimulacije. Oralna tolerancija prema MBP-u pojačava se istovremenom oralnom aplikacijom LPS-a. Citokinski obrasci sekrecije upalnih stanica u CNS-u pokazali su da životinje oralno hranjene MBP-om pokazuju pojačanu produkciju inhibirajućeg citokina TGF- $\beta$  uz smanjenu produkciju svih upalnih citokina, dok kontrolna skupina hranjena ovalbuminom pokazuje povećanu sekreciju upalnih citokina IL1, IL2, IL6, IL8, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . U njih su inhibični citokini TGF- $\beta$ , IL-4 i prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) bili odsutni. U životinja oralno hranjenih MBP-om i lipopolisaharidom (LPS) došlo je do pojačane ekspresije IL-4 i PGE<sub>2</sub>. Ovi rezultati sugeriraju da se supresija EAE-a inducirana oralnom tolerancijom ili tijekom spontanog oporavka može povezati sa sekrecijom inhibičijskih faktora ili citokina koji aktivno suprimiraju upalni proces u mozgu (121).

Drugi metod indukcije antigen specifična tolerancije inducirane intravenskom aplikacijom splenocita udruženih sa neuroantigenima, kao što je homogenat leđne moždine, MBP, proteolipoprotein i njihovi encefalitogenični peptidi aktivan je *in vivo* i *in vitro*. Rezultat takve aplikacije je indukcija kliničkih i histoloških znakova aktivno inducirano i pasivno prenešenog relapsirajućeg EAE-a (R-EAE-a). Davanje splenocita udruženih sa mišjim homogenatom leđne moždine poslije prve paralitične epizode adoptivnog R-EAE izazvanog MBP-specifičnim T stanicama efektivno reducira nastup i težinu svih pratećih relapsa. Nasuprot tome, intravenska aplikacija splenocita udruženih sa MBP-om efektivno inhibira početni klinički relaps, ali se prateći relapsi nisu razlikovali od onih u kontrolnih životinja. Prema navedenom može se zaključiti da je neuroantigen specifična tolerancija efektivna u specifičnoj down-regulaciji autoimunog procesa u tijelu. Ovo ujedno pokazuje da se neuroantigen specifični relapsi EAE-a mogu razviti zbog djelovanja efektorskih stanica čija je specifičnost različita od stanica koje su inducirale početak kliničkih znakova (250). Ekspresija kliničkih znakova R-EAE-a inducirano poliklonskom populacijom za goveđe MBP-specifične efektorske T stanice se može inhibirati na doza-ovisan način nakon intravenske aplikacije ili nakon subkutane ili intraperitonealne injekcije splenocita udruženih sa MBP-om. Antigena specifičnost inhibicije je evidentna samo kod splenocita udruženih sa intaktnim



goveđim MBP-om ili sa varijantama MBP-a homolognim sa goveđim MBP-om unutar glavne encefalitogenične regije (aminokiseline 84-104), ali ne sa proteolipidnim proteinom ili homogenatom mišjeg bubrega. Splenociti udruženi sa MBP 84-104 peptidom koji sadrži set glavnih encefalitogeničnih epitopa kompletno inhibiraju peptid specifične T stanične odgovore, ali samo djelomično inhibiraju ekspresiju bolesti koja je transferirana T stanicama specifičnim za intaktni MBP. Ovo sugerira sudjelovanje T staničnih odgovora specifičnih za dodatne MBP determinante u patogenezi bolesti. Splenociti udruženi sa manjim SJL/J encefalitogeničnim epitopima (MBP 91-104 ili MBP 17-27) ili sa glavnim encefalitogeničnim epitopim za Lewis štakora MBP 68-86 nisu suprimirali ekspresiju bolesti. Ovo ukazuje da MBP-specifične T stanice i T stanice specifične za još neindificirane MBP-epitope sudjeluje u patogenezi R-EAE-a (249).

U EAE modelu, injekcija mišjih splenocita na koje je vezan MBP sedam dana prije imunizacije sa homogenatom leđne moždine miša prevenira indukciju akutnog EAE-a u SJL/J miša (230), a ujedno suprimira CR-EAE induciran homogenatom leđne moždine miša (116). Neuroantigen-specifična tolerancija korištena je za određivanje relativne uloge MBP-a i PLP-a u CREAE-u induciranom homogenatom leđne moždine miša (117). Pokazano je da tolerancija sa PLP-om, (ali ne sa splenocitima na koje je vezan MBP) prevenira bolest ovih životinja.

Sintetski kopolimer (Cop1) natječe se sa MBP-om u vezanju za MBP reaktivne klonove te može inhibirati T stanične odgovore na MBP (251). Njegovo subkutano davanje je pokazalo pozitivne učinke u ranoj relapsirajućoj MS (23), dok učinak nije primijećen u kroničnom obliku. Točan mehanizam djelovanja Cop1 *in vivo* je nejasan. Inicijalno se smatralo da dovodi do tolerancije inducirane antigenom zbog njegove unakrsne reaktivnosti sa MBP-om, a potom je otkrivena i indukcija MBP-specifičnih supresorskih stanica (133). Postulirano je i njegovo djelovanje u smislu inhibicije efektorskih stanica specifičnih za bazični protein.

Osim spomenutih mehanizama toleranciju u EAE-u moguće je postići ozračivanjem čitavog tijela miša nakon koje se učini transplantacija singenične koštane srži šestog dana po imunizaciji. Ovo uzrokuje odgođenu pojavu i značajnu redukciju incidencije i težine EAE-a. Veće doze primjenjene prilikom ozračivanja (1100cGy) ili davanje ciklofosfamida praćeno sa transplantacijom singenične koštane srži kompletno ukida razvoj paralize. Štoviše, životinje koje su tretirane ciklofosfamidom i transplantacijom singenične koštane srži postale su rezistentne na reindukciju bolesti sa istim encefalitogeničnim inokulumom, dok limfociti dobiveni iz ovih miševa nisu proliferirali *in vitro* u odgovoru na MBP ili pročišćeni proteinski derivat (PPD) za razliku od imuniziranih netretiranih životinja. Međutim, odsutnost reaktivnosti nije udružena s promjenama u proporcijama L3T4 i Lyt-2T staničnim populacijama, ni sa gubitkom T stanične kompetencije što je evidentirano odgovorom na T stanični mitogen konkanavalin A (Con A) i nerelevantni Ag ovalumin (114).

Spomenimo da je jedan od široko prihvaćenih mehanizama u indukciji virusom inducirane autoimunosti molekularna mimikrija. Smatra se da oštećenje nastaje zbog imunološkog odgovora na regije zajedničke virusu i domaćinu (5).

### 2.1.2.3. MEHANIZMI DJELOVANJA STANICA U PATOGENEZI EAE-A

#### 2.1.2.3.1. ULOGA ANTIGEN PREZENTIRAJUĆIH STANICA (APS) I ADHEZIJSKIH MOLEKULA

CNS se tradicionalno smatra imunoprivilegiranim organom. Krvno-moždana barijera predstavlja važnu granicu ograničavajući ulaz antitijela i imunokompetentnih stanica. Osim toga, CNS eksprimira iznimno nisku razinu molekula razreda jedan i molekula razreda dva koji su restriktivni element za CD8+ i CD4+ stanice u usporedbi sa drugim tkivima (213). Međutim, imunološka reakcija se ipak pojavljuje u CNS-u. Aktivirane T stanice mogu ući u parenhim CNS-a (272) za vrijeme EAE-a (257) i eksperimentalnog autoimunog neuritisa (172) kao i drugih eksperimentalnih infekcija CNS-a (173).

Antigeni prvog i drugog razreda GHK mogu se brzo inducirati na različitim rezidentnim stanicama, što rezultira prezentacijom peptidnih antigena T stanicama i njihovom lokalnom aktivacijom. Još uvijek postoje podvojena mišljenja koje vrste stanica su glavne antigen prezentirajuće stanice u CNS-u.

Nedostatak molekula razreda jedan i molekula razreda dva GHK može se dovesti u vezu sa supresijom imunološkog odgovora posredovanog GHK restriktivnim T stanicama što je demonstrirano:

- a) nedostatkom T stanicama posredovane eliminacije tumora ili neurotropnih virusa iz CNS-a ukoliko ih uspoređujemo sa drugim tkivima (146).
- b) genetskom rezistencijom prema autoimunim bolestima CNS-a u sojevima glodavaca koji eksprimiraju relativno nisku razinu molekula razreda dva GHK na stanicama CNS-a u usporedbi sa osjetljivim sojevima (151).

Općenito je prihvaćeno da T limfociti prepoznaju antigene udružene isključivo na molekulama GHK na antigen prezentirajućim stanicama (APS) (160,245). Također se vjeruje da je reaktivnost i korištenje T staničnog receptora određeno s antigeničnim epitopima (90). Danas se smatra da APS utječu na T stanične odgovore za vrijeme EAE-a značajnije nego što se ranije mislilo. Pokazano je da korištenje  $\beta$  lanca T staničnog receptora štakorskih encefalitogeničnih T staničnih populacija ne ovisi samo o strukturi staničnog peptida, već i o izvoru APS, korištenih kao podrška u *in vitro* proliferaciji (244).

Ponavljana stimulacija štakorskih encefalitogeničnih T staničnih linija obično pokazuje sklonost rasta T staničnih populacija sa različitim korištenjem T staničnog receptora. Nasuprot ovome ponavljana stimulacija Ia+ T staničnim linijama (LOA stanice) ili kloniranim glija stanicama koje ekspimiraju Ia (242,270) vodi rastu T staničnih subpopulacija koje su restriktivnije u njihovoj ekspresiji  $\beta$ -lanca T staničnog receptora (244). Navedene činjenice govore da su APS aktivni sudionici u T staničnoj aktivaciji, te da reagiraju sa Ag-specifičnim T stanicama više na selektivan nego na slučajan način. Tako je pokazano da MBP peptid 69-84-Gly i (P80)68-86, koji su restimulacijski prema štakorskim encefalitogeničnim T stanicama, postaju snažno stimulacijski kad se standardne APS zamjene alternativnim stanicama. Iz ovog se može zaključiti da aktivacija encefalitogeničnih T stanica ne ovisi sasvim o prirodi peptidnog antigena već uključuje i osobitosti APS.

O značaju APS govori i nalaz da neki MBP-specifični T stanični hibridomi mogu biti aktivirani korištenjem odgovarajućih peptida i pomoću cjelokupnih ili samo adherentnih stanica slezene kao APS-a. Nasuprot tome druge su stanice reagirale samo kada su sve stanice slezene korištene kao APS što sugerira da su određene neadherentne APS potrebne u aktivaciji MBP-specifičnih T stanica.

Međutim, ostaje nejasno što je razlog povećanoj efikasnosti T stanica i Ia pozitivnih glija stanica kao APS stanica. Čini se vjerojatnim da T stanična aktivacija zahtjeva mnogobrojne pomoćne molekule koje su udružene samo sa nekim APS. Činjenica da određene APS mogu selektivno reagirati sa Ag-specifičnim T stanicama otvara mogućnost da različite populacije APS mogu procesirati MBP *in vivo* te stvoriti različite peptide. Nasuprot tome konstelacija pomoćnih molekula sposobnih da reagiraju sa ligandima na T staničnoj površini može varirati između populacija APS stvarajući različite T stanične odgovore, čak i onda kada je struktura i gustoća T staničnog receptora-antigena-GHK-a slična (150).

Za prezentaciju antigena T staničnom receptoru pomoću antigen-prezentirajućih stanica važni su i kostimulacijski signali, jer ukoliko se antigen prezentira u odsutnosti takvih signala razvija se T stanična anergija. Poznato je da je ekspresija molekula GHK esencijalna u procesu antigenog prepoznavanja od pomoćničkih i citotoksičnih T stanica: antigeni prvog razreda GHK imaju ulogu u aktivaciji citotoksičnih T stanica, dok su antigeni drugog razreda GHK odgovorni za T staničnu aktivaciju pomoćničko-induktorskih stanica pomoću antigen prezentirajućih stanica.

Da bi ušli u CNS encefalitogenični T limfociti moraju doći u kontakt sa krvno moždanom barijerom. Tu se nalaze astrociti koji svojim izdancima doprinose u njezinoj izgradnji (256). *In vitro* eksperimenti su pokazali da nekoliko tipova stanica uključujući mikroglija stanice, astrocite i endotelne stanice mogu funkcionirati kao antigen prezentirajuće stanice (38). Astrociti mogu *in vitro* prezentirati MBP T limfocitima (62,243), zatim odgovoriti na citokine

povećavajući antigenu ekspresiju antigena GHK (38), a ujedno i sami mogu dodatno lučiti citokine (265).

Stanicama posredovani imunološki odgovori obuhvaćaju klonsku selekciju antigen specifičnih CD4 pozitivnih stanica u drenirajućim limfnim čvorovima. Nakon njihove proliferacije i diferencijacije do stanja u kojem su sposobne izvršavati efektorske funkcije one migriraju preko efektorskih limfnih žila i ulaze u krv. Da bi izvršile svoju efektorsku funkciju one moraju napustiti krvne žile i prepoznati antigene u tkivu. Za vrijeme infekcije ovaj proces dovodi do obrane domaćina, dok u autoimunosti dovodi do oštećenja tkiva. Proces migracije T stanica iz krvi u tkiva otvara mnoga pitanja kao npr. kako T stanice ulaze u tkivo koje normalno ne sadrži značajan broj ovih stanica kao što je CNS (88), zatim koje su molekule upletene u proces "izlaska" T stanica iz krvi, te da li ovaj proces može biti blokiran upalom.

U infekciji lokalni signali aktiviraju endotelne stanice koje reagiraju sa leukocitima. Aktivirane endotelne stanice ekspimiraju različite molekule (VCAM-1 i ICAM-1) koje su uključene u proces vezivanja leukocita i endotelnih stanica (1). Tako, lokalni upalni signali za izlazak leukocita i lokalnu aktivaciju limfocita mogu podržati proces produkcije upalnih citokina (182).

Međutim, poznato je da se T stanice specifične za autoantigene mogu vezati za endotel i ući u tkiva i u odsutnosti signala koji induciraju upalu. Ovim se sugerira mogućnost da aktivirane efektorske T stanice mogu ući u sva tkiva prilikom "potrage" za antigenom, što se ujedno čini jednim od kritičnih momenata u obrani organizma od infektivnih čimbenika koji ne izazivaju snažni upalni odgovor. Ovaj mehanizam može doprinijeti razvoju autoimune bolesti. Pokazano je da aktivirane T stanice preferiraju izlazak iz krvi u tkiva, dok neaktivirane stanice izlaze u visoke endotelne venule limfnih čvorova.

Intaktni CNS sisavaca obično ne sadrži značajan broj limfocita. Krvno-moždana barijera je vrlo efikasna u isključivanju "inertnih" stanica kao što su eritrociti i "migrirajući" T limfociti. Činjenica je međutim da aktivirani T stanice mogu lako proći krvno moždanu barijeru (91), iako točan mehanizam kojim ovi limfociti ulaze u CNS ostaje nejasan. Pokazano je da T stanice specifične za encefalitogenični MBP peptid moraju secernirati limfotoksin da bi uzrokovale bolest (188). Međutim, noviji rezultati pokazuju da među T staničnim linijama specifičnim za isti encefalitogenični peptid postoje razlike. Tako, CD4+Th-1 stanice specifične za encefalitogenični MBP peptid secerniraju velike količine IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i/ili TNF- $\beta$  dok CD4+Th-2 klonovi koji su specifični za isti encefalitogenični peptid, secerniraju velike količine IL-4, ali ne i IFN- $\gamma$  ili limfotoksina, te nisu sposobni inducirati bolest. Međutim postoje i dodatni uvjeti koje CD4 stanice moraju zadovoljiti da bi ušle u moždani parenhim. Taj proces zahtijeva ekspresiju  $\alpha 4$  integrina VLA-4 (eng. very late antigen 4) na površini TH1 klonova, te vezanje za njihov ligand adhezijsku molekulu stanica krvnih žila (VCAM) (eng. vascular cell adhesion molecule 1) i vjerojatno vezivanje integrina LFA-1 (eng. lymphocyte function associate-1) za

intercelularnu adhezijsku molekulu (ICAM-1) - (eng. intercellular adhesion molecule 1). Nekoliko različitih vrsta dokaza ukazuje na ideju da encefalitogeničnost T stanica korelira sa  $\alpha 4\beta 1$  ekspresijom, kao i sa sposobnošću ovih limfocita da uđu u CNS. Pokazano je da monoklonska antitijela protiv  $\alpha 4\beta 1$  mogu inhibirati indukciju EAE-a (7,83,127,276). VLA-4 je aktivacijski antigen pronađen na stanicama sa imunološkim pamćenjem, a specifičnost za acilirani MBP peptid Ac1-16 je povezana sa ekspresijom  $\alpha 4$  integrina na stanicama limfnih čvorova životinja koje su bile u kontaktu sa MBP-om. Na osnovu ovog može se zaključiti da stanice koje nisu bile u kontaktu sa antigenom ne mogu ući u mozak, što ujedno objašnjava odsustvo tolerancije na MBP kao antigen živčanog tkiva.

Ako je ekspresija  $\alpha 4$  integrina neophodna za bolest postavlja se pitanje koja je uloga VLA-4 u patogenezi? Na prvi pogled čini se malo vjerojatnim da je VLA-4 neophodan za T staničnu aktivaciju u EAE-u jer encefalitogenični klon 19P i njegova neencefalitogenična varijanta 19B jednako odgovaraju na MBP peptid Ac 1-16 proliferacijom i limfokinom produkcijom, dok antitijela na  $\alpha 4$  integrin ne blokiraju ovaj odgovor *in vitro*. Zbog navedenog, vjerojatnija uloga  $\alpha 4$  integrina u patogenezi EAE-a je dozvoljavanje pristupa u CNS limfocitima. Ovo podržava činjenica da patološke varijante klona 19 imaju sposobnost jakog vezivanja za endotelne stanice i adhezijsku molekulu stanica krvnih žila VCAM-1 (eng. vascular cell adhesion molecule) te sposobnost ulaska u parenhim mozga, dok nepatogene podlinije klona 19 imaju slabu sposobnost vezanja za endotelne stanice i VCAM-1, a pronađene su samo u ependimu mozga. Ovu ideju podržava činjenica da antitijela na  $\alpha 4$  integrin, VCAM-1 i ICAM-1 izgleda inhibiraju patogeničnost isključujući limfocite iz CNS-a. Međutim, kad se titar antitijela smanji, životinje postaju bolesne. Predpostavlja se da ulazak limfocita u CNS započinje kada se CNS-antigen-specifična T stanica veže za endotel interakcijom LFA-1-ICAM-1 (194). Dokaz za navedeno je blokada bolesti nakon davanja anti-ICAM-1 antitijela. Pojedini autori pretpostavljaju da se T stanice vežu za endotel ili pomoću LFA-1-ICAM-1 interakcijom ili vezivanjem pomoću selektina, te da potom aktivirane stanice pojačavaju pojavu VCAM-1 na endotelu na taj način što produciraju IFN- $\gamma$  i solubilni i za membranu vezani limfotoksin i TNF (157).

Mikroglia je glavna vrsta stanica koja može biti inducirana na ekspresiju antigena GHK u upali (74), intracerebralnom transplantatu (59) i eksperimentalno induciranoj neurodegeneraciji kao što je Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Poznato je da interferon- $\gamma$  inducira ekspresiju antigena GHK-a na velikom broju stanica uključujući makrofage (100). Istaknimo da perivaskularne mikroglia stanice porijeklom iz koštane srži mogu prezentirati antigen *in vivo* (91).

Astrociti i mikroglia mogu biti inducirani na ekspresiju antigena prvog i drugog razreda GHK-a pomoću različitih citokina uključujući IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , makrofagni čimbenik koji stvara kolonije, kao i granulocitno-makrofagni

čimbenik koji stvara kolonije, te pridonijeti prezentaciji antigena T stanicama. Međutim, mehanizmi koji ograničuju ekspanziju T stanica u moždanom tkivu su slabo definirani. Tako transformirajući faktor rasta B<sub>1</sub> i transformirajući faktor rasta B<sub>2</sub> (TGF-B<sub>2</sub>) producirani u stanicama mikroglije i astrocita mogu stvoriti lokalne negativne signale povratne sprege. Slično tome IL-10 glodavaca, produciran od Th2 stanica, inhibira sintezu citokina u TH1 stanicama (158). Isti citokin djeluje međutim kao faktor stimulacije rasta zajedno sa IL-2 i IL-4 na zrelim i nezrelim T stanicama (145).

IL-10 je dokazan u CNS-u miševa koji su se oporavili od EAE-a (119). Ovo je u suprotnosti sa akutnim stadijem bolesti koji je praćen sa lokalnom ekspresijom IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 i IFN- $\gamma$ , ali ne IL-10 (119).

Nadalje, IL-10 se producira intratekalno u meningitisu provociranom Listerijom u kasnoj fazi po infekciji (65). IL-10 izrazito inhibira IFN- $\gamma$  induciranu ekspresiju antigena drugog razreda GHK na stanicama mikroglije ali nema takav učinak na astrocite. Međutim, IL-10 ipak suprimira proliferativni odgovor, kako antigen ovisni tako i odgovor ovisan o antigenima drugog razreda GHK u prisutnosti obje navedene vrste APS stanica. Tretman s anti-IL-10 antitijelima također je pokazao da endogeno producirani IL-10 utječe na funkciju mikroglije, ali ne na astrocite koje služe kao APS. IL-10 značajno inhibira LPS-om induciranu produkciju granulocitno-makrofano čimbenika koji stimulira kolonije, zatim makrofagni čimbenik koji stimulira kolonije, te IL-6 u astrocitima i mikroglija stanicama. Nasuprot tome sekrecija navedenih dvaju citokina pod utjecajem IL-10 pomoću astrocita i mikroglije nije bila promjenjena kada su IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ili virusi korišteni kao stimulus. Ovi nalazi ukazuju da astrociti i stanice mikroglije imaju važnu ulogu u stvaranju intracerebralnog imunološkog odgovora.

Astrociti eksprimiraju malo ili uopće ne eksprimiraju molekule razreda dva GHK *in vivo* ili kada su svježe izolirani iz mozga. Međutim, po kultivaciji, ove stanice mogu konstitutivno eksprimirati nisku razinu molekula razreda jedan (152).

Kulturirani astrociti mogu biti inducirani na visoku razinu ekspresije molekula razreda jedan i molekula razreda dva GHK sa IFN- $\gamma$  (153).

Nije međutim jasno da li astrociti mogu i *in vivo* citokinima inducirani na ekspresiju značajnih količina molekula razreda jedan i molekula razreda dva, tijekom normalnih imunoloških odgovora na različite infektivne uzročnike. Indukcija ovih molekula na astrocitima je općenito slabija u odnosu na indukciju na stanicama monocitnih linija koje su smještene unutar CNS-a (mikroglija stanice) ili koje migriraju u CNS za vrijeme imunološkog odgovora u ovom tkivu (263).

Stoga se čini da su geni razreda jedan i razreda dva GHK negativno regulirani u stanicama neuroektodermalnog porijekla, uključujući astrocite, u odnosu prema ostalim vrstama stanica, što može biti važno u supresiji imunopatoloških reakcija unutar CNS-a (107).

Ovo je u skladu s opažanjem lokalizirane ekspresije molekula razreda jedan i molekula razreda dva GHK na astrocitima u nekim slučajevima akutnog

imunopatološkog upalnog T staničnog odgovora koji se javlja u aktivnim lezijama MS-e, EAE-a i virusom induciranog encefalomijelitisa (258)

*In vivo* studije ukazale su neophodnost histokompatibilnosti između encefalitogeničnih stanica koje prodiru u CNS i perivaskularnih mikroglijalnih stanica prilikom indukcije EAE-a (91). Stoga rezistencija i osjetljivost za autoimuni proces može biti dovedena u vezu sa sposobnošću moždanog endotela i glija stanica osjetljivih sojeva štakora i miševa da eksprimiraju dovoljnu razinu molekula GHK koje će stimulirati autoreaktivne stanice (154,276).

Ove razlike u sposobnosti stimulacije unutar vrste čine se specifičnim za tkivo jer stanice koje nisu glija u različitim sojeva imaju ekvivalentne sposobnosti za stimulaciju T staničnih linija, ukoliko se antigen-prezentirajuće stanice u odsutnosti takvih signala učine specifičnim za stimulaciju T staničnih linija. Ove činjenice ujedno stvaraju mogućnost da su antigeni GHK-a na glija stanicama i non-glija stanicama različiti, te da takva razlika može biti važna u određivanju T stanicama posredovane, organ specifične autoimunosti.

Rekonstituciju intracelularnog operativnog odjeljka u kome molekule drugog razreda dolaze u kontakt sa antigeničnim peptidima moguće je uspostaviti i na neprofesionalnim antigen prezentirajućim stanicama. Genetski dokazi sugeriraju da u ovom procesu participira humani leukocitni antigen (HLA-DM). Hvatanje peptida u neprofesionalnim APS je uspostavljeno transfekcijom nepromjenljivog lanca i molekule drugog razreda i transfekcijom H-2M, (ekvivalentu DM-a). H-2M heterodimer se pojavio u endosomnom odjeljku a ne na površini stanice. Njegova lokalizacije pri tome nije ovisila o nepromjenljivom lancu. Prema navedenom slijedi da H-2M molekula drugog razreda GHK i nepromjenjivi lanac predstavljaju osnovnu minimalnu komponentu za formiranje kompleksa između molekula drugog razreda GHK i peptida i prema tome za nastanak funkcionalnog odjeljka molekula drugog razreda GHK (111).

U novije vrijeme analizirana je i moguća uloga polisialogangliozida (246) u imunološkom statusu CNS-a. Iz mozga dobiveni složeni gangliozidi su izrazito imunosupresivni *in vivo* te se smatraju jakim imunosupresivima, a dovode se u direktnu vezu sa inhibicijskim učincima na T stanice (103). Međutim učinci gangliozida na APS mogu također doprinijeti imunosupresiji (282) jer oni izrazito specifično suprimiraju konstitutivnu i IFN- $\gamma$  induciranu ekspresiju molekula razreda jedan i molekula razreda dva GHK na astrocitima.

Supresijska aktivnost gangliozida na molekule GHK može objasniti nedostatak molekula razreda dva na stanicama CNS-a općenito te može biti osnova za imunološki privilegiran status CNS-a (7).

Stanice koje eksprimiraju antigene GHK se rijetko nalaze u normalnom mozgu. Međutim, stanice koje podsjećaju na mikrogliju mogu nakon nastupa živčane degeneracije biti inducirane na ekspresiju ovih antigena. U mladih štakora ove stanice pokazuju spontanu ekspresiju antigena razreda jedan koja u gornjem kolikulu još može biti pojačana degeneracijom, nakon uklanjanja

oka. Nasuprot navedenom ekspresija antigena klase dva ne javlja se spontano, te može biti inducirana uklanjanjem oka samo kada je lezija izvedena poslije prvog postnatalnog tjedna kada optički trakt počinje sa mijelinizacijom. Prema navedenom, može se zaključiti da su različiti signali odgovorni za indukciju ekspresije antigena razreda dva (277).

Spomenimo nešto i o ulozi endosoma u procesiranju egzogenih antigena, što uključuje i transferinske receptore. Golubinski citokrom c i kokošji ovalbumin mogu se Fe spojiti na transferin heteroligacijskom tehnikom. Ovakvi konjugati su značajno efikasniji od nativnog Ag u stimulaciji antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> T stanica, ukoliko antigen prezentirajuće stanice ekspimiraju transferinske receptore. Dodatak Fe-transferina može eliminirati pojačan odgovor. Ukoliko se antigen prezentirajuće stanice fiksiraju paraformaldehidom ne dolazi do prezentacije konjugata. To ukazuje na potrebu prerade konjugata za aktivaciju T stanica. Pojačana razina T stanične aktivacije nije bila primjećena kada je antigen prezentirajućim stanicama nedostajao transferinski receptor ili kada je konjugat sadržavao apoenzimni oblik transferina koji se ne veže za receptor. Konjugat je pratio intracelularni put sličan onome za transferin i zadržavao se u vezikulama niske gustoće. Pocijepani konjugati pojavili su se u supernatantima unutar pet minuta sa maksimumom nakon 20 minuta. Pod ovim uvjetima izazvani stanični odgovori na konjugat odgovarao je odjeljku za rani "procesing". Ovo ujedno sugerira da fragmenti antigeničnog peptida mogu biti stvoreni u ranim endosomima bez isporuke ovih antigena prema lizosomima. Prema navedenom jasno je da različite potrebe za "procesingom" ovisne o njihovoj molekularnoj prirodi mogu odrediti mjesto antigenog procesinga (155).

#### 2.1.2.3.2. ULOGA T I B LIMFOCITA U EAE-U

U EAE-u dolazi do pojave specifičnih subpopulacija stanica. Tako je pokazano da imunizacija Lewis štakora sa bazičnim proteinom zamorca inducira pojavu encefalitogeničnih stanica koje koriste V $\beta$ 8.2 tip T staničnog receptora za dominantne rezidue 72 do 89 epitopa bazičnog proteina (34,280), kao i V $\beta$ 6 u njihovom T staničnom receptoru za sekundarnu reziduu epitopa 87 do 99 (171).

Pokazano je da u cerebrospinalnom likvoru stanični infiltrati pokazuju snažnu sklonost u ekspresiji V $\beta$ 8.2 i V $\beta$ 6 gena upravo prije nastupa bolesti, dok je nakon toga njihova sklonost ekspresiji manje prominentna. Ukoliko se stanice iz cerebrospinalne tekućine ekspandiraju u IL-2 to vodi skretanju prema CD8<sup>+</sup> fenotipu stanica sa reduciranom ekspresijom V $\beta$  gena i smanjenim odgovorom na bazični protein zamorca. Restimulacija IL-2 ekspandiranih stanica cerebrospinalne tekućine sa specifičnim antigenom pojačava ekspresiju V $\beta$ 8.2 biljega. Istovremeno u leđnoj moždini postoji sklonost ekspresiji V $\beta$ 8.2 i V $\beta$ 6 koja je bila toliko predominantna u ranoj bolesti da je lako mogla biti detektirana u svježim neselektiranim stanicama premda je ekspanzija



aktiviranih stanica s IL-2 i stimulacija s bazičnim proteinom naglašavala istu sklonost. Sa progresijom EAE-a stanični infiltrati imaju sve manju sklonost prema ekspresiji V $\beta$ 8.2 i V $\beta$ 6. Interesanto je spomenuti da sklonost ekspresiji V $\beta$  nije primijećena u neselektiranim ili IL-2 ekspanziranim T stanicama na periferiji (iz krvi ili limfnog čvora). Ovo ujedno ukazuje na pojavu IL-2 reaktivnih T stanica koje se koncentriraju u leđnoj moždini za vrijeme početka i ranih stadija kliničkih znakova a ujedno nose određene V $\beta$  gene. Tako je npr. u PL/J mišjeg soja acetilirani NH<sub>2</sub>-terminalni nonapeptid MBP Ac1-9 glavni encefalitogenični peptid (279).

Među T staničnim klonovima specifičnim za MBP peptid Ac 1-9 korištenje gena za  $\alpha$  i  $\beta$  T stanični receptor je vrlo restriktivno (280).

Međutim, dva T stanična klona koji dijele specifičnost za peptid i imaju identične T stanične receptore mogu se razlikovati u njihovoj sposobnosti transfera bolesti (236). Zbog toga T stanični receptor na CD4<sup>+</sup> T stanicama sam po sebi ne određuju encefalitogeničnost. Spomenimo da i sekrecija TNF- $\alpha$  također igra ključnu ulogu u patogenezi EAE-a (188,220).

Već ranije smo istakli da je EAE bolest CNS-a izazvana CD4<sup>+</sup> T limfocitima što je dokazano pasivnim prijenosom stanica limfnih čvorova (181) kao i izolacijom encefalitogeničnih T staničnih klonova (260). Ulaskom u CNS encefalitogenični T stanični klonovi secerniraju limfotoksin i uzrokuju EAE (188). Ovdje nešto više želimo reći o njihovoj eliminaciji iz CNS-a.

Nakon izazivanja patogenih učinak encefalitogenične stanice propadaju mehanizmom apoptoze. CD4+V $\beta$ 8.2.+ T stanični klonovi specifični za GMBP 72-89 mogu se koristiti za indukciju akutnog EAE-a u Lewis štakora. Apoptoza upalnih stanica koje infiltriraju CNS najviše je izražena između 4 i 7 dana po transferu encefalitogeničnih T stanica. Najveća frekvencija apoptotičnih stanica može se primjetiti sedam dana po staničnom transferu kada započinje klinički oporavak, dok kontrolna skupina ovalbumin specifičnih stanica pokazuje nivo od 0.8% apoptotičnih stanica. Apoptotični proces selektivno eliminira autoreaktivne stanice iz CNS-a. Postoji selektivni nestanak za bolest relevantnih CD5+V $\beta$ 8.2.+ stanica iz CNS-a tijekom EAE-a. Potom valja istaknuti smanjene frekvencije CNS infiltrirajućih T stanica reaktivnih sa GMBP 72-89 peptidom za vrijeme EAE-a, dok standardni proliferativni odgovor pokazuje gubitak *in vitro* reaktivnosti stanica koje infiltriraju CNS prema ovom peptidu, ali ne prema antigenima koji ne pripadaju CNS npr. ovalbuminu. Interesantno je spomenuti da simultano površno obilježavanje i DNA analiza CNS infiltrirajućih stanica otkrila da je frekvencija V $\beta$ 8.2.+ stanica bila sedam puta veća u apoptotičnoj T staničnoj populaciji nego u normalnoj (ne-apoptotičnoj) T staničnoj populaciji. Uz navedeno spomenimo da nije bilo moguće detektirati recirkulaciju V $\beta$ 8.2.+ stanica prema limfoidnim organima nakon smanjenja njihove frekvencije pojavljivanja u CNS-u. Spomenimo da V $\beta$ 8.2. stanice čine samo 4.6% od T stanica u perifernim limfoidnim organima, te nije vjerojatno da stanice domaćina značajno doprinose V $\beta$ 8.2.+ populaciji u CNS-u. Predloženo je nekoliko hipoteza koje opisuju nastanak apoptoze. To

je povišenje endogenih kortikosteroida, anti-klonotipsko T stanično ubijanje i aktivacijom inducirana stanična smrt. Od navedenih hipoteza najvjerojatnijom se čini posljednja (248) što ukazuje na značaj ovih stanica u širenju lezija.

Osim navedenog spomenimo i skorašnje okriće da autoimuni T stanični odgovor može biti usmjeren i na nemijelinske autoantigene. Time je srušena dosadašnja hipoteza o dominantnoj ulozi mijelinskih antigena u provociranju autoimunog T staničnog odgovora. Tako je za Lewis štakora uspostavljen model autoimunog panencefalitisa i uveoretinitisa inducirano pomoću proteina S100 $\beta$ . To je protein dobiven iz astrocita koji ima sposobnost vezivanja kalcija. Lewis štakori stvaraju snažan imunološki odgovor vezan uz gene drugog razreda GHK koji je usmjeren na imunodominantni epitop S100 $\beta$  koji sadrži aminokiseline 76-91. Adoptivni prijenos S100 $\beta$  specifičnih T staničnih linija inducira teški upalni odgovor u CNS-u, ali samo minimalne neurološke disfunkcije netretiranih singeničnih primaoca. Nesposobnost S100 $\beta$ -specifičnih T staničnih linija da inducira tešku bolest povezana je sa smanjenim ulaskom ED1+ makrofaga u CNS u usporedbi sa nalazom u EAE-u uzrokovanom transferom MBP specifičnih T staničnih linija. Štoviše, za razliku od MBP specifičnih T staničnih linija, S100 $\beta$  specifične T stanične linije ne pokazuju citotoksičnu aktivnost *in vitro*. Značajne histopatološke promjene prisutne su u čitavom CNS-u te što je osobito važno u uveji i retini oka za razliku od predominantne upalne reakcije u leđnoj moždini nakon transfera MBP specifičnih limfocita. S obzirom na distribuciju lezija u sivoj i bijeloj tvari CNS-a može se reći da transfer S100 $\beta$  specifičnih T staničnih linija izaziva eksperimentalni autoimuni panencefalitis. Ovo je ujedno i dokaz da nemijelinski autoantigeni CNS-a mogu započeti patogeni autoimuni T stanični odgovor (125,140).

O značaju B stanica u EAE-u nešto više smo spomenuli u poglavlju 2.1.2.1..

#### 2.1.2.4. ULOGA CITOKINA U EAE-U

Kao što je već rečeno posebna uloga u aktivaciji ili suprimiranju APS imaju različiti citokini. Među njima posebnu ulogu ima IFN- $\gamma$ . To je citokin koji je primarno definiran na osnovu svoje antivirusne aktivnosti. Ovaj citokin ima mnogobrojna djelovanja od kojih bi aktivacija makrofaga i indukcija antigena GHK, te značaj u udomljavanju T limfocita mogu imati ključnu ulogu u upalnom procesu u CNS-u za vrijeme EAE-a. Pokazano je da se IFN- $\gamma$  u povećanoj količini producira u CNS-u tijekom EAE-a. Njegova produkcija grubo je povezana sa težinom bolesti što je dokazano pojavom specifične m-RNA ekspresije za IFN- $\gamma$  (199) te porastom broja IFN- $\gamma$  secernirajućih stanica (167).

Povećana produkcija IFN- $\gamma$  unutar CNS-a prisutna je za vrijeme imunofarmakološki induciranog relapsa EAE-a, zatim nakon tretmana sa sulfosalazinom (44) ili sa niskom dozom ciklosporina A (167). Značaj IFN- $\gamma$  u smislu promoviranja upale podržavaju činjenice da su encefalitogenične stanice TH1 fenotipa kao i poznati učinci IFN- $\gamma$  u smislu pojačanja upale. Međutim druge studije su pokazale da tretman sa antitijelom na IFN- $\gamma$  dovodi do egzacerbacije EAE-a (21), kao i da direktna injekcija visokih doza IFN- $\gamma$  u CNS prije nastupa EAE-a ukida bolest (266). Objašnjenje za ove raznolike učinke je ovisnost o vremenu, mjestu aplikacije i dozi. Npr. tretman štakora imuniziranih u smislu istraživanja eksperimentalnog alergijskog neuritisa sa antitijelima na IFN- $\gamma$  za vrijeme imunizacije daje kompletno različite učinke u usporedbi sa tretmanom prije nastupa bolesti (240).

Imunološke reakcije koje se javljaju u CNS-u i imunološke komponente neophodne za lokalne imunološke odgovore variraju tijekom različitih upalnih stanja u CNS-u. Citokini producirani za vrijeme upale u CNS-u mogu se u velikoj mjeri stvarati iz mononukleara mobiliziranih iz sistemnog odjeljka. Međutim, mogu biti upletene i stanice CNS-a. Tako mikroglija i astrociti mogu producirati veliki broj citokina nakon njihove aktivacije (56). Stoga citokini početno definirani u imunološkom ili hematopoetskom sistemu mogu biti prisutni i u neuralnim stanicama. Takve molekule mogu biti identične onima koji se stvaraju u koštanoj srži i cerebralnim neuronima (npr. makrofagni čimbenik koji stimulira kolonije) (169) ili se razlikuju s obzirom na za aminokiselinsku sekvenciju, ali dijele strukturne komponente dozvoljavajući im da djeluju na istom receptoru (10). Čini se da neuronske IFN- $\gamma$ -slične molekule pripadaju ovoj drugoj grupi citokina (141).

Nedavno je pokazano da se u normalnom imunološkom odgovoru CD4+ T limfociti diferenciraju u efektorske populacije koje produciraju ograničen set citokina i izvršavaju specifične funkcije (162).

CD4+ T pomoćničke stanice tipa 1 (TH1) posreduju u reakcijama kasne preosjetljivosti i upalnim odgovorima, dok citokini producirani iz TH2 T stanica posreduju u staničnim funkcijama prilikom produkcije antitijela. TH1 limfociti koji igraju glavnu ulogu u reakcijama kasne preosjetljivosti produciraju IL-2 i IFN- $\gamma$ , dok su TH2 limfociti upleteni u antitijelima posredovane odgovore te produciraju IL-4, IL-5 i IL-10 (60). Slično tome autoimune bolesti mogu se podijeliti u one koje su posredovane TH1 stanicama sa primarno upalnim manifestacijama i bolesti posredovane stanicama TH2 tipa čije djelovanje predstavlja reakciju na imune komplekse koji sadrže antitijela (80).

IL-4 se pokazao najdominantniji u diferencijaciji djevičanskih T stanica prema TH2-fenotipu (137). Ujedno je pokazano da prilikom korištenja superantigena kao antigenog modela, davanje IL-4 dovodi do produkcije IL-4 na striktno antigen specifičan način (204).

I u EAE je TH1-TH2 paradigma naišla na plodno tlo. Tako je pokazano da MBP-specifične linije ili klonovi koji su sposobni transferirati EAE također pripadaju TH1 subtipu producirajući limfotoksin i IFN- $\gamma$  (217), dok TH2 stanice ne transferiraju EAE (7) sugerirajući da funkcionalna diferencijacija u TH1 fenotip nakon prepoznavanja encefalitogeničnih mijelinskih antigena predstavlja ključni moment u indukciji EAE-a. Interesanto je spomenuti da štakorski encefalitogenični peptid MBP 63-88 može inducirati EAE u štakora sa različitim haplotipovima. MHC haplotipovi osjetljivih štakorskih sojeva pokazuju sklonost prema odgovoru TH1 tipa, dok MHC haplotipovi rezistentnih štakora pokazuju sklonost TH2 odgovoru sa produkcijom IL-4 prilikom odgovora na peptid (168).

Značajni zaključak iz ovih studija je da set citokina produciranih prilikom odgovora na mijelinske autoantigene za vrijeme rane aktivacije limfocita može utjecati na ishod autoimune reakcije, te da genetski uvjetovan utjecaj GHK na autoimunu bolest može djelomično biti usmjeren i citokinskim profilom odgovarajućih autoreaktivnih stanica.

Za vrijeme monofaznog EAE-a u Lewis štakora zajedno sa razvojem neurološkog deficita i upalom CNS-a određeni citokini pojavljuju se u nizu. Tako koristeći mRNA citokinsku detekciju pomoću in situ hibridizacije pokazano je da se prvi pojavljuju TNF- $\beta$  i IL-12. Ovo se vremenski poklapa sa imunohistokemijski detektibilnom upalom u CNS-u kratko prije nastupa kliničkih znakova (102)

Kasnije za vrijeme akutnog stadija bolesti pojavljuju se IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  a njihov nivo ekspresije prati težinu kliničkih znakova i stupanj upalne stanične infiltracije (101). TGF- $\beta$  dostiže svoj vrhunac prije nastupa opravka (101). Ovo je slučaj također kod miša sa EAE-om (119).

Astrociti su glavne glija stanice CNS-a koje su tradicionalno smatrane stanicama koje podržavaju neurone. Međutim odnedavno se pokazalo da imaju udjela u imunološkim zbivanjima unutar mozga. Mogu biti stimulirani pa se smatraju imunokompetentnim stanicama u CNS-u (63,267).

Među brojnim imunološkim funkcijama astrociti mogu biti stimulirani na ekspresiju molekula drugog razreda GHK nakon izlaganja IFN- $\gamma$  ili virusima (58) te mogu prezentirati antigene T staničnim klonovima na način ovisan o restrikciji GHK-om nakon ekspresije molekula drugog razreda GHK (62). Genska ekspresija molekula drugog razreda GHK može u astrocitu biti inducirana IFN- $\gamma$  ili virusima, a pojačava je TNF- $\alpha$  (153).

Citokini potom mogu regulirati sposobnost astrocita da funkcioniraju kao APC stanice u CNS-u. Astrociti mogu inducirati ekspresiju slijedećih citokina: IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, granulocitnog makrofagno kolono stimulirajućeg faktora (eng. granulocyte colony macrophage stimulating factor-GM-CSF)(57). Među stimulacijskim čimbenicima koji stimuliraju citokinsku produkciju astrocita spadaju lipopolisaharid (LPS), Ca<sup>+2</sup> ionofore, virusi te citokini IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . TNF- $\alpha$  je citokin koji se smatra ključnim u pojačavanju upalne demijelinizacije i intracerebralnih imunoloških odgovora. Među ostalim TNF- $\alpha$

inducira ekspresiju molekula razreda jedan GHK na astrocitima (136) inducira ekspresiju ICAM-1 na humanim fetalnim astrocitima (66), pojačava ekspresiju antigena drugog razreda GHK induciranu IFN- $\gamma$  /ili virusima na astrocitima (153), te stimulirati sekreciju IL-6 u astrocitima (16), stimulira proliferaciju adultnih astrocita (219), uzrokuje oštećenje mijelina (218) i lizu oligodendrocita (202).

Astroцити također eksprimiraju visokoafinitetne receptore za TNF- $\alpha$  (15), ali i produciraju TNF- $\alpha$  što govori o mogućnosti autokrinog puta stimulacije za ove stanice. Imunohistološke studije pokazale su da astroцити Lewis štakora nakon tretmana  $\gamma$ -IFN-om ili virusom pokazuju znatno više razine ekspresije antigena drugog razreda GHK nego astroцити dobiveni iz BN štakora. Ova hiperindukcija antigena drugog razreda GHK u za EAE-osjetljivog soja štakora pokazuje identične obrasce indukcije antigena drugog razreda. Ekspresija antigena drugog razreda GHK na astrocitima može doprinijeti antigenoj prezentaciji u CNS-u i tako pojačati intracerebralni imunološki odgovor. Produkcija citokina doprinosi dakle razvoju autoimunih bolesti (226), a njihova aberantna ekspresija može biti čimbenik u započinjanju autoimunosti. Interesantna je činjenica da su geni za TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  mapirani unutar gena GHK-a (166). Budući da su mnoge bolesti povezane sa genskim produktima razreda jedan i razreda dva GHK, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  su kandidati za citokine upletene u autoimunost. Pokazano je da astroцити nesrodnog štakorskog Sprague Dawley soja secerniraju TNF- $\alpha$  prilikom odgovora na LPS, IFN- $\gamma$ +LPS, i IFN- $\gamma$ +IL1 $\beta$  (41).

Limfotoksin i TNF- $\alpha$  predstavljaju važne upalne citokine koji su genetski povezani, djeluju na isti receptor, ali su različito regulirani i producirani u različitim tipovima stanica. Limfotoksin produciraju limfociti, dok se TNF- $\alpha$  značajno produciraju u stanicama makrofagnih linija (207).

Brojne opservacije podržavaju patogenu ulogu ovih citokina u EAE-u. U PL/J miša MBP-reaktivni T stanični klonovi transferiraju EAE producirajući visoku razinu limfotoksina (187).

Poznato je da antitijelo na limfotoksin i TNF- $\alpha$  prevenira transfer EAE-a (208). Usto TNF- $\alpha$  oštećuje oligodendrocite (222).

IFN- $\gamma$  sam ne inducira produkciju TNF- $\alpha$  na astrocitima, ali pojačava LPS-om induciranu TNF- $\alpha$  sintezu. Najpotentnija produkcija TNF- $\alpha$  je primjećena nakon što su astroцити 8-12 sati prije izlaganja LPS-u ili IL-1 $\beta$  bili izvrgnuti djelovanju IFN- $\gamma$  što ukazuje da isti stvara primarni signal u astrocitu. Ujedno je pokazano da su astroцити EAE-rezistentnih BN štakora refrakterni na učinak IFN- $\gamma$  u smislu pojačanja LPS-om inducirane produkcije TNF- $\alpha$ . Ovaj soj štakora, osim toga producira vrlo niske nivoe TNF- $\alpha$  u odgovoru na IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ . Nasuprot njima, astroцити EAE osjetljivog Lewis soja pojačano reaguju na indukcijski signal LPS-om i izuzetno su osjetljivi na IFN- $\gamma$  koji ih "priprema" za produkciju TNF- $\alpha$ . Uz navedeno astroцити Lewis štakora produciraju velike količine TNF- $\alpha$  kada su stimulirani IFN- $\gamma$  i IL- $\beta$ . Prema navedenom jasno je da se astroцити Lewis i Brown Norway (BN) soja štakora različito regulirani iako se stimuliraju LPS-om i IFN- $\gamma$  a što ovisi o TNF-a genskoj ekspresiji (41).

U EAE-u bolesti koja je osobita po perivaskularnim infiltratima mononukleara glavne grupe stanica čine T stanice i makrofagi. Aktivirane T stanice u Lewis štakora mogu poslužiti kao endogeni izvor IFN- $\gamma$  te mogu pripremiti astrocite na sekreciju TNF-a. Infiltrirajući makrofagi i rezidentni astrociti/mikroglija predstavljaju izvor IL-1 koji bi mogao reagirati s IFN- $\gamma$ -”pripremljenim” astrocitima što rezultira produkcijom TNF-a. Produkcija TNF-a od strane astrocita Lewis štakora prilikom odgovora na IFN- $\gamma$  i IL-1 može omogućiti ulazak antigen nespecifičnih upalnih stanica u CNS povećavajući pritom permeabilnost endotelnih stanica (28), ali i pojačavaju ekspresiju adhezijskih molekula na moždanom endotelu i astrocitima (66,184).

Osim toga astrocitna produkcija TNF-a može ubiti ili oštetiti susjedne oligodendrocite (202) i direktno oštetiti mijelinske ovojnice (218) doprinoseći tako demijelinizaciji (99).

Astrociti tretirani proinformativnim citokinom TNF- $\alpha$  ekspimiraju mRNA za adhezijsku molekulu E-selektin, VCAM-1 i ICAM-1 kao i njihove korespondirajuće proteine. TNF- $\alpha$  tretirani astrociti ekspimiraju adhezijski protein na monocitima koji se prepoznaje s monoklonskim antitijelom IG9. Ovi nalazi ukazuju da astrocitna ekspresija adhezijskih molekula može olakšati migraciju leukocita i doprinijeti u razvoju bolesti.

Posebnu ulogu u upalnim procesima CNS-a ima i IL-1 (51). To je protein od 12-33 kD sa mnogobrojnim biološkim funkcijama (52). Produciraju ga monociti koji su fagocitirali, zatim astrociti (64) i mikroglija (76). Aktivnost IL-1 je detektirana u CNS-u eksperimentalnih životinja u kojih se pojavilo neurološko oštećenje (75).

Prisutnost IL-1 u cerebrospinalnoj tekućini ne nastaje zbog IL-2 ili kontaminacije cerebrospinalnog likvora krvlju, te je intracerebralnog porijekla, jer je aktivnost unutar cerebrospinalne tekućine značajno veća nego u plazmi. Prisutnost IL-1 u CNS-u može u životinja stvoriti predispoziciju za razvoj autoagresivnih promjena. Pokazana je ujedno korelacija između nivoa IL-1 u cerebrospinalnoj tekućini, kao i totalnog broja leukocita u cerebrospinalnoj tekućini za vrijeme relapsirajuće faze CREAE-a. IL-1 je poznat kemotaktični faktor za limfocite (159), a ujedno djeluje na vaskularni endotel koji postaje selektivno adhezivan za leukocite (18). Ovi procesi mogu imati važnu ulogu u “prijelazu” limfocita u CNS iz periferne krvi i doprinose stvaranju gustih upalnih nakupina za vrijeme kroničnog stadija CREAE-a (241).

IL-1 također ima važnu funkciju u pojačavanju T stanične aktivacije, B stanične proliferacije i stvaranja antitijela, a svi ti čimbnici sudjeluju u imunopatološkim zbivanjima u CREAE-u. Vjerojatni izvor IL-1 u cerebrospinalnoj tekućini su makrofagi u meningama, parenhimu mozga i leđnoj moždini. Oni su prisutni u velikom broju za vrijeme kroničnog stadija EAE-a. Poznato je da IL-1 mogu producirati astrociti. Djelomično purificiran IL-1 je snažan mitogen za astrocite, ali nema učinka na oligodendrocite.

Astrociti imaju sposobnost brze proliferacije nakon intracerebralnog oštećenja. To je vidljivo u MS-i gdje su astroglijalni ožiljci često prisutni oko demijelinizirajućih plakova. Među stanicama koje imaju sposobnost proizvodnje

IL-1 spomenimo mikrogliju (76), te prisutnost molekula drugog razreda GHK-a na stanicama mikroglije, posebno u području plakova u MS-i (274).

Kao citokin nedavno je opisan i IL-12 koji promovira diferencijaciju TH-1 tipa stanica i produkciju IFN- $\gamma$  (39). Ova osobitost u kombinaciji sa ekspresijom u CNS-u za vrijeme kliničkih znakova koji predhode EAE-u i raširenoj upali u CNS-u sugeriraju ulogu ovog citokina u upali CNS-a.

U EAE-u Lewis štakora kratko prije nastupa oporavka od akutnog EAE-a javlja se TGF- $\beta$  m-RNA (102), a povećan broj stanica obilježenih kao producenti TGF- $\beta$  javljaju se u leđnoj moždini nakon stvaranja oralne tolerancije u EAE-u (121). Čini se da ovaj citokin produciraju efektorske CD4+ i CD8+ T stanice koje se javljaju poslije oralne tolerancije s MBP-om (112,156).

Ujedno je primjećeno da Lewis štakori sa haplotipom koji prenosi rezistenciju također pokazuju restriktivni odgovor vezan za peptid MBP 63-88 sa angažiranjem CD8+ stanica koje produciraju TGF- $\beta$ . Ove peptid specifične TGF- $\beta$  producirajuće T stanice mogu djelovati immunosupresivno i posredovati u EAE rezistenciji. Interesantno je da u drugih haplotipova GHK, oralna tolerancija sa drugim peptidima također mobilizira CD8+ T stanice koje produciraju TGF- $\beta$  (156). Funkcionalno usmjereniji eksperimenti pokazali su da tretman štakora (211) ili miša (128) sa TGF- $\beta$  poboljšava stanje u EAE-u, dok *in vivo* blokiranje sa antitijelima protiv TGF- $\beta$  pogoršava bolest (190).

Navedene činjenice stoga podržavaju hipotezu o limitirajućoj ulozi TGF- $\beta$  u EAE-u.

Uloga IL4 je manje jasna. Teorijski IL-4 može reagirati sa TH1 stanicama koje produciraju TNF- $\beta$  i IFN- $\gamma$  kao što je pokazano za CD4<sup>+</sup> supresijske stanice koje prepoznaju T stanični receptor encefalitogeničnih stanica (113).

Nadalje vjerojatno je da produkcija ovog citokina može pridonijeti u produkciji autoantitijela što može biti bitno za daljnji razvoj bolesti. Ekspresija IL-4 u EAE-u Lewis štakora nije pokazala jasno razdvojene odnose prema kliničko-patološkim nalazima (102).

Imunosupresivnu ulogu u EAE-u mogao bi imati i IL-10. To je endogeni citokin koji se producira po aktivaciji CD4+TH2-tipa stanica. U EAE-u m-RNA ekspresija javlja se u CNS-u za vrijeme oporavka (118,205). Najveća intracerebralna produkcija IL-2/IFN- $\gamma$  koja je prisutna za vrijeme egzacerbacijskog stadija EAE-a praćena je s dramatičnim povećanjem IL-10 mRNA ekspresije za vrijeme oporavka, zajedno sa slabljenjem citokinske ekspresije TH-1 tipa. Razina IL-10 mRNA ostaje povišena tijekom stadija oporavka. Iz navedenog se može zaključiti da sinteza IL-10 ima ključnu ulogu u prirodnom pojavljivanju spontanog slabljenja i mogućoj dugotrajnoj regulaciji bolesti. Ova selektivna pojačana intracerebralna produkcija "TH2-tipičnih citokina (IL-4 i IL10)" povezana je sa spontanom oporavkom od bolesti. Štakori tretirani IL-10 pokazuju signifikantno oslabljen klinički tijek EAE-a, što se može pratiti u promjenama stadija bolesti, tjelesne težine, trajanju bolesti i

incidencijom mortaliteta. No, *ex vivo* analiza MBP-specifičnih T stanica nije pokazala značajne promjene između IL-10 tretiranih životinja i kontrola u proliferativnom odgovoru u lokalnim limfnim čvorovima ni i u slezeni što govori da *in vitro* rezultati ukazuju na odsutnost djelovanja IL-10 na MBP specifičnu T staničnu proliferaciju. Nalaz da IL-10 suprimira produkciju TNF-a u encefalitogeničnih TH1 stanica *in vitro* ipak sugerira djelotvoran učinak IL10 na tijek bolesti. Osim toga IL-10 vjerojatno pojačava B stanični/Th2-tipični odgovor sa simultanom redukcijom Th1 tipa stanica *in vitro*. Eksperimenti pokazuju da IL-10 suprimira encefalitogeničnu sposobnost TH1 IFN- $\gamma$  producirajućih stanica više nego IL-4 (261), te da suprimira aktivaciju i učinke TH1 stanica (97).

Istaknimo i inhibicijski učinak IL-10 na produkciju TNF-a, čime se mogu ublažiti klinički znakovi bolesti. Spomenimo i značajno povišenu razinu MBP-specifičnih antitijela u životinja tretiranih s IL-10 (205).

Svi ovi rezultati ukazuju na značajnu ulogu mnogih citokina, koji se akumuliraju unutar cerebrospinalne tekućine tijekom EAE-a.

Globalno promatrano IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  djeluju u smislu razvoja bolesti, dok TGF-B i IL-10 ograničavaju razvoj bolesti.

## 2.2. ULOGA NEUROENDOKRINOG SUSTAVA U KONTROLI IMUNOLOŠKOG ODGOVORA

Autoimune bolesti ovise o većem broju čimbenika. Postavljena je hipoteza o dvije grupe ključnih gena koji su neophodni za razvoj autoimunih bolesti: geni koji kodiraju abnormalno povećanu reaktivnost imunološkog sistema i geni koji kodiraju primarnu osjetljivost ciljnog organa (u organ specifičnoj bolesti) ili ciljne strukture (u sistemnim autoimunim bolestima) koja je podvrgnuta napadu od strane humoralnih i/ili staničnih efektorskih mehanizama. Definitivni rezultat određene bolesti ovisi o dodatnim modulacijskim čimbenicima. Među njima se ističu steroidni hormoni, posebno glukokortikoidi. Treba uzeti u obzir da osim egzogenih glukokortikoida u farmakološkim dozama i endogeno producirani, fiziološki nivoi glukokortikoida ispoljavaju snažne imunomodulacijske učinke, pri čemu je njihova produkcija regulirana i signalima iz imunološkog sistema (273,79).

Dvosmjerne veze između imunološkog i neuroendokrinog sistema utječu specifično na fiziološke aktivnosti kao i tkivna lokalizacija limfocita, humoralni odgovor, sekrecija hormona između hipotalamusa i hipofize i prijenos živčanih signala. Na komunikaciju između dva sistema ukazala je prisutnost inervacije imunoloških organa, učinci neuromedijatora na stanice imunološkog sistema, te neuroendokrini odgovori na pojedine citokine. Definirana su dva obrasca odgovora na neuroimune medijatore, kojima se razlikuju direktne promjene u



staničnoj membrani i mnogo složenije stanje diferencijacije i adaptacije, koja uvjetuje prag i prirodu reakcije na prateće stimuluse.

Analiza embriološkog razvoja i fizioloških funkcija neuroendokrinog i imunološkog sistema sisavaca nije otkrila sličnosti koje bi potvrdile postojanje dvosmjerne veze između sistema. Međutim, promjene u imunološkom sistemu i odgovori izazvani u neuroendokrinnoj aktivnosti kao i pretpostavljeni neuralni utjecaji specifičnih imunih citokina govore o tome da je svaki od ovih sistema sposoban prepoznati signaliranje drugog (17).

Stanice imunološkog sistema koje ulaze u CNS imaju iste receptore, te proteine na staničnoj površini, zatim identične hormone, neuropeptide i citokine sposobne za prijenos poruke u mreži između neuroendokrinog i imunološkog sistema (78). Nadalje, utvrđeno je da u limfatičkim organima simpatički i senzorički živčani završeci završavaju na ili veoma blizu limfocita, makrofaga i mast stanica (1). Simpatički živci koji inerviraju timus stvaraju se za vrijeme embrionalnog razvoja prije timusne faze razvoja i tkivne raspodjele stanica za imunološke funkcije (1), a približno 65% intestinalnih mast stanica glodavaca je u kontaktu sa subepitelnim neuronima koji produciraju peptide (234).

Simpatički senzorni neuroni slezene, timusa i limfnih čvorova sadrže specifične neuropeptide. Tako enkefalin sa neuropeptidom Y dolazi sa simpatičkim živcima, a substancija P i CGRP (eng. calcitonin gene-related peptide) nalaze se u senzoričkim živcima (1). Inervacija imunoloških organa omogućava, stoga lokalnu isporuku neuropeptida i drugih neuromedijatora u visokim koncentracijama. Recipročni ulazak imunih stanica u nervni sistem odnosi se na neograničen prolaz i boravak monocita i makrofaga, te rijetki ulazak T stanica (90). Nestimulirane T stanice obično napuštaju nervni sistem nakon nekoliko sati, ali mogu u njemu ostati danima ako specifično reagiraju sa antigenima CNS-a (92).

Razina ekspresije mnogih zajedničkih receptora, proteina na staničnoj površini, te medijatora je prilično visoka u neuroendokrinom i imunološkom sistemu (1). Adhezijska molekula živčanih stanica N-CAM (eng. neural cell adhesion molecule) je član imunoglobulinske supergenske familije tipa I, odnosno integralnih membranskih adhezivnih glikoproteina, ona svojim primjerom ukazuje na homotipske i heterotipske stanične interakcije u oba sistema. Naime, iako je N-CAM eksprimiran predominantno u nervnom sistemu, a CD4 i ICAM-1 i ICAM-2 u imunološkom sistemu, postoji i recipročna ekspresija CD4 molekule u CNS-u, kao i prisustvo N-CAM na NK (eng. natural killer) stanicama i T stanicama, koje pokazuju nerestriktivnu citotoksičnu aktivnost (48,135).

Nadalje slična zajednička ekspresija u živčanom tkivu, te u tkivu imunološkog sistema ustanovljena je i za Thy-1, OX2, koji su pripadnici imunoglobulinske superfamilije, te za neke glikoproteine bogate leucinom.

Stvaranje neuropeptida u timocitima, limfocitima i drugim leukocitima, te produkcija monokina i limfokina u neuroendokrinim stanicama dokazana je u nekoliko životinjskih vrsta. Oksitocin i vazopresin su detektirani u epitelnim stanicama štakorskog timusa, zajedno sa interleukinom 1 (IL-1). Ovdje su oni

kolokalizirani u istim stanicama, dok se u mozgu nalaze u različitim stanicama (203).

Imunohistokemijske studije otkrile su i prisustvo horionskog gonadotropina (hCG) u normalnom humanom timusu i timusnom tumoru, ali se njegova pojava razlikovala od pojave u tkivu trofoblasta (69). Pritom je  $\beta$  lanac humanog horionskog gonadotropina pronađen u mnogo većem broju od  $\alpha$  lanca u normalnim timusnim epitelnim stanicama, dok su gotovo sve pozitivne tumorske stanice imale humani horionski gonadotropin sa  $\alpha$  lancom. Nasuprot tome, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) u štakorskim epitelnim stanicama i somatostatin 28 (SOM28) u epitelnim stanicama, bili su imunohistološki i kromatografski identični odgovarajućim peptidima (81), dok je autentična mRNA za SOM također detektirana u štakorskom timusu (70).

Analizom aminokiselinske sekvencije mRNA i/ili komplementarne DNA (cDNA) strukture potvrđena je i identičnost limfocitnog adrenokortikotropnog hormona (ACTH)(177), limfocitnog hormona rasta (GH) (268) i eozinofilnog vazointestinalnog polipeptida (VIP) i supstancije P (SP) (269) sa onima živčanog porijekla.

Produkcija imunih citokina u živčanom stanicama je podložna genetskoj restrikciji i izazvana je specifičnim stimulusima. Bakterijski lipopolisaharid (LPS), IL-1 i IFN- $\gamma$  induciraju ekspresiju mRNA za TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i TGF- $\beta$  u kultiviranim astroglialnim stanicama i stanicama mikroglije. Sekrecija ovih citokina odgovara po količinama onim u encefalitisu, multiploj sklerozi i stečenoj imunodeficijenciji AIDS(eng. acquired immunodeficiency syndrome) (41,42,221,264,267).

Sam LPS inducira visoku razinu TNF-a i IL-6 gena i proteinsku ekspresiju u BN štakora, ali ne u Lewis štakora (42). "Priming" učinak IFN- $\gamma$  u ovim pokusima viđen je samo u Lewis štakora. Razlike u citokinim odgovorima dobro su korelirale sa poznatom većom osjetljivošću Lewis štakora u odnosu na BN štakora ka izazivanju autoimunog encefalomijelitisa (129).

Jedan od hormona, koji se javlja u neuroendokrinoj petlji je i somatostatin, čije učinke smo analizirali u ovom radu.

## 2.2.1. SOMATOSTATIN

### 2.2.1.1. LOKALIZACIJA I DJELOVANJE U CNS-U

Somatostatin (SOM) ili somatotropin release inhibiting factor (SRIF) je prvi otkriveni hipotalamički tetradekapeptid s inhibitornim djelovanjem na hormon rasta. Brazeau i suradnici otkrili su ga 1973. godine (26). Pojavljuje se kao tetradekapeptid SOM-14, oktapeptid SOM-8, te u obliku njihovog zajedničkog prekursorskog proteina od 15 Kd (122).

Somatostatin je pronađen u raznim djelovima centralnog i perifernog živčanog sustava, ali i u drugim organima u tijelu (122). Jedna četvrtina ukupne

količine somatostatina nalazi se u hipotalamusu (31). Tu je najviše zastupljen u živčanim završecima i krajnjim završecima vlakana arkuatne, supraoptičko-hijazmatičke i paraventrikularne jezgre (67). Somatostatin se nalazi u živčanim vlaknima eminencije medijane kao i u suprahijazmatičkoj, arkuatnoj i ventromedijalnoj jezgri. Značajne ekstrapiramidne lokalizacije somatostatina nalaze se u jezgrama povezanim sa ekstrapiramidnim sustavom, zatim u vaskularnom tijelu, pinealnoj žlijezdi, neokorteksu i nižim dijelovima moždanog debla (47). Osim navedenih lokalizacija somatostatin je dokazan u primarnim senzoričkim živcima i perifernom senzoričkom aferentnom putu (32). U spinalnim ganglijima je prisutan u ganglionu nervi trigemini, te u substanciji gelatinozi produljene moždine, a postoji i u nekim senzoričkim živcima u udaljenim organima (53). Somatostatin imunoreaktivne strukture (SOM-I) prisutne su u nepiramidnim neuronima izokorteksa (27), i u leđnoj moždini štakora (206). Distribucija SOM-I struktura je primjećena u većini regija sive tvari (95).

Sinteza i sekrecija somatostatina regulirana je poput ostalih peptida. Tako melatonin povećava koncentraciju hipotalamičkog somatostatina (200), a cisteamin inducira njegovu depleciju iz izoliranih nervnih završetaka (sinaptosoma) štakorskog mozga *in vitro*. Od neurotoksina, kapsaicin značajno reducira sadržaj somatostatina iz štakorskih rezova leđne moždine (dorzalni rogov). Oslobođanje somatostatina iz štakorskih rezova leđne moždine, stimulirano kalijem, inhibira gama-aminomaslačna kiselina. Kalcijum ovisno oslobađanje somatostatina iz leđne moždine, kao odgovor na povišene ekstracelularne koncentracije uz tretman kapsaicinom, podržavaju hipotezu o somatostatinu kao neurotransmiteru u leđnoj moždini. Kuraishi i suradnici demonstrirali su oslobađanje somatostatina prilikom obrade osjetnih informacija (8,262).

Treba istaknuti da stres dovodi do značajnog otpuštanja somatostatina u hipofizalni portalni krvotok, što se očituje ukidanjem dnevnog ritma u sekreciji hormona rasta (253). Ovaj podatak trebalo bi uzeti u obzir prilikom analiziranja mehanizama na koje stres i hormon rasta imaju utjecaja (30,61).

Uloga hipotalamičkih dopaminergičnih putova u kontroli somatostatina nije potpuno razjašnjena. Pojedini autori ističu inhibicijsku ulogu, dok drugi demonstriraju dopaminom stimulirano oslobađanje iz hipotalamičkih stanica i/ili hipotalamičkih sinaptosoma. Stimulacijsko djelovanje dopamina je potvrđeno povećanjem sekrecijskog udjela i koncentracijom somatostatina u štakorskoj hipofizalnoj portalnoj krvi poslije aplikacije dopamina. Dopamin može imati stimulacijsku ulogu u kontroli oslobađanja somatostatina iz perfundiranih intaktnih hipotalamusa preko D2 receptora. Tada se povećava molarni omjer SS-28 i SS-14 u oslobođenom materijalu (14). Električna stimulacija mediobazalnog hipotalamusa praćena je pojačanom simpatičkom aktivnošću. U istom području je pronađena povećana koncentracija somatostatina koji izgleda može dovesti do pada simpatičke aktivnosti vjerojatno mijenjajući aktivnost kateholamina (29,61). Ovi podaci zajedno sa onima koji govore o

prisutnosti somatostatina u malim stanicama trunkusa simpatikusa sugeriraju modulacijsku ulogu u ovom dijelu živčanog sistema (120).

U prilog hormonskim djelovanjima somatostatina govori njegova sekrecija iz hipotalamusa u hipotalamo-hipofizni potalni krvotok, a potom djelovanje na udaljene stanice hipofize. Djelujući direktno na stanice hipofize somatostatin inhibira lučenje hormona rasta, prolaktina i tireotropnog hormona. U kontroli sekrecije hormona rasta sudjeluje još čimbenik oslobađanja hormona rasta (eng. growth hormone releasing factor-GRF) i inzulinu sličan čimbenik rasta I (eng. insulin like growth factor-IGF I) ili somatomedin C. Inzulinu sličan čimbenik rasta smanjuje sekreciju ovčjih fetalnih i neonatalnih stanica induciranu GRF-om (225). Promjena koncentracije hormona rasta u hipotalamičkom krvotoku mogla bi biti mogući regulator lučenja somatostatina iz eminencije medijane, jer porastom koncentracije hormona rasta dolazi do porasta koncentracije njegovog inhibitora. U prilog tome govori i pad razine hipotalamičkog somatostatina u hipofizektomiranih životinja (252). Nakon prestanka davanja somatostatina u dozi većoj od  $10^{-10}$  M u *in vitro* modelu primjećen je "rebound fenomen", odnosno sekrecija hormona rasta postaje veća od prijašnje. Uzrok je vjerojatno otpuštanje hormona rasta koji se pohranio u stijenci nakon djelovanja somatostatina. Poslije davanja malih doza somatostatina ovaj fenomen nije primjećen jer manje doze čini se blokiraju i sintezu i sekreciju hormona rasta (189).

U prilog neurotransmiterskim svojstvima somatostatina govori njegova raspostranjenost u pojedinim anatomskim putevima, sposobnost mijenjanja elektrofizioloških procesa u živcima, kao i otpuštanje somatostatina iz okončina živčanih vlakana što ovisi o koncentraciji  $K^+$  i  $Ca^{+2}$  (138). Somatostatin je parcijalni agonist i/ili antagonist opijatnih receptora. Ovaj učinak se ne ostvaruje kompeticijom jer su receptori za vezanje opijata i somatostatina različiti (259). U štakora injiciranje somatostatina ima stimulacijske učinke na monoaminergične neurone (71). U moždanom deblu nekoliko nukleusa sadrži somatostatinergične i kateholaminergične strukture sugerirajući interakciju između dva sistema. U štakora periakveduktalna siva substancija šalje putove u rafe magnus. Ovaj put sadrži somatostatin koji vjerojatno ima ekscitacijske učinke (12). U respiracijskoj jezgri novookočenih štakora prisutne su visoke koncentracije somatostatina. Kalia i suradnici demonstrirali su ireverzibilnu apneju nakon injekcije somatostatina u cisternu magnu štakora (108). Somatostatin bi mogao biti odgovoran za prestanak disanja u sindromu iznenadne smrti djeteta (108). Osim navedenog, vrijedno je istaći pretpostavku po kojoj bi somatostatin mogao imati važnu ulogu u mehanizmima kontrole supraspinalnog bola (8).

Somatostatinski analog ODT8-SS djeluje u mozgu inhibirajući aktivnost simpatikusa stimuliranog fiziološkim i farmakološkim manipulacijama (npr. stresom, inzulinom, induciranom hipoglikemijom, karbaholom, bombezinom i 2-DG (nemetaboliziran metabolit glukoze) (61).

Prisutnost somatostatinu slične imunoreaktivnosti je jasno demonstrirana u humanoj cerebrospinalnoj tekućini. Pokazana je promjenjena razina somatostatinu slične imunoreaktivnosti u različitim neurološkim bolestima (46, 124). Sorensen i suradnici (228,229) su pokušali korelirati promjene u koncentraciji somatostatinu slične imunoreaktivnosti u pacijenata sa multiplom sklerozom i pronašli snižene koncentracije somatostatinu slične imunoreaktivnosti za vrijeme relapsa (228).

### 2.2.1.2. LOKALIZACIJA I DJELOVANJE U IMUNOLOŠKOM SISTEMU

U timusu i limfnim čvorovima somatostatin je lokaliziran na granici medule prema korteksu, a u limfnim čvorovima je smješten uz trabekule i ispod kapsule. U slezeni je pronađen u crvenoj pulpi (54). Prisustvo somatostatinskih receptora je dokazano na limfocitima, monocitima, mastocitima i trombocitima periferne krvi i (19,20,22). Receptori za somatostatin prisutni su na splenocitima glodavaca kao i na T i B limfocitima Peyerovih ploča. Linija murinog IgA plazmocitoma MOPC-315 eksprimira receptore visokog afiniteta i visoke gustoće, dok druga linija murinog IgA plazmocitoma I 558 ne eksprimira somatostatinske receptore (215).

Vjerojatno je da se receptori za hormone pojavljuju samo na klonu aktiviranih limfocita, što govori o hormonskoj regulaciji intenziteta imunološkog odgovora (25). Somatostatin može inhibirati proliferaciju humanih T limfocita *in vitro* (94,180), ali i izazvati suprotne učinke (176). Fitohemaglutininom stimulirani mišji splenociti pod djelovanjem somatostatina imaju smanjenu sposobnost lučenja čimbenika koji stvaraju kolonije (183).

Da li je somatostatin fiziološki regulator stanične proliferacije? Na to pitanje je teško odgovoriti. Iako su antiproliferativni utjecaji somatostatina dokazani, ostaje pitanje da li je endogeni somatostatin fiziološki regulator stanične proliferacije. Naime, somatomedin C je pokazao stimulacijski učinak na sekreciju somatostatina, dok je poznato inhibitorno djelovanje somatostatina na hormon rasta. Tako bi antiproliferativni utjecaj somatostatina mogao biti posljedica sekundarnih utjecaja koji nastaju zbog negativne povratne sprege somatostatina na regulaciju sekrecije hormona rasta. Ne treba zaboraviti ni mehanizam direktne lokalne kontrole staničnog rasta. Pawlikowski somatostatin smatra regulatorom stanične proliferacije (176). U *in vitro* uvjetima somatostatin je pokazao stimulacijske i inhibicijske učinke na proliferaciju limfocita (176,178). U većini eksperimenata učinci somatostatina ili somatostatinskih analoga bili su inhibicijski, premda su mogući i bifazični ili stimulacijski učinci na proliferaciju limfocita (176). Međutim, mehanizam antiproliferativnog djelovanja somatostatina nije potpuno rasvjetljen. Somatostatin aktivira defosforilaciju proteina fosfotirozina čija je fosforilacija stimulirana sa epidermalnim činiocom EGF(eng. epidermal growth factor) (176). Najbolje znano postreceptorsko djelovanje somatostatina je smanjenje aktivnosti adenil ciklaze, što potom smanjuje razinu cikličkog adenozin

monofosfat (c-AMP) koji može pojačati proliferaciju izvjesnih staničnih linija preko tip I c-AMP zavisne protein kinaze (176).

Drugi način kojim bi somatostatin mogao izazvati antimitotičke utjecaje je modulacija transporta kalcija. Inhibicija ulaska kalcija somatostatinom objavljena je u više navrata (142). Poznato je da je dioba stanice proces ovisan o kalciju jer su inhibitori ulaska kalcija pokazali supresiju proliferacije *in vitro* (176). Kao što je navedeno somatostatin u pojedinim uvjetima može izazvati i stimulacijske utjecaje na staničnu proliferaciju. Međutim, mehanizam ovih utjecaja ostaje također nejasan. Inhibicija adenil ciklaze trebala bi biti uzeta u obzir, jer c-AMP može inhibirati proliferaciju pojedinih staničnih linija preko tip II c-AMP-ovisne protein-kinaze. Druga mogućnost je interakcija somatostatina s nesomatostatinskim receptorima (176). Predložena je i hipoteza o ovisnosti utjecaja neuropeptida o direktnoj interakciji T i B limfocita (183). Isti neuropeptidi mogu izazvati različite učinke ovisno o lokalnoj prisutnosti i mjestu djelovanja (177).

Somatostatin i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) inhibiraju sintezu deoksiribonukleinske kiseline i sintezu imunoglobulina u limfocitima slezene i Peyer-ovim pločama (232). Ova djelovanja su organ i izotip specifična; sinteza imunoglobulin A (IgA) u Peyerovim pločama većinom je posredovana sa supstancijom P (SP), dok je sinteza imunoglobulina G (IgG) nepromijenjena (215). SP ostvaruje svoje utjecaje kao i somatostatin preko specifičnih receptora koji su prisutni na T i B limfocitima, a njihova ekspresija ovisi o funkciji staničnog ciklusa (215).

U fiziološkim dozama ( $10^{-12}$  do  $10^{-6}$  M) koje se nalaze lokalno u tkivu, somatostatin ima značajno djelovanje na murini Ig A plazmocitom MOPC-315. Somatostatin je inhibirao i pojačao staničnu proliferaciju na doza i vrijeme zavisnan način sa maksimalnom inhibicijom pri koncentraciji od  $10^{-12}$  do  $10^{-6}$  M i inkubaciji od 24 sata. U dozama većim od  $10^{-7}$  M inkorporacija timidina je pojačana, ali samo kod stanica inkubiranih 96 sati (215).

Prisutnost somatostatina u sluznici crijeva govori o njegovoj mogućoj lokalnoj imunoregulacijskoj ulozi uključujući modulaciju funkcije limfocita Payer-ovih ploča. To bi bio jedan od mehanizama pomoću kojeg bi nervni sistem mogao regulirati imunitet mukoznih površina i drugih mjesta gdje može biti oslobođen. Naime, koncentracija somatostatina, vazoaktivnog intestinalnog peptida i supstancije P u sluznicama je 100 do 1000 puta veće nego u krvi i one bi mogle imati značajan lokalni imunoregulacijski utjecaj (232). Treba spomenuti da je učinak somatostatina na sintezu imunoglobulina najizraženiji na IgA, potom na IgM, dok su najmanji utjecaji zapaženi na IgG (*in vitro*) (232).

Modulacijski utjecaji neuropeptida mogli su biti zapaženi samo kod kultura stimuliranih sa konkanavalinom A. Neuropeptidi nisu imali utjecaja na lipopolisaharidima stimuliranu staničnu proliferaciju i imunoglobulinsku sintezu

sugerirajući tako mehanizam posredovan T-stanicama, što se slaže sa postojećim informacijama o prisutnosti ovih neuropeptida primarno, ako ne isključivo na T stanicama (174,179,232). Ipak mogućnost direktnog utjecaja somatostatina na B limfocite ne smije biti isključena.

Zajedničke karakteristike sekretornog imunog sistema sluznica je predominantna sekrecija IgA. Međutim, limfociti odgovorni za sintezu IgA su češći u Peyer-ovim pločama nego u slezeni i perifernim limfnim čvorovima (45). Prema tome, sekrecija IgA je regulirana T stanicama (pomagačkim i supresijskim limfocitima) kojima je bogato crijevo, posebno Payer-ove ploče. Unutar Payer-ovih ploča postoje specifični pomoćnički T limfociti koji se rijetko javljaju u ostalim dijelovima perifernog limfatičkog sistema kao na primjer u slezeni (45,55,201).

*In vitro* somatostatin osim promjene intenziteta sinteze DNA i imunoglobulinske sinteze djeluje na kemotaksiju monocita (209), oslobađanje medijatora iz mast stanica (223), fagocitozu neutrofila (4) i efektorske funkcije makrofaga (98). Eksperimentalni podaci govore o inhibiciji lokalne graft-versus-host reakcije u miša somatostatinom (191). Ukoliko je somatostatin injiciran odmah po davanju ovčjih eritrocita inhibirao je produkciju stanica koje formiraju plakove (PFS) u štakora Y-59 i CBA miševa (185). Pretretman i prolongirani tretman bio je bez utjecaja što bi ukazivalo da somatostatin djeluje na brze i prolazne hormonske promjene povezane sa prisustvom antigena (185). Somatostatin je smanjio inhibicijski utjecaj stresa na tumorski rast (186).

Iz svega što je opisano vidljivo je da su učinci somatostatina bili različiti i ovisni o vrsti tkiva na koje djeluje. Djelomično se to može objasniti postojanjem različitih vrsta receptora za somatostatin. Nedavno je klonirano pet somatostatinskih receptora koji posreduju različite fiziološke učinke somatostatina (147). Svaki receptor je u ljudi kodiran specifičnim genom koji ima različitu lokalizaciju. Klonirani receptori imaju između 45-58% identičnosti aminokiselinske sekvencije pogotovo u transmembranskoj regiji (13).

Svih pet receptora veže somatostatin sa visokim i sličnim afinitetom (123). Farmakološke i funkcionalne osobitosti somatostatinskih receptora SSTR1, SSTR2 i SSTR3 je ekstenzivno analizirana (197).

Ligandi koji se specifično vežu za SSTR2 i SSTR3 su identificirani te se čini da je SSTR2 u štakora receptorski subtip koji selektivno posreduje inhibicijske učinke somatostatina na oslobađanje hormona rasta (198). Za SSTR1 smatra se da posreduje antiproliferativne učinke somatostatina na rast tumorskih stanica (13). Selektivna ekspresija SSTR3 mRNA u štakorskim i ljudskim pankreasnim otočićima pak, sugerira da ovaj receptorski subtip ima jedinstvenu ulogu u regulaciji inzulinske ili glukagonske sekrecije (275). mRNA za SSTR1, SSTR2 i SSTR3 prisutna je u štakorskom mozgu dok mRNA SSTR2 pokazuju selektivnu ekspresiju u nadbubrežnoj žlijezdi. U cerebralnom korteksu i hipokampusu neki subtipovi somatostatinskih receptora mogu biti sintetizirani u različitim staničnim subpopulacijama. Paradokсна ekspresija SSTR3 mRNA u adultnom cerebelumu, moždanoj regiji sa malo

somatostatinskih receptora sugerira da je translacija ili procesing SSTR3 receptora u ovoj regiji CNS-a regulirana na poseban način (275).



### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

U eksperimentima smo koristili štakore čistih sojeva: Dark August (DA) (Rt-1<sup>a</sup>) i Albino Oxford (Rt-1<sup>u</sup>). Oba štakorska soja se uzgajaju u vivariju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U eksperimentima smo koristili mužjake i ženke stare šest do 12 tjedana. Uzgoj se vršio u prostoriji u kojoj su bili standardizirani uvjeti temperature i vlage, te dnevno-noćni ritam svjetlosti. Štakori su prehranjivani hranom za laboratorijske životinje standardiziranog tipa /keksi za glodavce/ koje proizvodi "Biotehnički fakultet/VTOZD za živinstvo Domžale/Slovenija" i vodom bez ograničenja, a jednom sedmično se dohranjuju pšenicom u zrnju i kvascem. U svakom plastičnom kavezu obitavalo je pet štakora.

### 3.2. PRIPREMA ENCEFALITOGENIČNOG HOMOGENATA

Bijelu tvar potrebnu za pripremu encefalitogenične emulzije izolirali smo iz svježeg goveđeg mozga neposredno po dekapitaciji životinje (Mesokombinat Rijeka). Odmah po izoliranju, 10 grama bijele tvari mozga smo homogenizirali sa 10 ml fiziološke otopine i potom sa 20 ml kompletnog Freundovog adjuvansa /CFA/ kome je dodan 1 mg/ml Mycobacterium tuberculosis, soja H37RA, (ATCC25177 Sigma). Tako dobivenu emulziju smo upotrebljavali za senzibilizaciju štakora.

### 3.3. ANESTEZIJA

Prilikom senzibilizacije štakore smo uvodili u površnu etersku narkozu (Aether ad narcosin, "Lek," Ljubljana, Slovenija), dok smo prilikom intracerebro-ventrikularnih aplikacija štakore anestezirali 3.6% otopinom kloralhidrata (1 ml/100 g tjelesne težine).

### 3.4. SENZIBILIZACIJA

Nakon uvođenja u površnu narkozu štakore smo senzibilizirali jednokratnim ubrizgavanjem po 0.1 ml encefalitogenične emulzije potkožno, u dorzalnu stranu obje stražnje šape. Dan kada je učinjena senzibilizacija označavali smo kao nulti dan EAE-a.

### 3.5. HORMONSKI PRIPRAVCI

U svim pokusima štakore smo tretirali somatostatinskim analogom SMS 201-995 /Octapeptid, Sandoz, Bazel, Švicarska/ kojeg smo dobili gratis uslužnošću Prof. dr. Suada Efendića iz Karolinskog Instituta Štokholm, Švedska.

### 3.6. INTRACEREBROVENTRIKULARNA APLIKACIJA

Životinju se anestezira 3.6% kloralhidratom (10 ml/kg t. t./i. p.) te fiksira na aparatu za stereotaksiju (David Kopf stereotaxic frame, Michigan, USA). Nakon incizije skalpa električnim svrdlom učinjeni su obostrano, u parijetalnim kostima, otvori promjera 2.5 mm kroz koje je u moždano tkivo u području lateralnih komora uvedena mikrobrizgalica (Hamilton, Bonaduz AG, Švicarska). Referentna nulta točka bila je bregma, sjecište sagitalnog i koronarnog šava lubanje. Koordinate za injiciranje bile su: 0.8 mm straga; 1.7 mm lateralno i 4 mm ispod bregme. Mikrobrizgalicom u svaku lateralnu komoru ubrizgano je 0.9% otopine NaCl ili somatostatina (SMS 201-995) 0.25  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  tijekom 5 minuta.

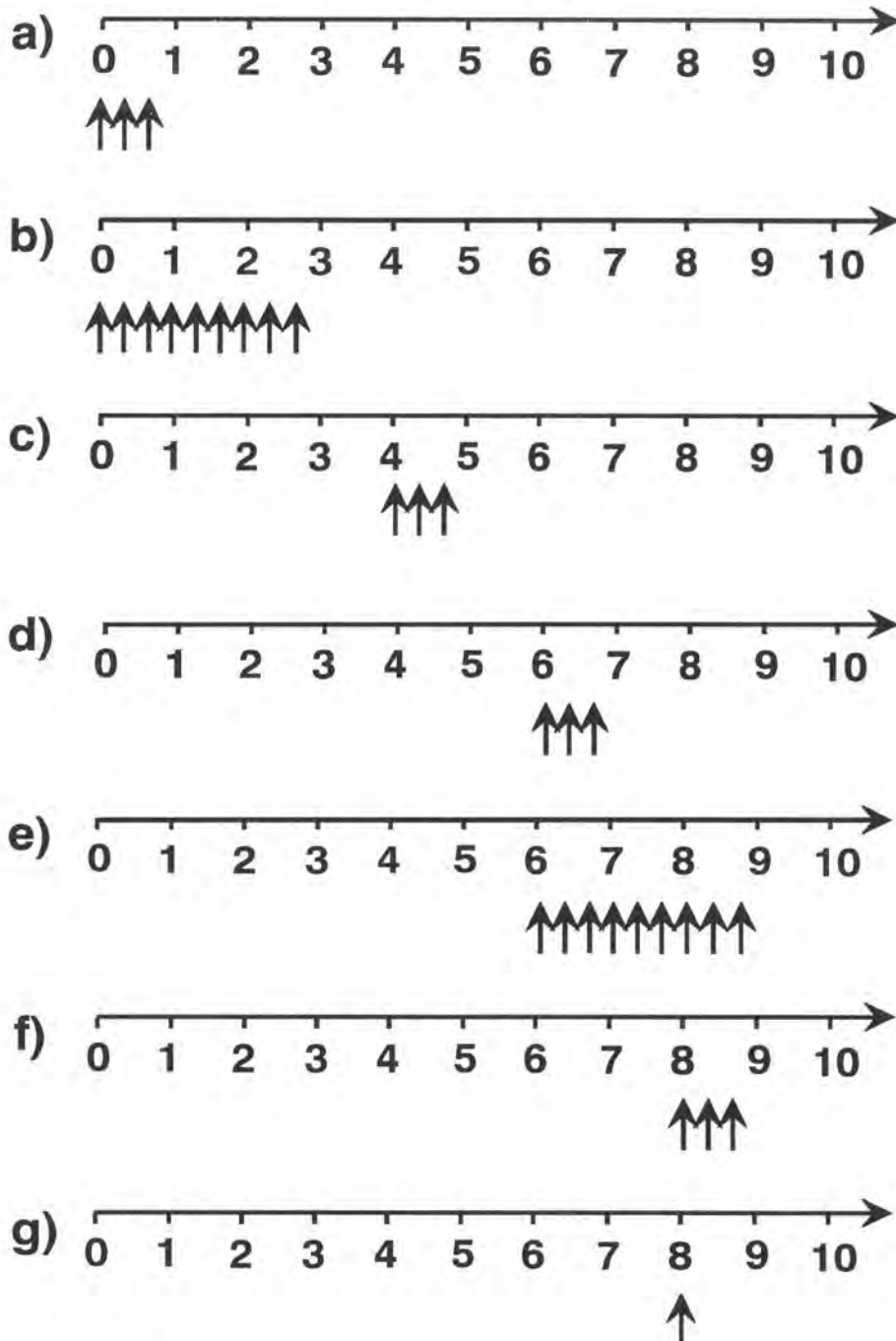
### 3.7. PLAN POKUSA

Naša istraživanja imala su za cilj utvrditi kako somatostatin utječe na indukciju i tijek kliničke slike EAE-a induciranog u osjetljivom DA i rezistentnom AO soju štakora. Na temelju predhodnih istraživanja (339) odlučili smo zasebno ispitati učinke somatostatina injiciranog periferno (subkutano), odnosno centralno (intracerebroventrikularno), te usporediti periferne i centralne učinke u oba predložena modela.

Na Slici 1 prikazan je plan pokusa subkutane aplikacije somatostatina u AO štakora. Svi AO štakori su aktivno imunizirani homogenatom junećeg mozga u kompletnom Freund-ovom adjuvansu (0.1 ml u svaku stražnju šapu, odnosno 0.2 ml po štakoru). Somatostatin je apliciran u različitim razdobljima po aktivnoj imunizaciji u dozi od 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne težine, i u vremenskim intervalima od 8 sati.

U protokolu "a" somatostatin je trokratno injiciran prvog dana po aktivnoj imunizaciji. Prva od tri doze somatostatina injicirana je neposredno nakon aktivne imunizacije. U protokolu "b" somatostatin je štakorima soja AO apliciran dnevno trokratno od prvog do trećeg dana po aktivnoj imunizaciji, odnosno 3 x (3x5)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne težine štakora. U protokolu "c" somatostatin smo injicirali od petog dana, a u protokolu "d" sedmog dana po aktivnoj imunizaciji tj. u vrijeme kad dolazi do povećane permeabilnosti krvno-moždane barijere (341). Pratili smo kliničku sliku, a u štakora tretiranih somatostatinom petog i sedmog dana po aktivnoj imunizaciji (protokoli "c" i "d") i napravili histološku analizu tkiva CNS-a. U AO štakora tretiranih somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji (protokol "e") praćena je klinička slika te učinjena histološka i imunohistološka analiza tkiva CNS-a. Uz navedeno, analizirali smo i veličinu blastične transformacije splenocita na konkanavalin A i mijelinski bazični protein. Kontrolne skupine životinja su u svim protokolima primale umjesto somatostatina iste volumene fiziološke otopine (1ml/kg tjelesne težine štakora).

DANI PO AKTIVNOJ INDUKCIJI



Slika 1. Plan pokusa subkutane ( $\uparrow$ ) aplikacije somatostatina u AO štakora (a-f) i plan pokusa intracerebroventrikularne aplikacije somatostatina u AO štakora (g)  
0=dan aktivne imunizacije

Na Slici 1. prikazan je i plan pokusa intracerebroventrikularne aplikacije somatostatina u rezistentnom AO soju štakora (protokol g). Somatostatin smo aplicirali devetog dana po aktivnoj imunizaciji tj. neposredno pred početak očekivanih kliničkih znakova EAE-a. Injicirali smo 5  $\mu$ l otopine somatostatina (0.25  $\mu$ g u svaki lateralni ventrikul, odnosno 0.5  $\mu$ g po štakoru). Fiziološka otopina je aplicirana u istom volumenu (5  $\mu$ l u svaki lateralni ventrikul, odnosno 10  $\mu$ l po životinji). U svih životinja praćeno je vrijeme pojave prvih kliničkih znakova bolesti, klinička slika, te izvršena histološka analiza tkiva CNS-a 34 i 64 dana po aktivnoj imunizaciji.

Slika 2. pokazuje plan pokusa subkutane aplikacije somatostatina u DA štakora. U protokolu "a" somatostatin je trokratno subkutano apliciran svakih osam sati prvog dana po aktivnoj imunizaciji (3x5 $\mu$ g/kg tjelesne težine štakora). U protokolu "b" aplikacija je izvršena od prvog do trećeg dana po aktivnoj imunizaciji, a u protokolu "c" petog dana po aktivnoj imunizaciji. Štakori injicirani somatostatinom sedmog dana po aktivnoj imunizaciji oznaćeni su protokolom "d". To je vremensko razdoblje karakterizirano povećanom propusnošću krvno-moždane barijere u kroničnom relapsirajućem obliku EAE-a (359).

Protokol "e" obuhvaća grupu životinja tretiranu somatostatinom devetog dana po aktivnoj imunizaciji. To je razdoblje pred početak očekivanih kliničkih simptoma. Kontrolne skupine životinja su u svim protokolima primale iste volumene fiziološke otopine (1 ml/kg tjelesne težine).

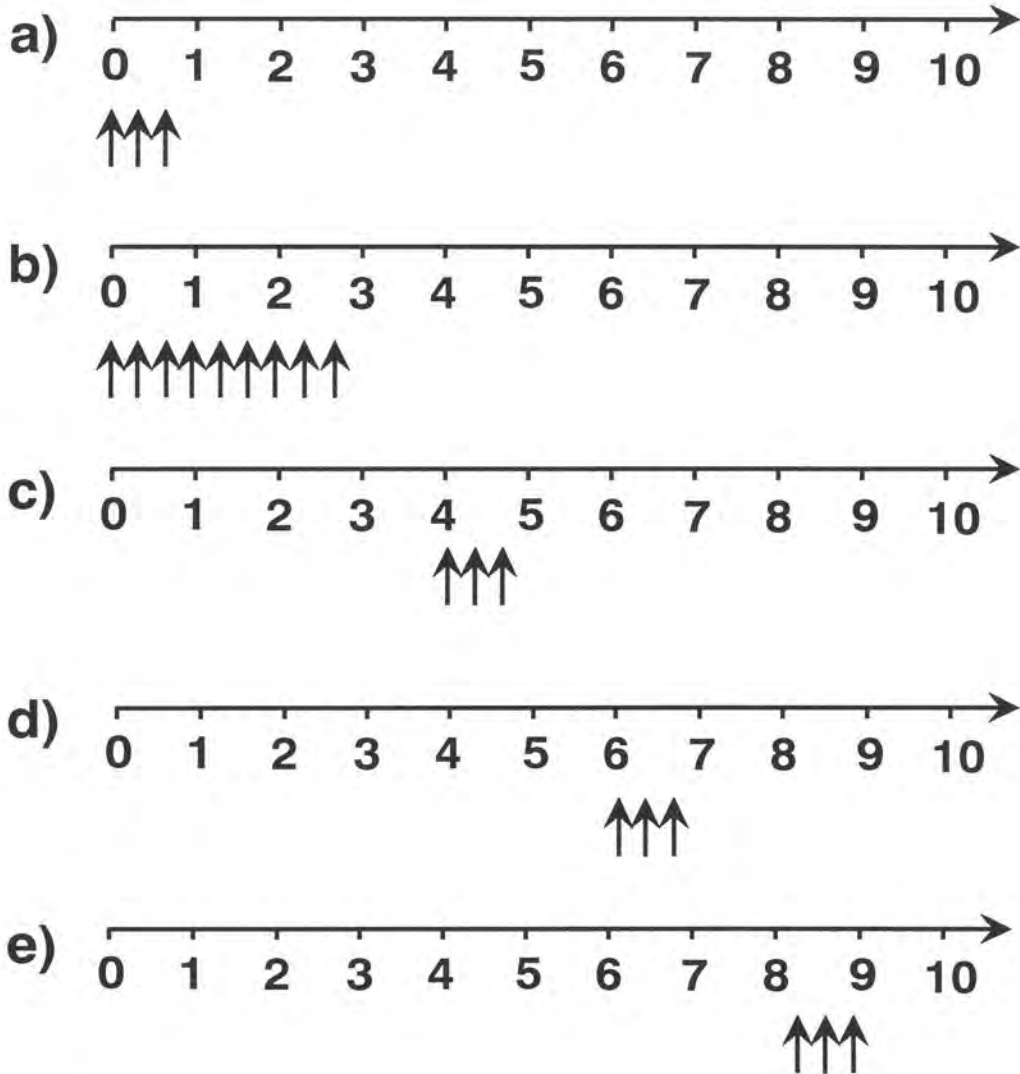
Slika 3. prikazuje plan pokusa intracerebroventrikularne aplikacije somatostatina u osjetljivog DA soja štakora. Somatostatin je bilateralno injiciran u moždane ventrikule (0.5  $\mu$ g po životinji u volumenu od 10  $\mu$ l). Kontrolna skupina životinja primala je 10  $\mu$ l fiziološke otopine po životinji. Injiciranje je izvršeno prvog, drugog, petog, sedmog i devetog dana po aktivnoj imunizaciji (protokoli a-e).

### 3.8. EVALUACIJA KLINIĆKE SLIKE EAE-A

Intenzitet simptoma kliničke slike pratili smo svakodnevno i bodovali tijekom 30-40 dana po senzibilizaciji. Za oznaćavanje žestine znakova EAE-a upotrebljavali smo skalu bodova od "0" do "4".

- 0 - bez kliničkih znakova bolesti
- 1 - flakcidna paraliza repa
- 2 - flakcidna paraliza repa udružena sa parezom stražnjih ekstremiteta
- 3 - flakcidna paraliza repa udružena sa paralizom stražnjih ekstremiteta
- 4 - smrt štakora nastala uslijed EAE-a

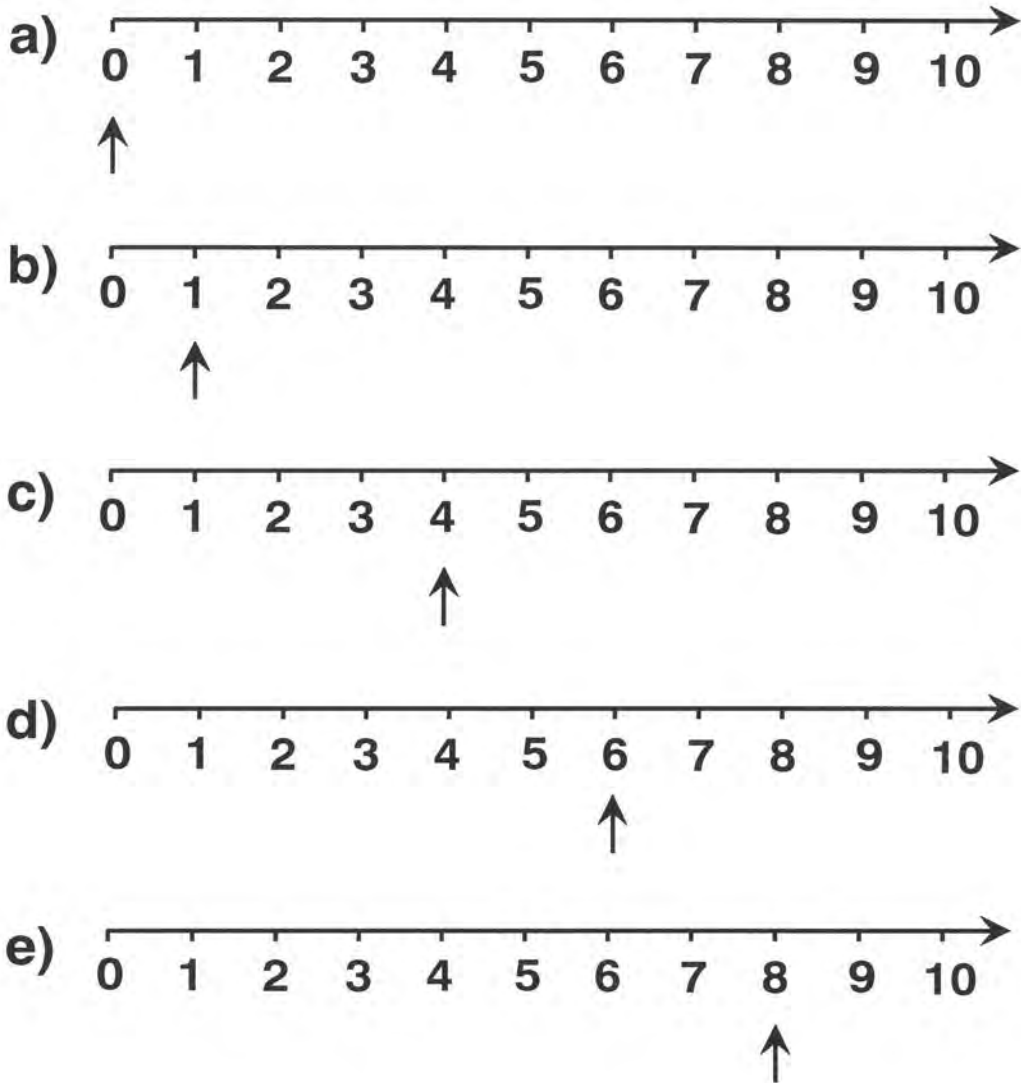
DANI PO AKTIVNOJ INDUKCIJI



Slika 2. Plan pokusa subkutane (↑) aplikacije somatostatina u DA štakora

0=dan aktivne imunizacije

DANI PO AKTIVNOJ INDUKCIJI



Slika 3. Plan pokusa intracerebroventrikularne (↑) aplikacije somatostatina u DA štakora

0=dan aktivne imunizacije

### 3.9. STATISTIČKE METODE

Za istraživanje intenziteta kliničke slike po pojedinim danima koristili smo aritmetičku sredinu bodova čitave grupa toga dana. Za uspoređivanje značajnosti razlike intenziteta kliničke slike korišten je Wilcoxon-ov T test. Za uspoređivanje incidencije EAE-a korišten je  $\chi^2$  test (sa Yates-ovom korekcijom). Za uspoređivanje postotaka zastupljenosti pojedinih staničnih biljega koji su određivani FACS analizom korišten je Studentov-t test.

### 3.10. PATOHISTOLOGIJA

Životinje su ubijene pod eterskom anestezijom. Štakorima smo nakon smrti /dekapitacijom/ izvadili mozak i fiksirali u formalaldehidu, potom uklopili u parafinske blokove, mikrotomirali i bojili hemalaun-eozinom /HE/. Radili smo nekoliko poprečnih /frontalnih/ i horizontalnih rezova mozga. Svi su histološki preparati fotografirani pod povećanjem od 200 puta.

### 3.11. IMUNOHISTOLOGIJA

Mozgovi su razrezani i smrznuti u tekućem dušiku na  $-70^{\circ}$  C. Mikrotomski rezovi serijski narezani debeli 9  $\mu$ m stavljeni su na stakalca i pohranjeni na  $-20^{\circ}$ C do upotrebe.

Imunohistologija je korištena sa ciljem analize staničnih infiltrata u CNS-u.

Korištena su slijedeća monoklonska antitijela (mišja antištakorska):

antimakrofagno antitijelo Mac-1 (usmjereno protiv neaktiviranih makrofaga) i antimakrofagno antitijelo Mac-3 (usmjereno protiv aktiviranih makrofaga). Ova antitijela su korištena u razrijeđenju 1/100. Antitijela anti CD4 (W3/25) ascites, anti CD8 (OX8) ascites i anti IL-2 receptor (OX39) supernatant dobivena su iz vlastitih hibridomskih linija.

Za konjugat su korištena konjska anti-mišja biotinizirana IgG antitijela (Vector, Burlingame, CA, USA). Antitijela, mišja antištakorska W3/25 ascites, te mišji antištakorski OX8 ascites razrijeđeni su 1/10, odnosno 1/2 u Tris-puferu. Tris pufer je napravljen od Tris praška otopljenog u redestiliranoj vodi i titriran sa HCl-om dok pH nije dostigao vrijednost između 7.4-7.6. Prije inkubacije sa primarnim antitijelom tkivni rezovi su 30 minuta inkubirani u 2% konjskom serumu razrijeđenom u Tris-puferu. Poslije inkubacije sa primarnim antitijelom rezovi su držani u Tris puferu tri puta po deset minuta. Poslije inkubacije sa sekundarnim antitijelom preparati su isprani u Tris puferu. Potom je na rezove dodano po 100  $\mu$ l peroksidaze po rezu te inkubirano pola sata. Peroksidazna aktivnost je prikazana nakon deset minuta inkubacije sa 100  $\mu$ l peroksidaznog substrata koji se sastojao od 2 mg etil-amino-karbazola (Farma, Zagreb) otopljenog u 28.8 ml 0.05 mola Tris pufera (pH 7.6) i 1.2 ml dimetilsulfoksida koji sadrži 0.01%  $H_2O_2$ . Rezovi su potom lagano kontra-obojeni hematoksili-



nom. Preparati su slikani pod povećanjem od 200, a samo neki pod povećanjem od 400 puta (Slika 41, Slika 44, Slika 48, Slika 50, Slika 51).

### 3.12. BLASTIČNA TRANSFORMACIJA

Splenociti su sterilno uzeti od eksperimentalnih i kontrolnih životinja koje su uginule nakon izlaganja eterskoj narkozi. Potom je u ploče od 96 rupica s ravnim dnom stavljeno 150  $\mu$ l medija RPMI sa 5% seruma goveđeg fetusa (FCS- eng. fetal calf serum), zatim je dodano 50  $\mu$ l stanica (koncentracije  $2 \times 10^6$  /ml), a finalno je dodano 50  $\mu$ l mitogena. Kao mitogene smo koristili konkanavalin A (koncentracija 2 i 5  $\mu$ l po rupici odnosno 10 i 25  $\mu$ g/ml) i mijelinski bazični protein (MBP) u koncentraciji od 20 i 100  $\mu$ g/ml. Nakon 72 sata inkubacije na temperaturi od 37°C i u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> u svaku rupicu je dodan 1  $\mu$ Ci tricijum timidina (3H) specifične aktivnosti 74 gbq/mmol ili 2 Ci/mmol. Nakon 18 sati inkorporacija radioaktivnog timidina je prekinuta stavljanjem ploče u hladnjak na 4°C kroz pola sata. Potom je izvršena precipitacija na automatskom precipitatoru Dynatech, Automash 2000. Zatim su po tri mililitra scintilacijske otopine stavljena u svaku plastičnu tubu sa precipitacijskim diskom te je radioaktivnost izbrojena na scintilacijskom brojaču (Tracer analytic, Delta 300).

### 3.13. PROTOČNA CITOMETRIJA

Limfocitne subpopulacije određivane su protočnom citometrijom u AO štakora *in vivo* tretiranih somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. Štakori su su usmrćeni stavljanjem u eksikator sa eterom. Poplitealni limfni čvorovi i slezena nakon toga su propasirani kroz najlonsku mrežicu, a suspenzija stanica je dva puta isprana u RPMI-u. Eritrociti su razoreni dodavanjem 0.9 % amonijevog klorida, te stajanjem na 4°C kroz 10 minuta. Nakon toga je slijedilo dvostruko ispiranje u FACS mediju. Na talog od oko  $1 \times 10^6$  stanica dodana su primarna mišja antitijela (supernatanti vlastitih hibridoma OX8, OX39), te komercijalna antitijela W3/25 i OX1 (pan leukocitni biljeg) (Serotec). Potom su dodana FITC-om obilježena sekundarna kozja anti-mišja antitijela. Obilježene stanice analizirali smo koristeći FACScan software (Becton Dickinson).

## 4. REZULTATI

#### 4.1. UČINCI SOMATOSTATINA INJICIRANOG CENTRALNO ILI PERIFERNO U ŠTAKORA SOJA DA (OSJETLJIVI SOJ).

##### 4.1.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA U MOŽDANE VENTRIKULE

Način injiciranja i eksperimentalni protokol opisali smo u odsječku Plan pokusa (3.7) odnosno na Slici 3. za štakore osjetljivog soja DA.

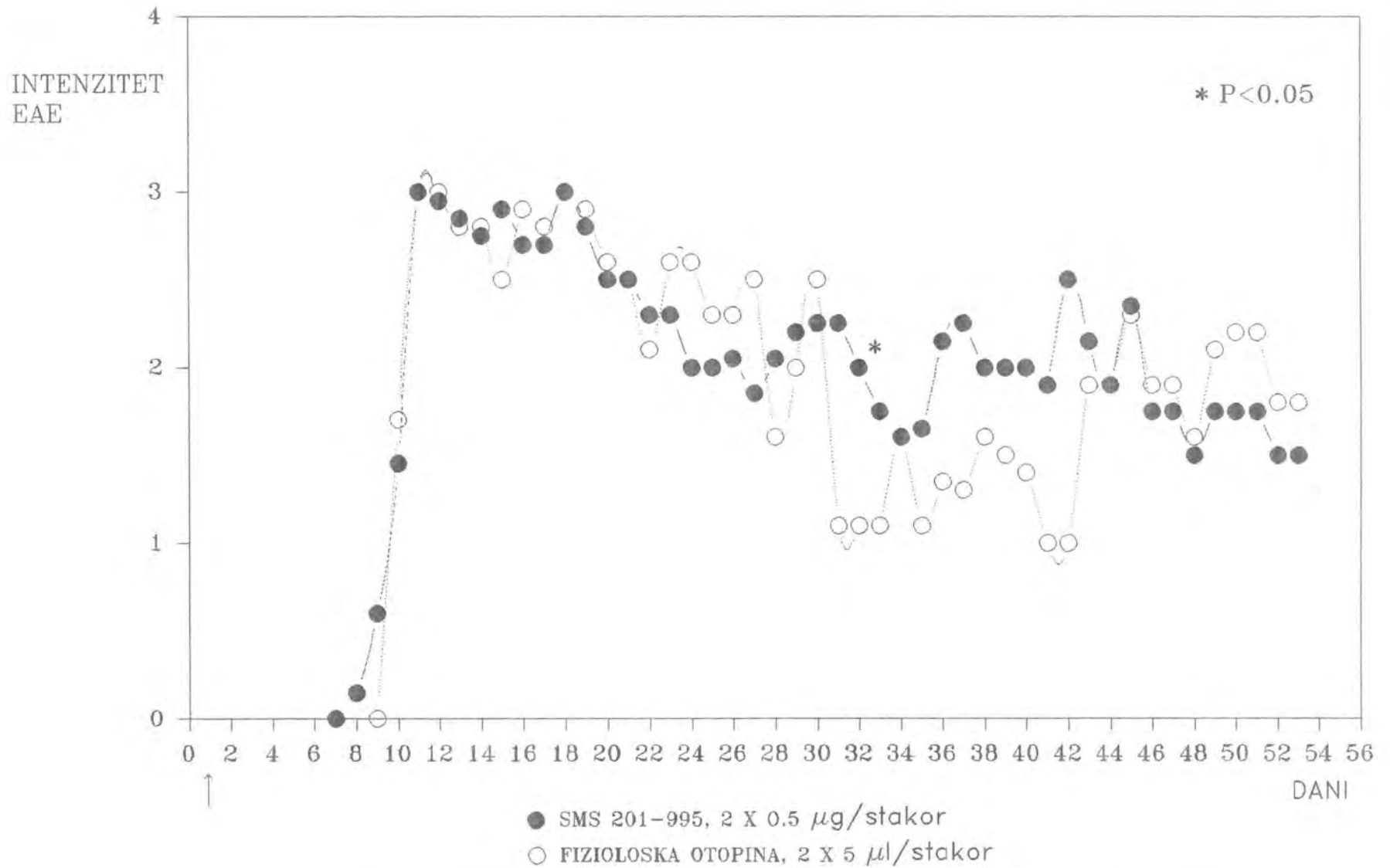
Naša ranija istraživanja pokazala su značajne imunomodulacijske učinke somatostatina na klinički tijek EAE-a u osjetljivog DA i rezistentnog AO soja štakora. Ovi rezultati naglasili su interakciju imunološkog i neuroendokrinog sistema i pokazali mogućnost moduliranja autoimunog procesa hormonima. Rezultati ispitivanja koje opisujemo odnose se na određivanje značaja mjesta aplikacije somatostatina na razvoj EAE-a u osjetljivog DA soja, te u relativno rezistentnog AO soja štakora.

##### 4.1.1.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PRVOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

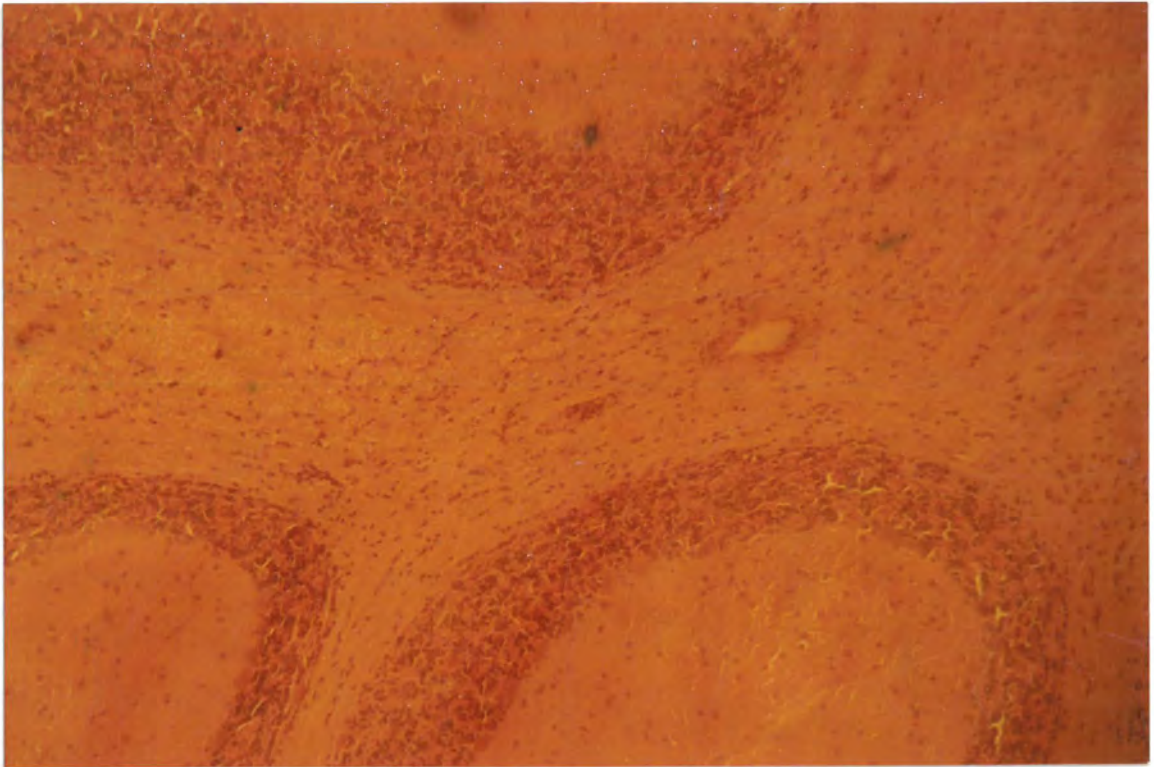
###### 4.1.1.1.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 4 prikazuje klinički tijek EAE u DA štakora koji su injicirani somatostatinom ili fiziološkom otopinom intracerebroventrikularno **prvog** dana po aktivnoj imunizaciji. U svakoj grupi bilo je po četiri štakora. Injiciranje somatostatina dovodi do nešto intenzivnijih kliničkih znakova, što je izraženo od 31-og do 43-eg dana po aktivnoj imunizaciji. Statistički značajno povećanje intenziteta našli smo 32-og dana po aktivnoj imunizaciji ( $X=2.0 \pm 0.35$ ) u odnosu na ( $X=1.1 \pm 0.71$ ) u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom. Kronično relapsirajući oblik EAE-a razvio se u obje grupe u kasnijem stadiju bolesti. U drugim razdobljima bolesti nema značajnije razlike u intenzitetu kliničke slike.

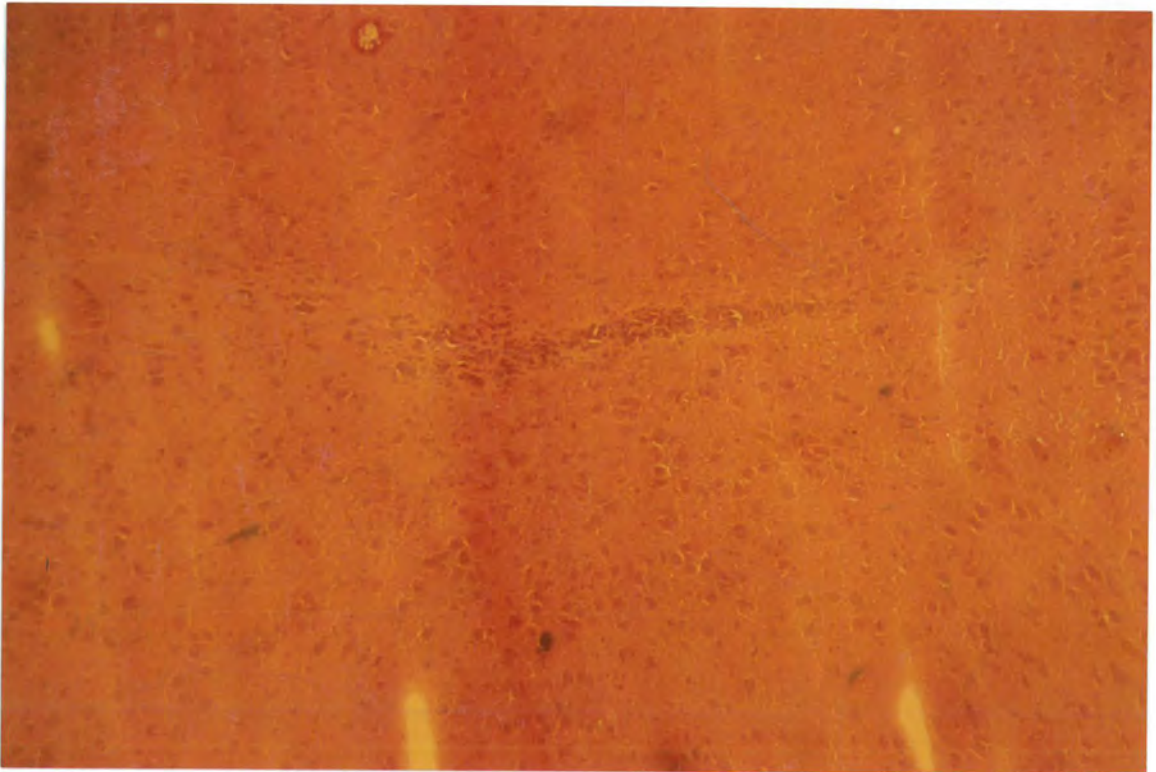
Na slijedećim slikama 23.-26. prikazani su histološki preparati u DA štakora tretiranih somatostatinom (Slika 23.) ili fiziološkom otopinom (Slika 24.) intracerebroventrikularno **prvog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika 25. prikazuje moždano tkivo DA štakora 15-og dana po aktivnoj imunizaciji dok Slika 26. prikazuje moždano tkivo intaktnog štakora.



Slika 4. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO PRVOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA

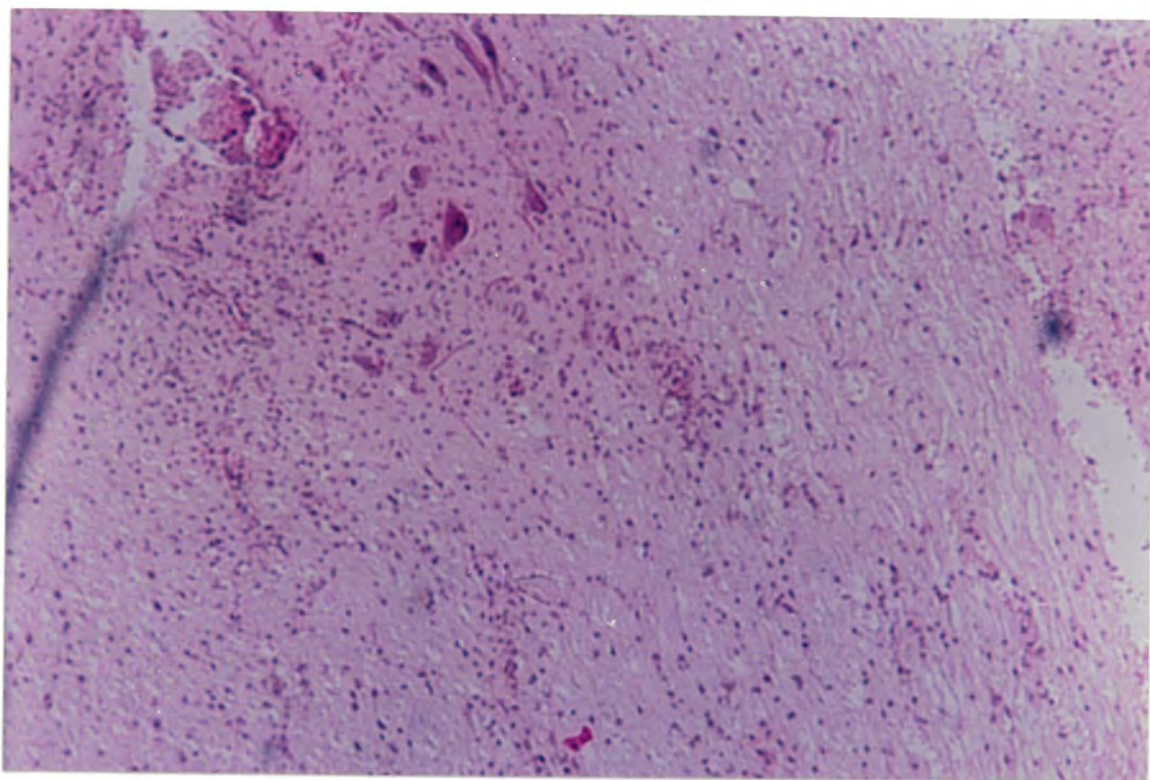


Slika 23. (Slika iznad teksta) prikazuje mali mozak DA štakora intracerebroventrikularno tretiranog somatostatinom **prvog** dana po aktivnoj imunizaciji. U središtu slike je vidljiv infiltrat upalnih stanica. Preparat je napravljen 92-og dana po aktivnoj imunizaciji.

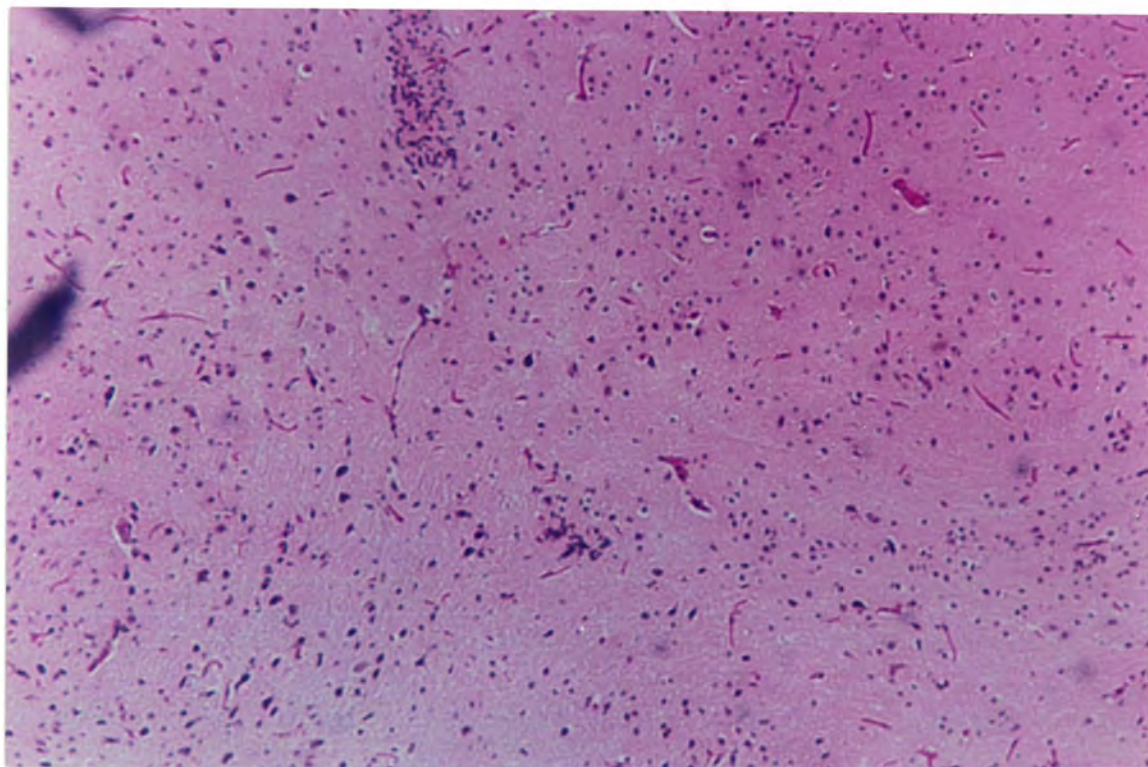


Slika 24. prikazuje moždano tkivo DA štakora intracerebroventrikularno

tretiranog fiziološkom otopinom **prvog** dana po aktivnoj imunizaciji. Na slici se vidi horizontalno položen infiltrat upalnih stanica. Preparat je napravljen 92-og dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 25. (Slika iznad teksta) prikazuje moždano tkivo DA štakora 15-og dana po aktivnoj imunizaciji. Vide se perivaskularni i difuzni infiltrati upalnih stanica.



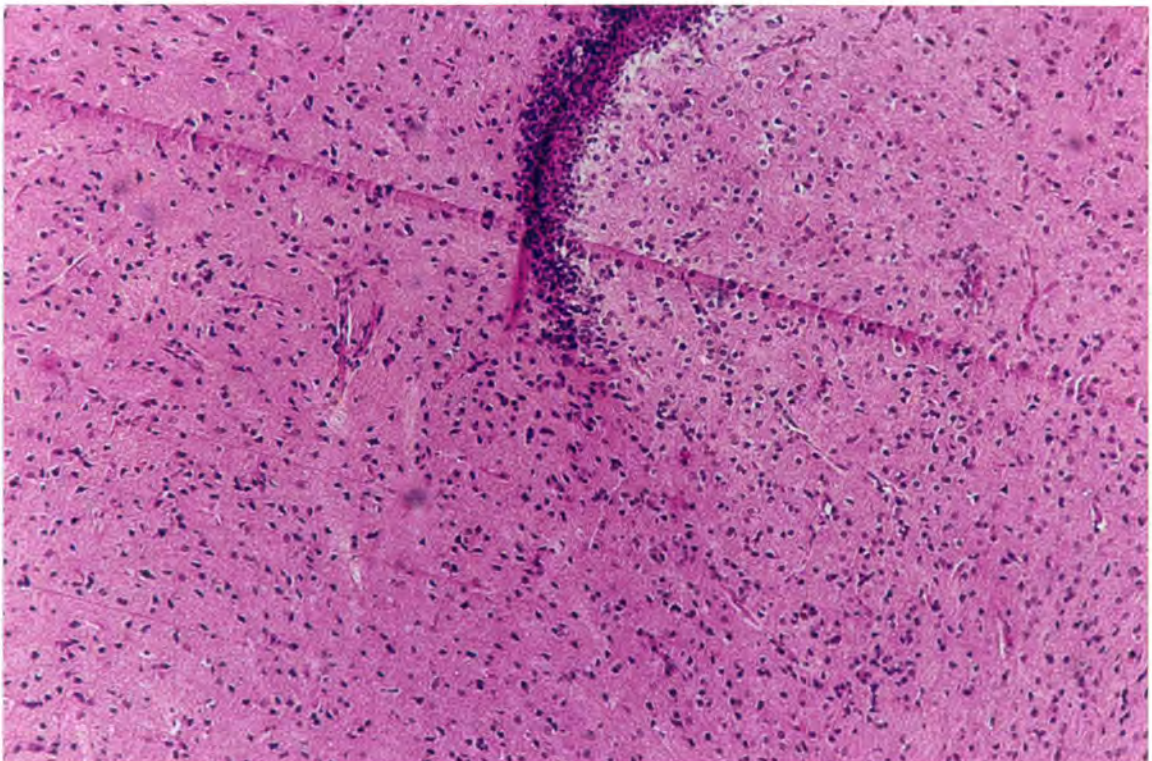
Slika 26. (prethodna stranica) prikazuje moždano tkivo intaktnog DA štakora.

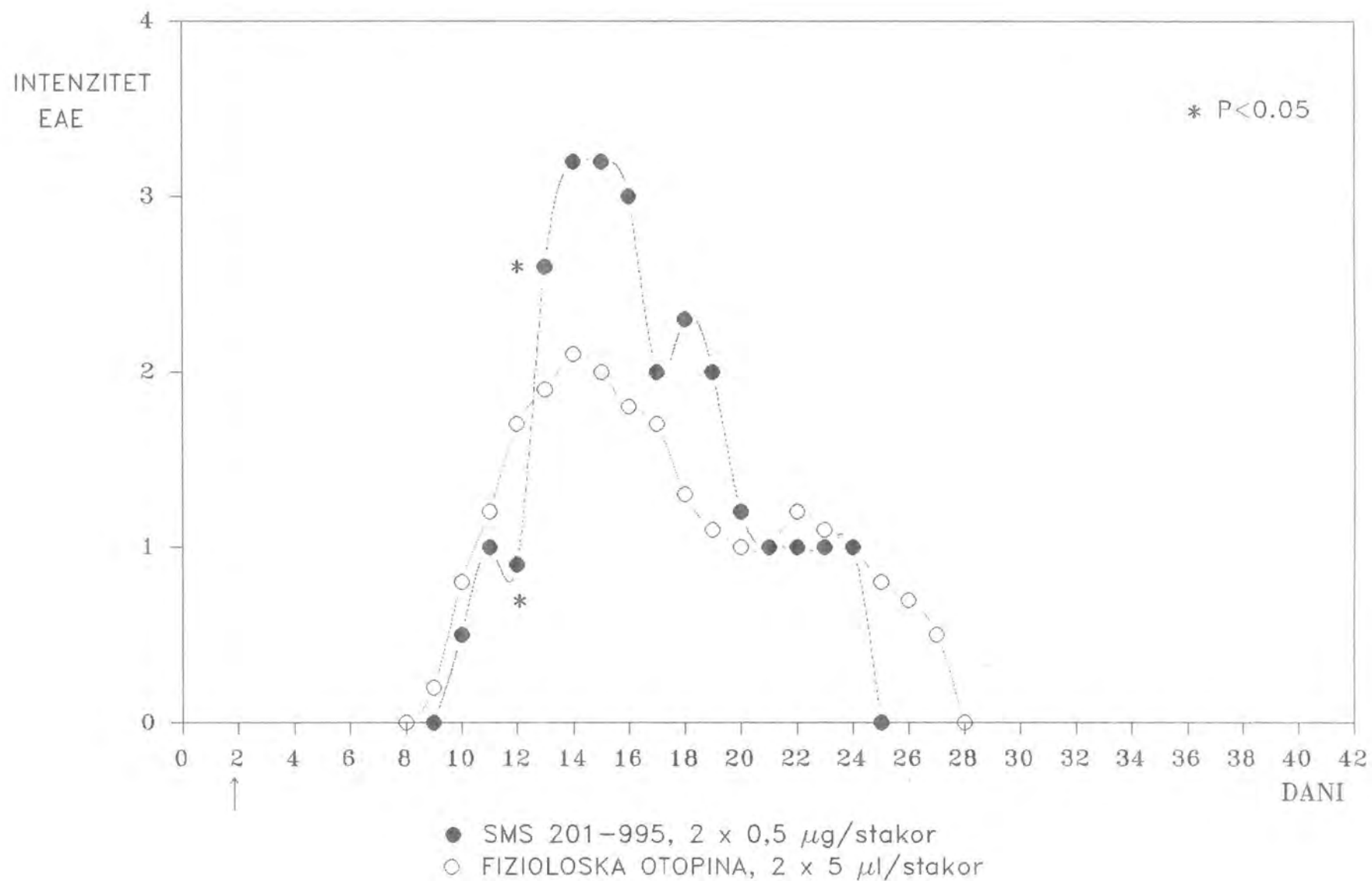
#### 4.1.1.2. INJICIRANJE SOMATOSTATINA DRUGOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

##### 4.1.1.2.1. KLINIČKA SLIKA

Somatostatin injiciran intracerebroventrikularno **drugog** dana po aktivnoj imunizaciji (Slika 5) izaziva klinički intenzivnije simptome u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja kojima je injicirana fiziološka otopina što je izraženo već u akutnoj fazi bolesti. U svakoj grupi bilo je po pet životinja. Najveću žestinu klinička slika pokazuje 14-15-og dana ( $X=3.30 \pm 0.25$ ), što je znatno više od žestine izražene u grupi injiciranoj fiziološkom otopinom ( $2.0 \pm 0.54$ ). Osim toga, došlo je do značajne preinake tijekom bolesti u odnosu na grupu injiciranu prvog dana koja je pokazivala klasičan kronični relapsirajući tijek EAE-a. Naime, u životinja tretiranih drugog dana, neovisno o tome da li je injiciran somatostatin ili fiziološka otopina, ne razvija se kronični relapsirajući tijek bolesti, a simptomi EAE-a ne mogu se više uočiti 26-og odnosno 29-og dana (Slika 5).

Slijedeće dvije slike prikazuju histološke preparate mozga DA štakora tretiranih intracerebroventrikularno somatostatinom (Slika 27.) ili fiziološkom otopinom (Slika 28.) **drugog** dana po aktivnoj imunizaciji. Oba preparata su napravljena 15-og dana po aktivnoj imunizaciji.

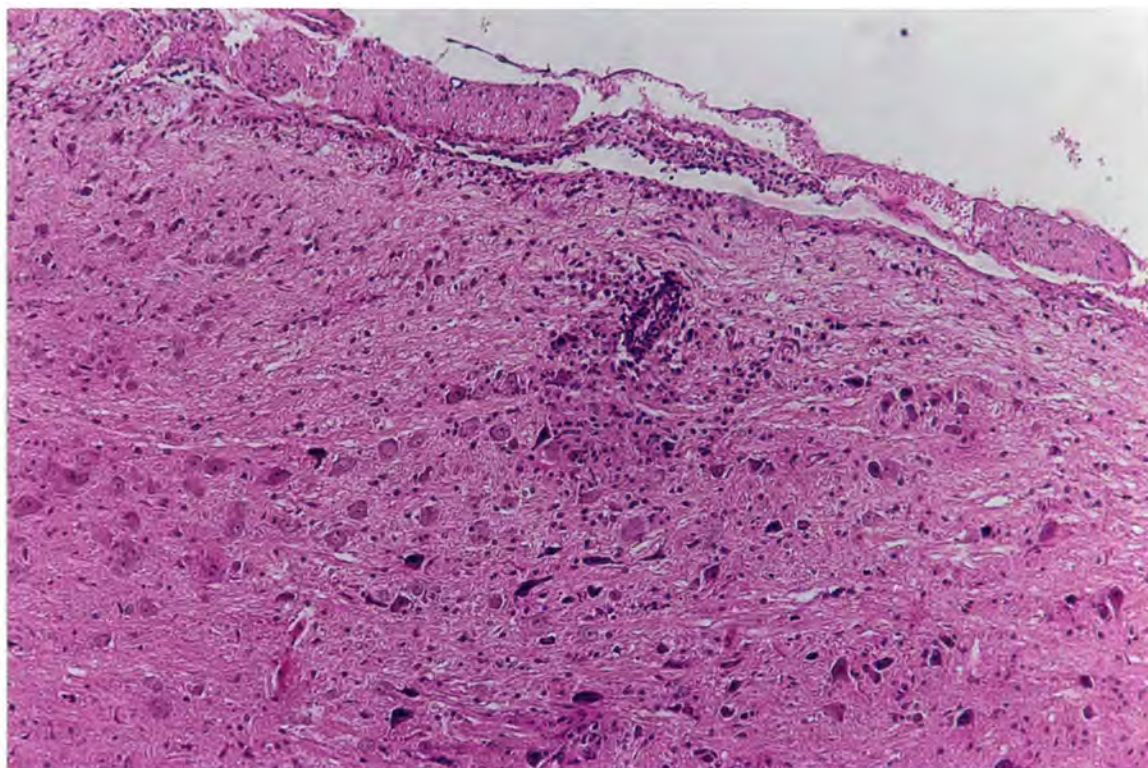




Slika 5. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO DRUGOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA



Slika 27. (prethodna stranica) prikazuje histološki preparat mozga DA štakora intracerebroventrikularno tretiranih somatostatinom **drugog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vidi se izdašan infiltrat upalnih stanica.

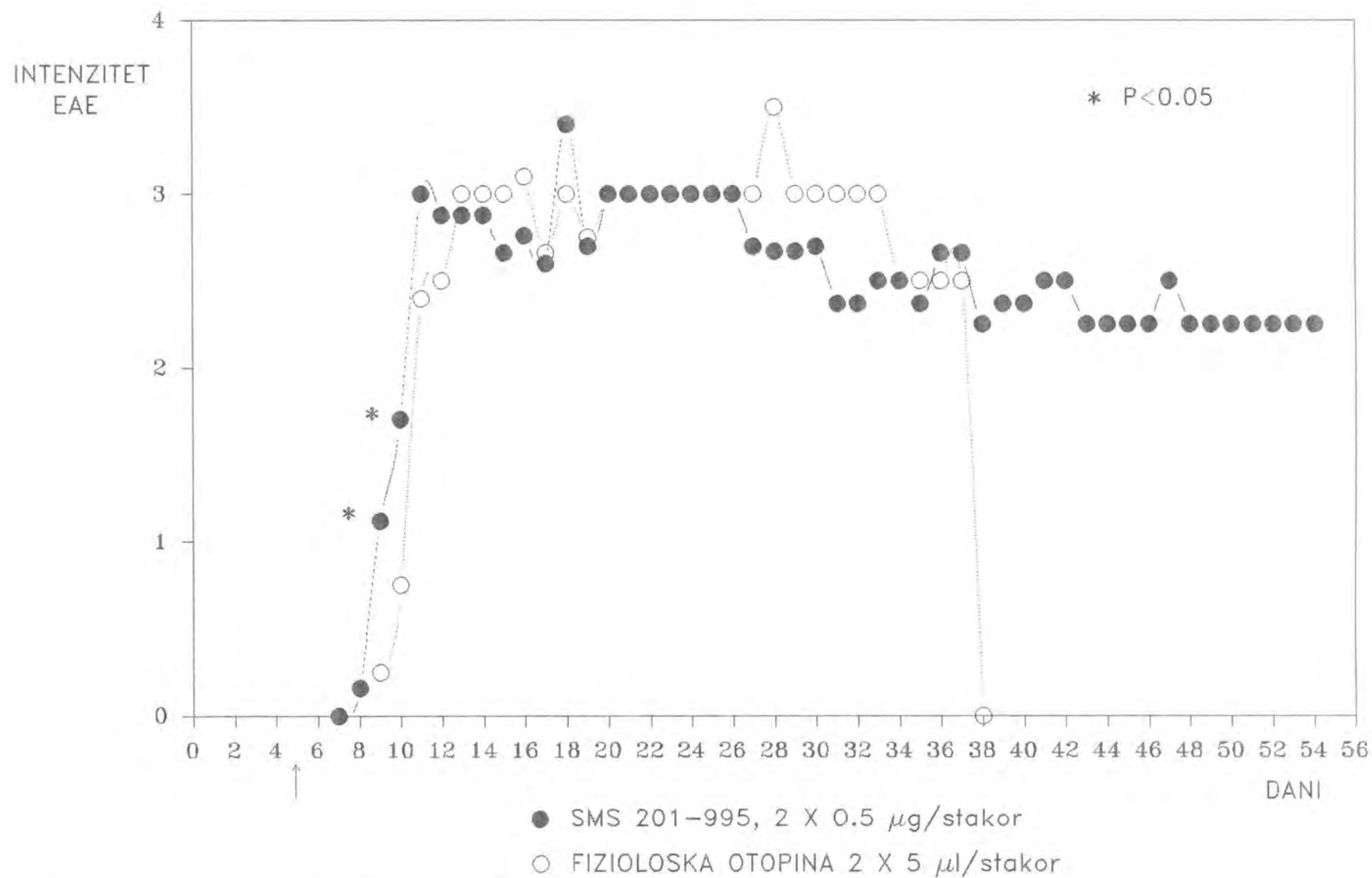


Na Slici 28. vidi se histološki preparat mozga DA štakora intracerebroventrikularno tretiranog fiziološkom otopinom **drugog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vide se infiltrati upalnih stanica, kako perivaskularno tako i u moždanim ovojnicama.

#### 4.1.1.3. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PETOG DANA DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

##### 4.1.1.3.1. KLINIČKA SLIKA

Injicira li se somatostatin ili fiziološka otopina **petog** dana po aktivnoj imunizaciji (Slika 6.) dolazi do razvoja kroničnog relapsirajućeg oblika bolesti u obje ispitivane grupe. U grupi injiciranoj somatostatinom bilo je sedam životinja, a u grupi injiciranoj fiziološkom otopinom četiri. Statistički značajno povećanje intenziteta kliničke slike bilo je prisutno u grupi tretiranoj somatostatinom devetog ( $X=1.12 \pm 0.12$ ) i desetog dana po aktivnoj imunizaciji ( $X=1.7 \pm 0.14$ ) u odnosu na ( $X=0.25 \pm 0.14$ ) odnosno ( $X=0.75 \pm 0.14$ ) u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom ( $P<0.05$ ). Međutim, dok u grupi injiciranoj fiziološkom otopinom simptomi iščezavaju 38 dana, u grupi



Slika 6. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA

injiciranoj somatostatinom žestina bolesti ostaje nepromijenjena do kraja promatranog razdoblja od dva mjeseca.

#### 4.1.1.4. INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

##### 4.1.1.4.1. KLINIČKA SLIKA

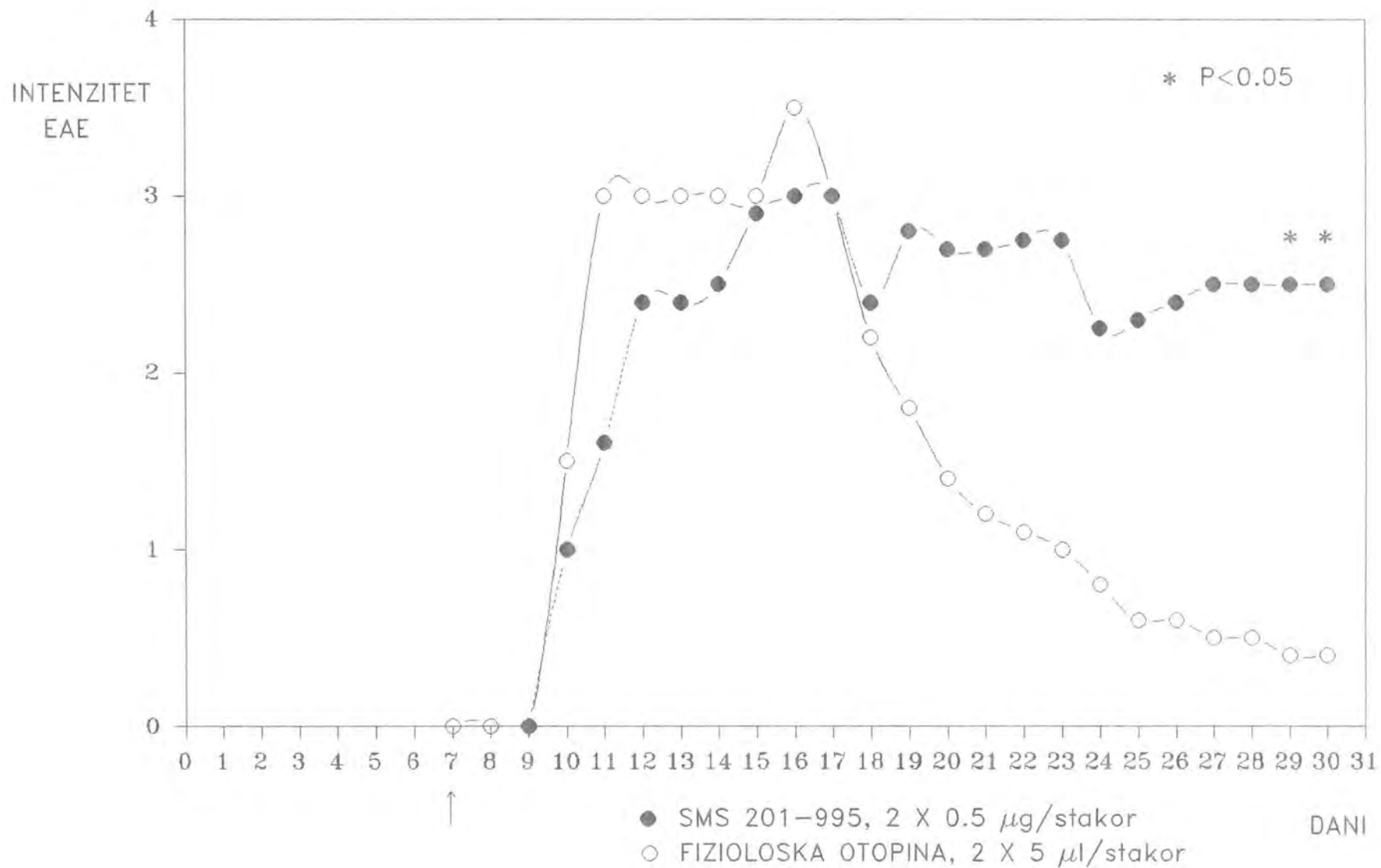
Utjecaj somatostatina i fiziološke otopine koji su injicirani intracerebroventrikularno **sedmog** dana o aktivnoj imunizaciji prikazuje Slika 7. U grupi tretiranoj somatostatinom bilo je 11 životinja a u grupi tretiranoj fiziološkom fiziološkom otopinom otopinom četiri. Pokazuje se da tretman somatostatinom u ovom razdoblju dovodi do razvoja kroničnog relapsirajućeg oblika bolesti koji je statistički značajno većeg intenziteta što je izraženo 29-og ( $p < 0.05$ ) i 30-og ( $p < 0.05$ ) dana po aktivnoj imunizaciji ( $2.5 \pm 0.14$ ) u odnosu na ( $0.4 \pm 0.2$ ) u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom. Tretman fiziološkom otopinom u istom intervalu dovodi do pojave kliničke slike slabijeg intenziteta nakon pojave kliničke atake EAE-a. Tretman somatostatinom sedmog dana po aktivnoj imunizaciji uzrokovao je statistički značajno sniženje (za 75%) preživljavanja u odnosu na grupu tretiranu fiziološkom otopinom koja je za razliku od somatostatina imala 100% preživljavanje ( $p < 0.05$   $\chi^2$  sa Yatesov-om korekcijom) (Slika 9.).

#### 4.1.1.5. INJICIRANJE SOMATOSTATINA DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

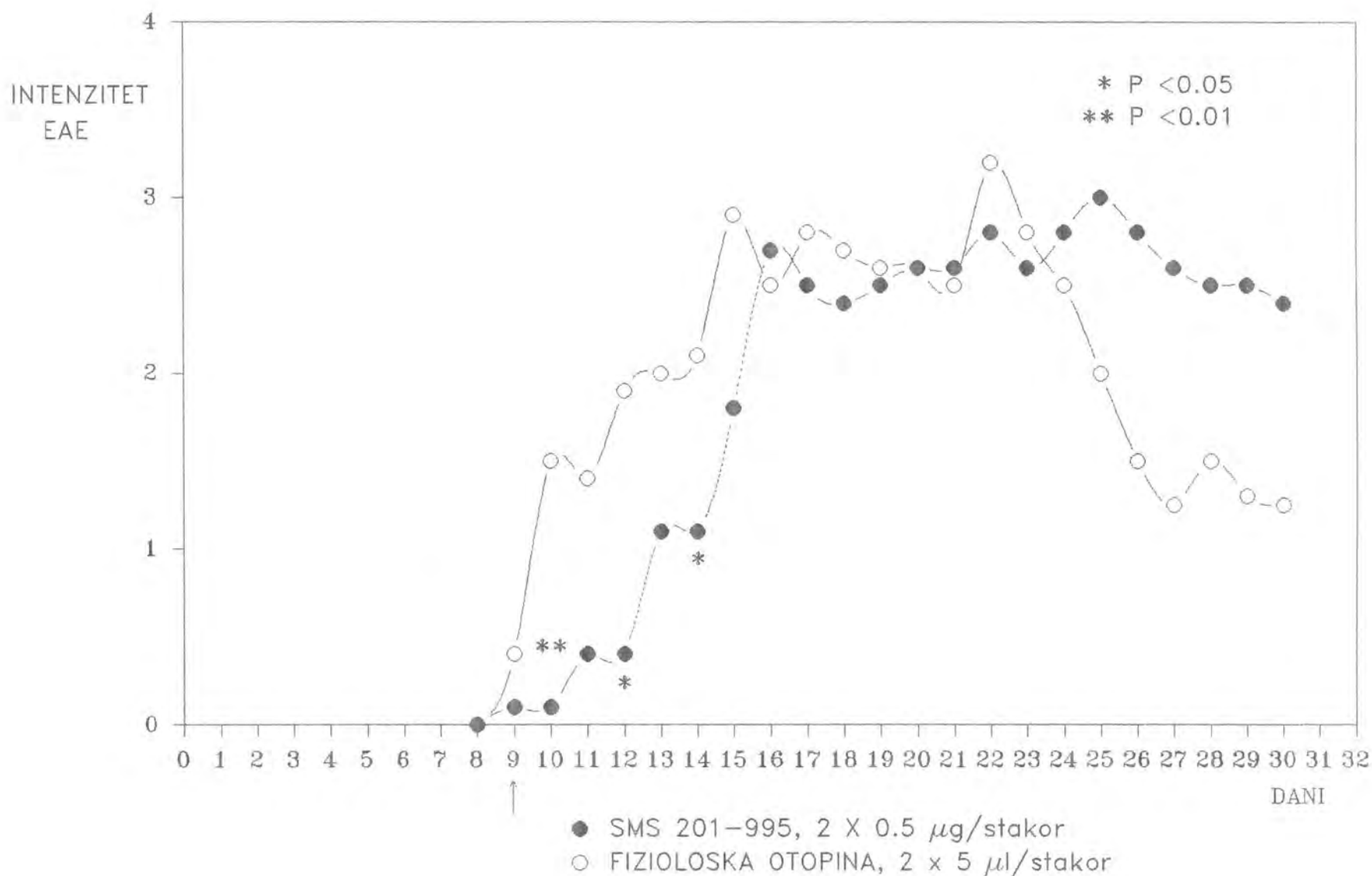
##### 4.1.1.5.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 8. pokazuje učinak intracerebroventrikularne aplikacije somatostatina ili fiziološke otopine **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji na klinički tijek EAE-a. U grupi DA štakora tretiranih somatostatinom došlo je do kasnije pojave prvih kliničkih simptoma (13-og dana po aktivnoj imunizaciji) u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom (10-og dana po aktivnoj imunizaciji), što je statistički značajna razlika ( $p < 0.01$ ). U razdoblju od 10-og do 14-og dana po aktivnoj imunizaciji žestina simptoma bolesti je značajno suprimirana. Statistički značajne razlike bile su prisutne u grupi tretiranoj somatostatinom 10-og dana ( $p < 0.01$ ) te 12-og i 14-og dana ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s grupom tretiranom fiziološkom otopinom. Valja primjetiti da su obje grupe kasnije dosegle maksimalni intenzitet kliničkih simptoma koji označavaju paralizu stražnjih ekstremiteta.

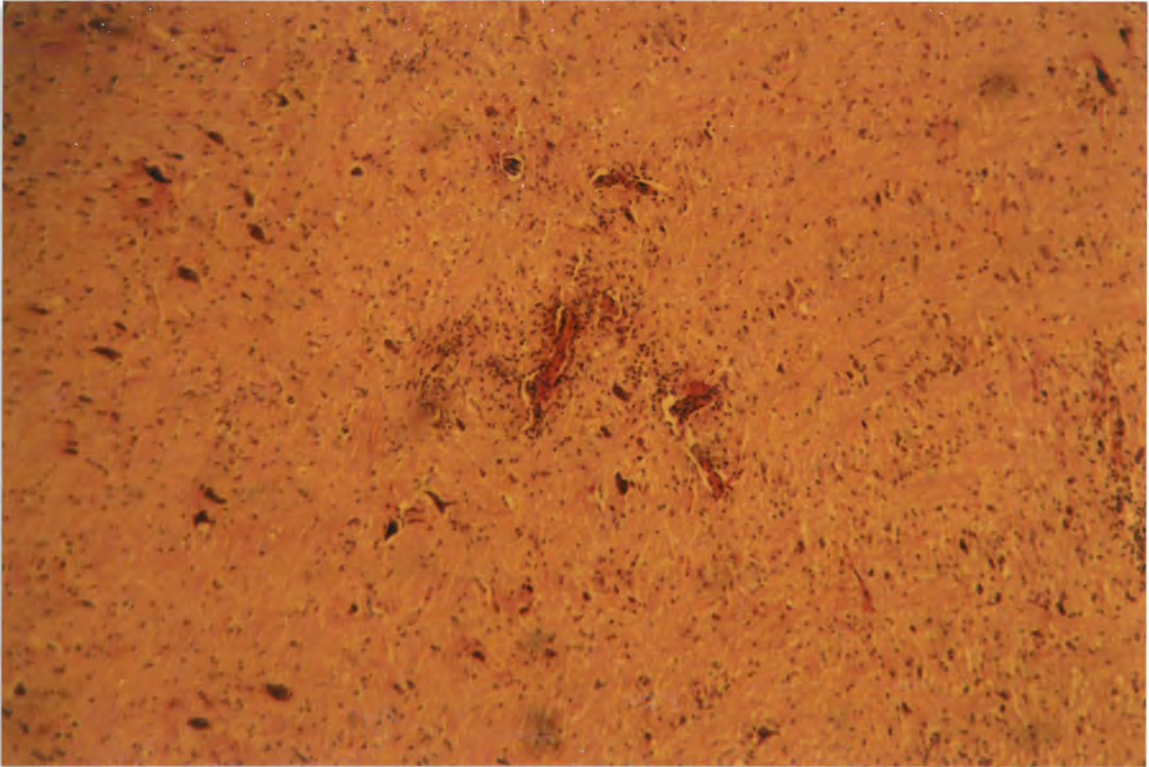
Slijedeće dvije (Slike 29. i Slika 30.) prikazuju histološke preparate mozga DA štakora tretiranih intracerebroventrikularno somatostatinom (Slika 29.) i fiziološkom otopinom (Slika 30.) **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Preparati su napravljeni 50-og dana po aktivnoj imunizaciji.



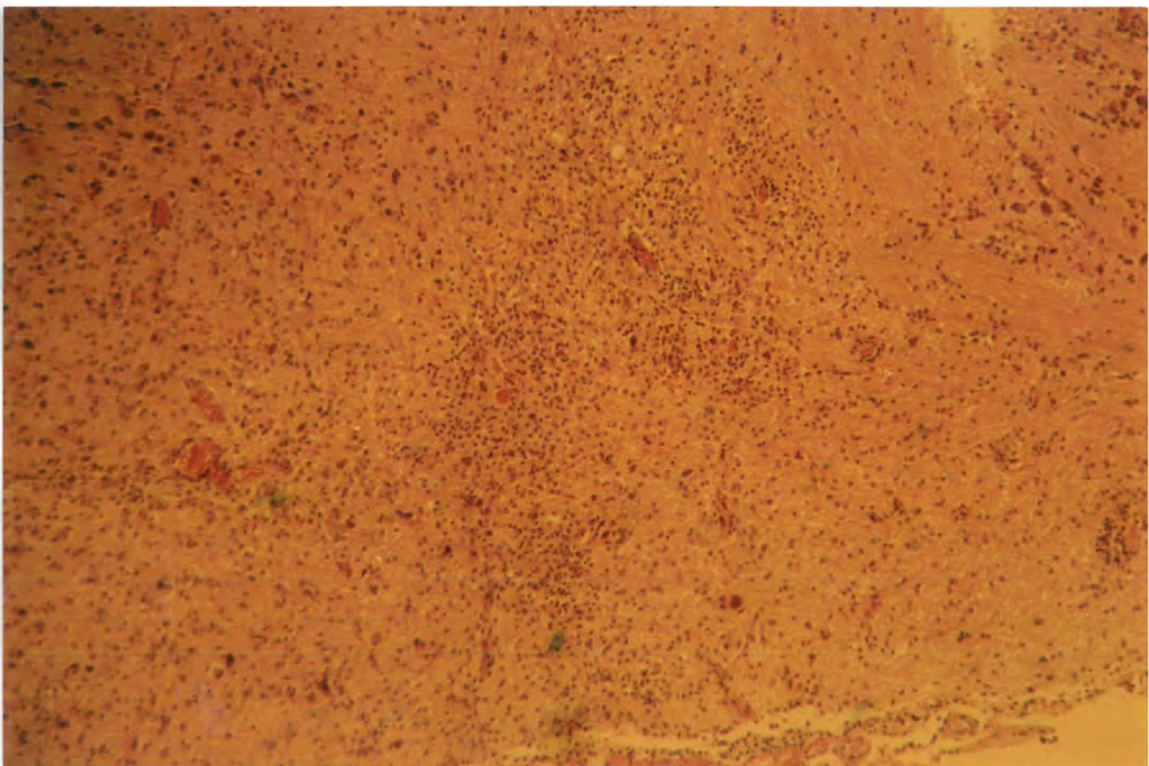
Slika 7. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA



Slika 8. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTEZITET EAE U DA STAKORA



Slika 29. (Slika iznad teksta) prikazuje tkivo mozga DA štakora intracerebroventrikularno tretiranog somatostatinom **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vidljivi su izraženi perivaskularni infiltrati mononukleara. Preparat je napravljen 50-og dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 30. (prethodna stranica) prikazuje moždano tkivo DA štakora intracerebroventrikularno tretiranog fiziološkom otopinom **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vide se perivaskularno smješteni infiltrati upalnih stanica. Preparat je napravljen 50-og dana po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.1.1.5.2. UTJECAJ INTRACEREBROVENTRIKULARNE APLIKACIJE SOMATOSTATINA NA PREŽIVLJAVANJE

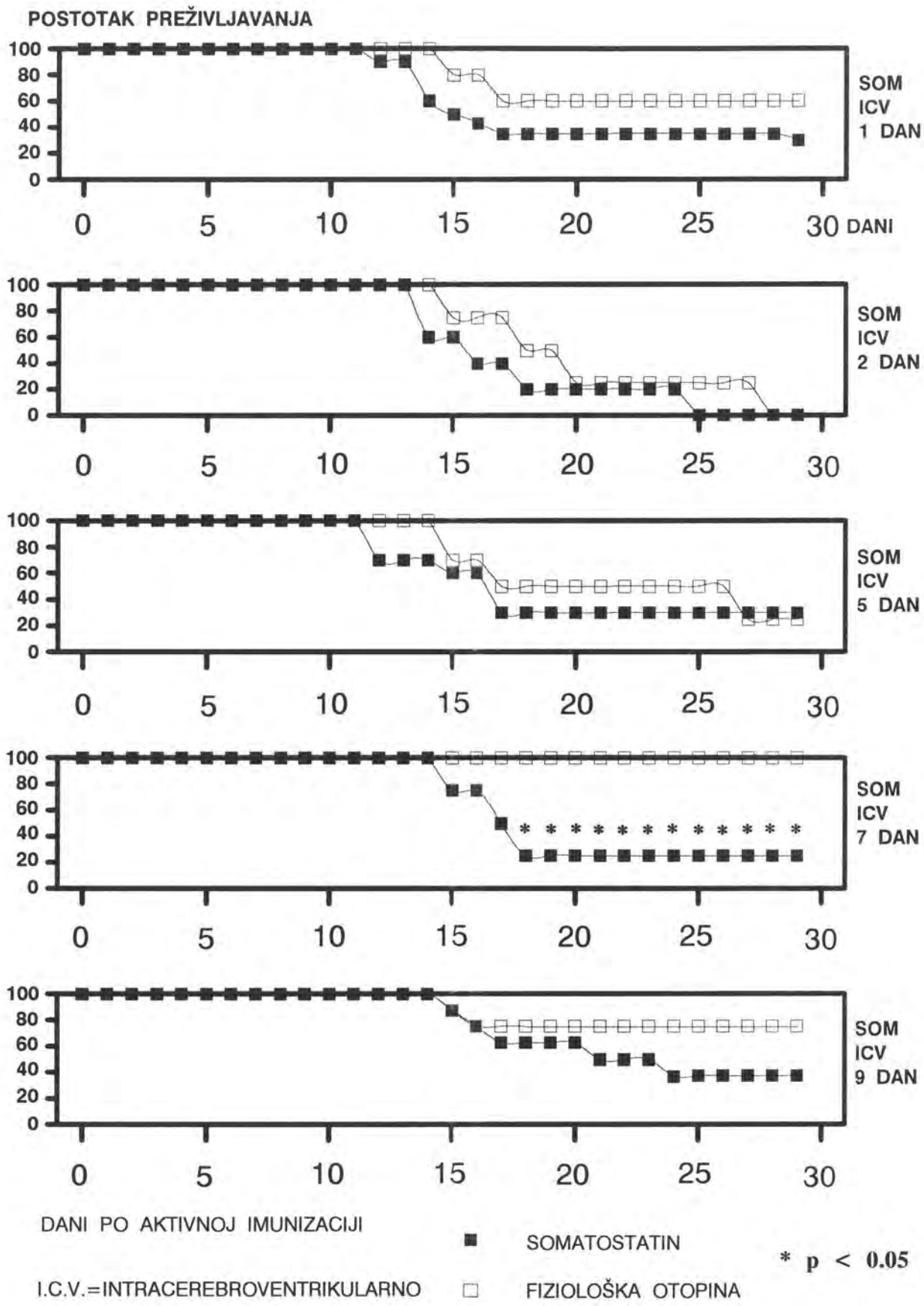
Slika 9. pokazuje utjecaj intracerebroventrikularne aplikacije somatostatina na postotak preživljavanja DA štakora oboljelih od EAE-a. Prikazani su rezultati u pokusima u kojima su somatostatin, odnosno fiziološka aplicirani prvog, drugog, petog, sedmog i devetog dana po aktivnoj imunizaciji. U svim slučajevima je postotak preživljavanja bio znatno niži u somatostatinom tretiranih životinja. To je posebno bilo izraženo u DA štakora tretiranih sedmog dana po aktivnoj imunizaciji gdje preživljavanje iznosi samo 25%, dok u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom preživljavanje iznosi 100% ( $p < 0.05$ ;  $\chi^2$  sa Yatesovom korekcijom).

Slika 10. pokazuje pojavu prvih kliničkih znakova EAE-a u DA štakora tretiranih somatostatinom intracerebroventrikularno. Jedino je grupa tretirana devetog dana po aktivnoj imunizaciji imala statistički značajnu odgodu pojave prvih kliničkih znakova EAE-a u odnosu na kontrolnu skupinu životinja ( $p < 0.01$ - Mann-Whitney Wilcoxon-ov test).

Slika 11. pokazuje srednje vrijeme nastupa smrti u DA štakora tretiranih somatostatinom ili fiziološke otopine u različitim intervalima po aktivnoj imunizaciji (prvog, drugog, petog, sedmog i devetog dana). Pokazuje se da somatostatin skraćuje vijek preživljavanja u DA štakora tretiranih somatostatinom sedmog dana po aktivnoj imunizaciji u usporedbi sa kontrolnom skupinom životinja tretiranih fiziološkom otopinom koja nije prikazana jer u toj grupi nije došlo do razvoja fatalnog EAE-a ( $p < 0.01$ -t test). Kontrolna skupina životinja u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom sedmog dana po aktivnoj imunizaciji nije prikazana jer je preživjela 30-ti dan po aktivnoj imunizaciji.

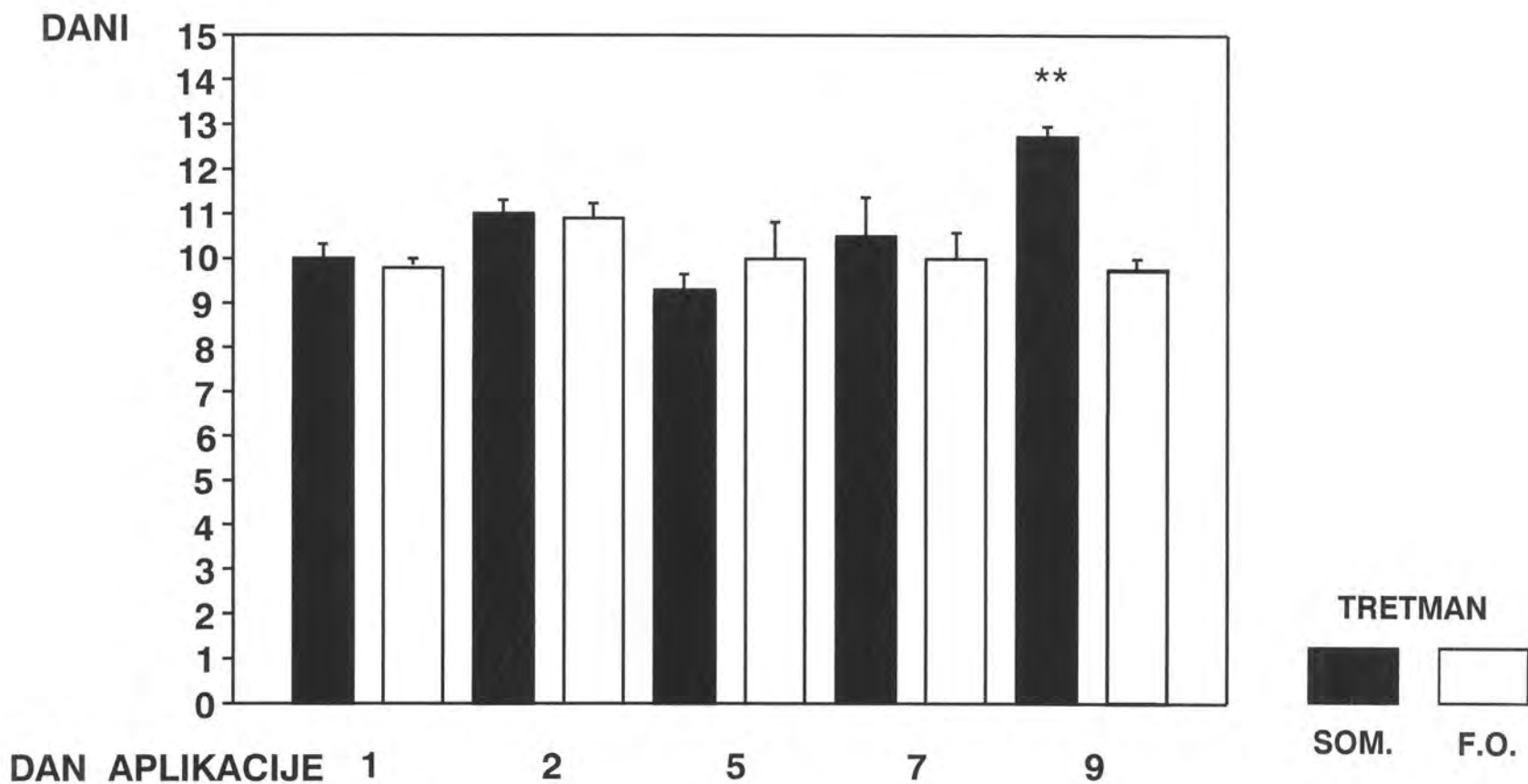
#### 4.1.2. INJICIRANJE SOMATOSTATINA PERIFERNO (SUBKUTANO) U DA ŠTAKORA (OSJETLJIVI SOJ)

Način injiciranja i eksperimentalni protokol opisali smo u odsječku Plan pokusa (3.7) i prikazali na Slici 2.



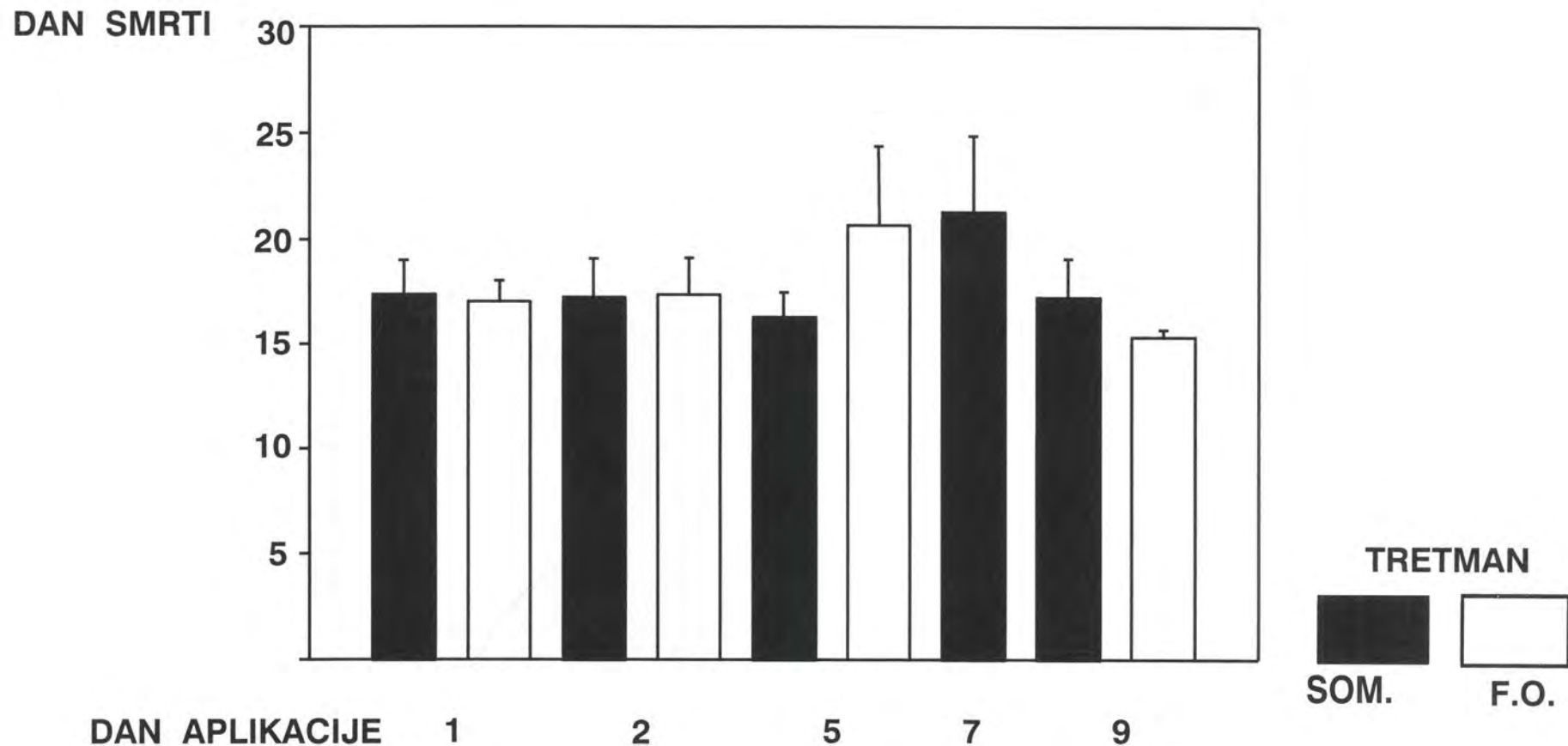
Slika 9. UTJECAJ INTRACEREBROVENTRIKULARNO APLICIRANOG SOMATOSTATINA NA POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA U DA ŠTAKORA SA EKSPERIMENTALNIM ALERGIJSKIM ENCEFALOMIJELITISOM





\*\* P < 0.05 (Mann-Whitney-Wilcoxon test)

Slika 10. POJAVA PRVIH KLINIČKIH ZNAKOVA EAE U DA ŠTAKORA  
TRETIRANIH SOMATOSTATINOM INTRACEREBROVENTRIKULARNO



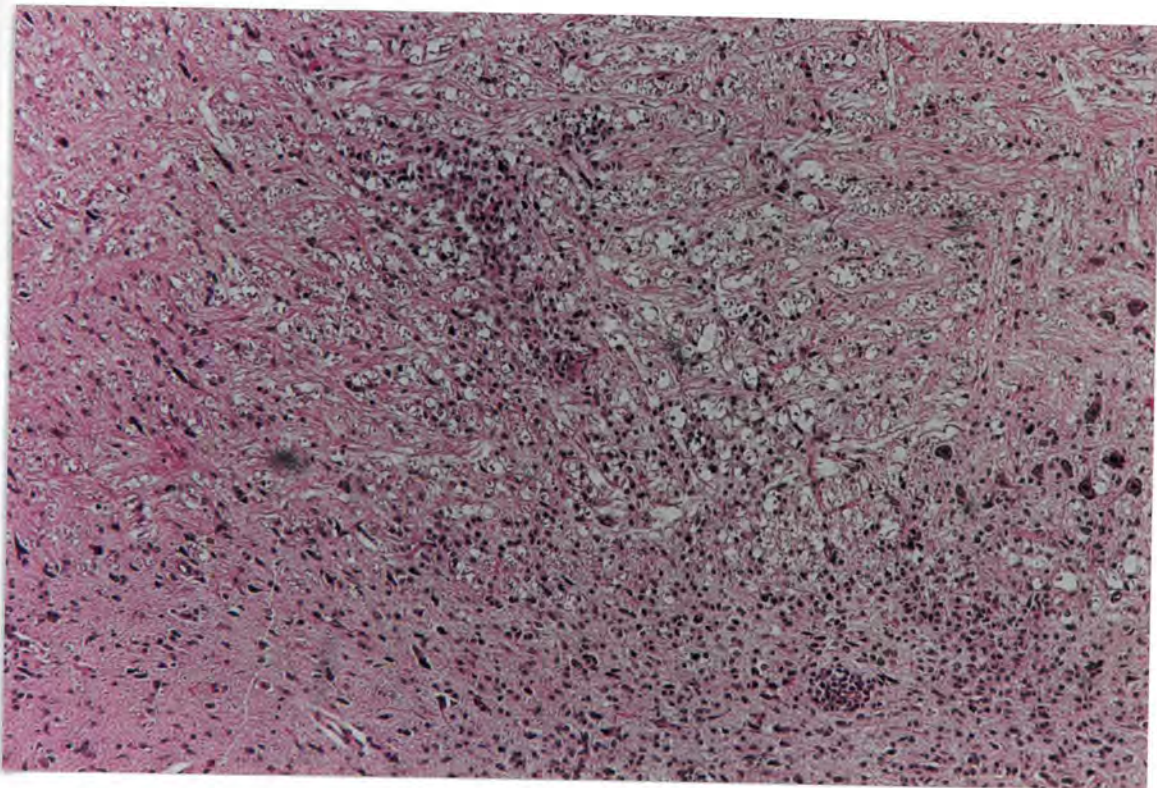
Slika 11. SREDNJE VRIJEME (DAN) NASTUPA SMRTI U DA ŠTAKORA INJICIRANIH SOMATOSTATINOM INTRACEREBROVENTRIKULARNO

#### 4.1.2.1. INJICIRANJE PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

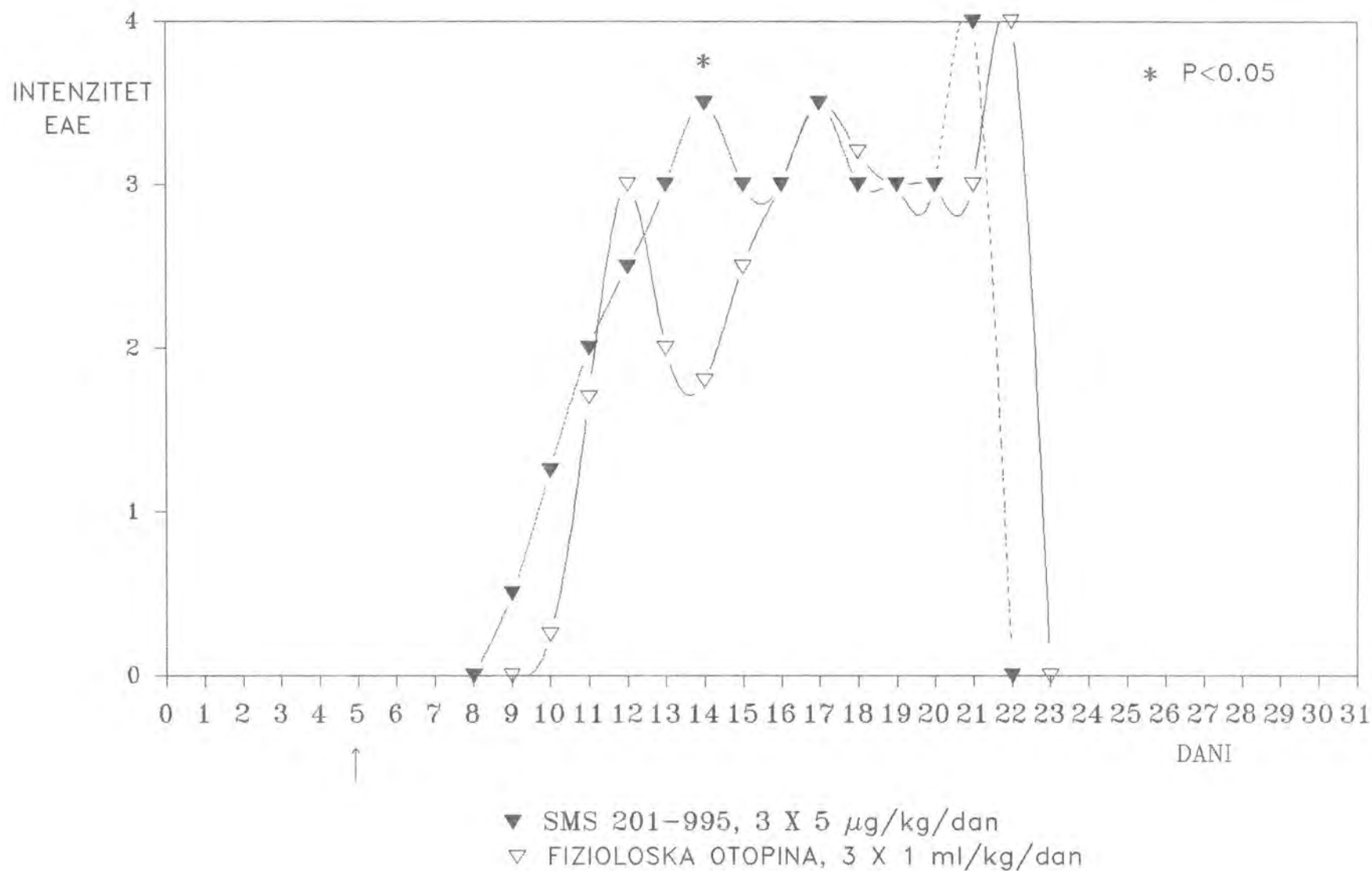
##### 4.1.2.1.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 12. prikazuje utjecaj somatostatina apliciranog periferno (subkutano) **petog** dana po aktivnoj imunizaciji. U grupi tretiranoj somatostatinom kao i u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom došlo je do indukcije kliničkih znakova EAE-a. Statistički značajna razlika u intenzitetu kliničke slike primjećena je 14-og dana po aktivnoj imunizaciji. Prosječni intenzitet kliničke slike iznosio je  $3.5 \pm 0.22$  u grupi tretiranoj somatostatinom te  $1.8 \pm 0.48$  u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom što se značajno razlikuje ( $p < 0.05$ - Mann-Whitney-Wilcoxon-ov test). Simptomi su trajali do 23. dana u grupi tretiranoj somatostatinom odnosno do 24. dana u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom. Naime, u te su dane uginule i posljednje životinje u ovim grupama.

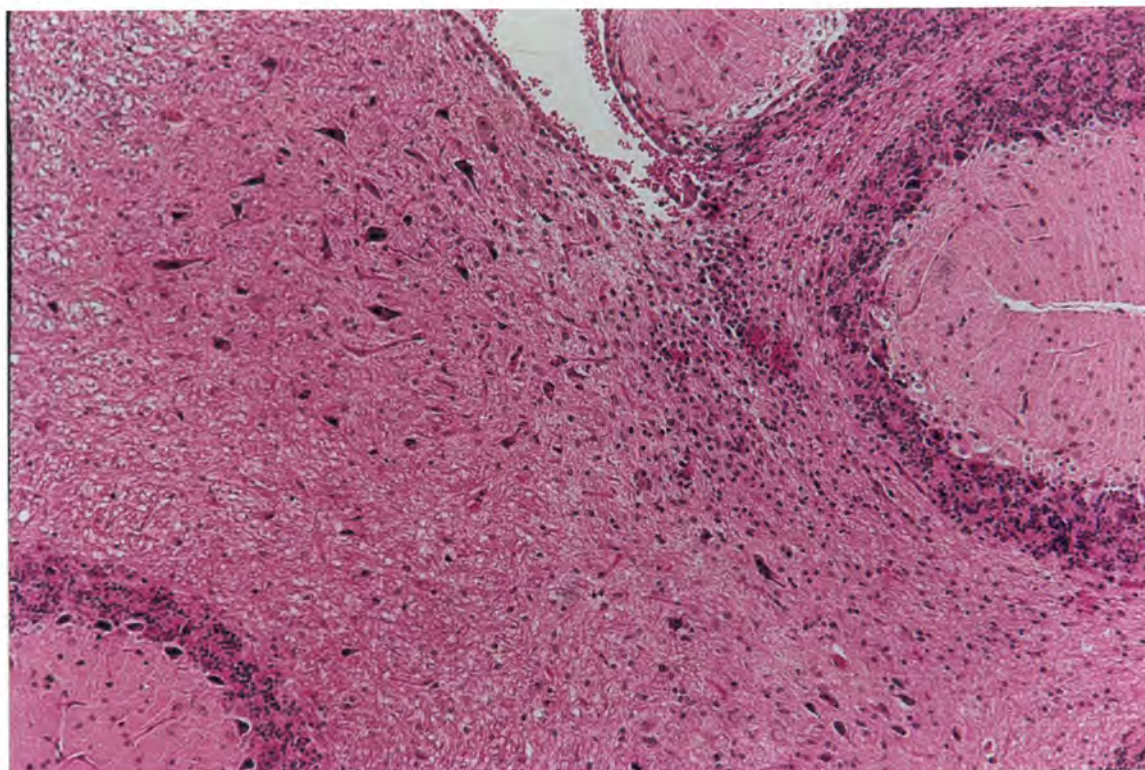
Slijedeće dvije Slike (Slika 31. i Slika 32.) prikazuju moždano tkivo DA štakora tretiranih periferno (subkutano) somatostatinom (Slika 31.) i fiziološkom otopinom (Slika 32.) **petog** dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 31. prikazuje moždano tkivo DA štakora tretiranog somatostatinom periferno (subkutano) **petog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika prikazuje infiltrate upalnih stanica kako perivaskularno tako i difuzno u moždanom tkivu. Preparat je napravljen 15-og dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 12. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG PERIFERNO (SUBKUTANO) PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA

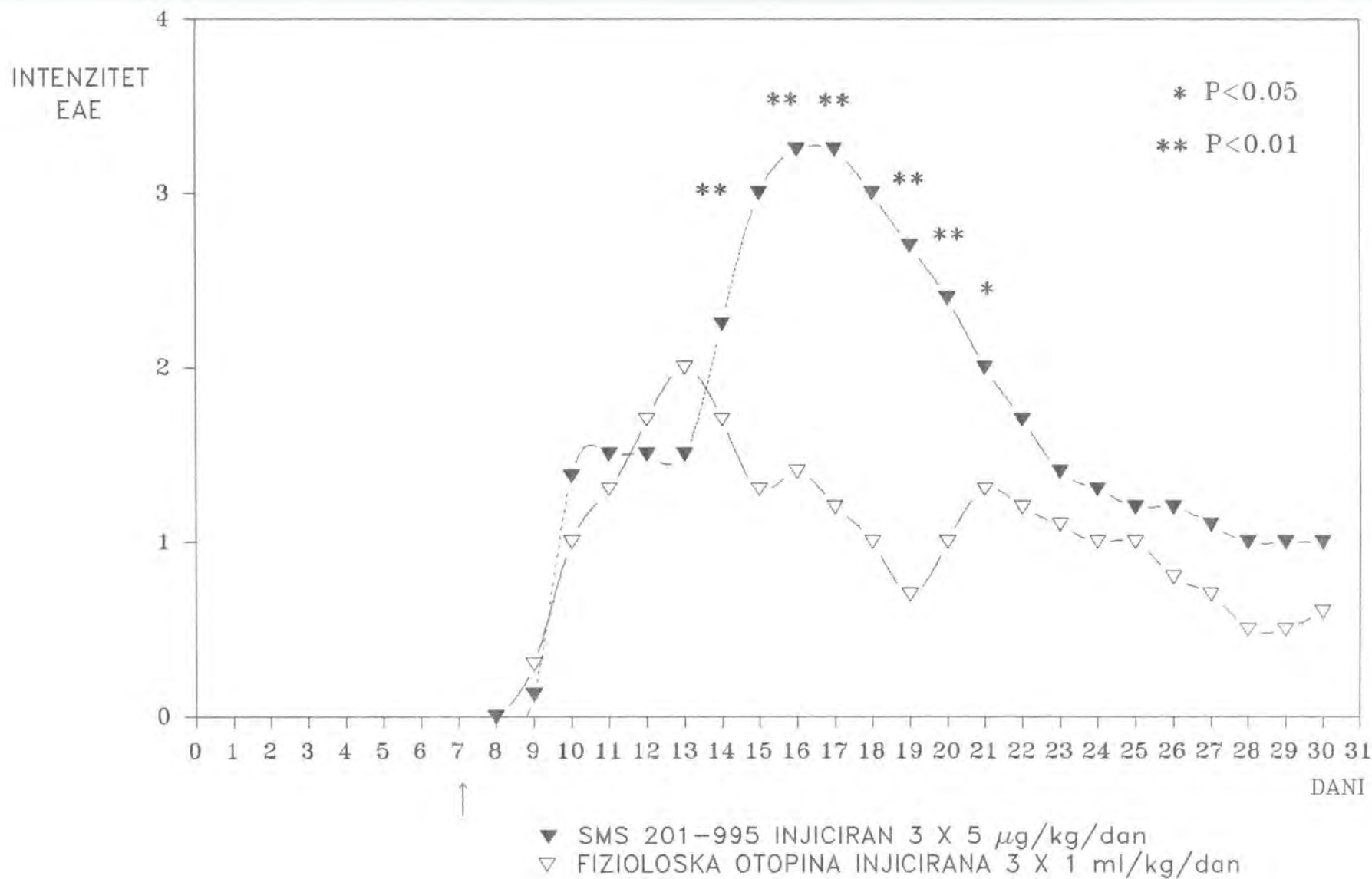


Slika 32. prikazuje moždano tkivo DA štakora tretiranog fiziološkom otopinom periferno (subkutano) **petog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vide se perivaskularne infiltrate upalnih stanica. Preparat je napravljen 15-og dana po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.1.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

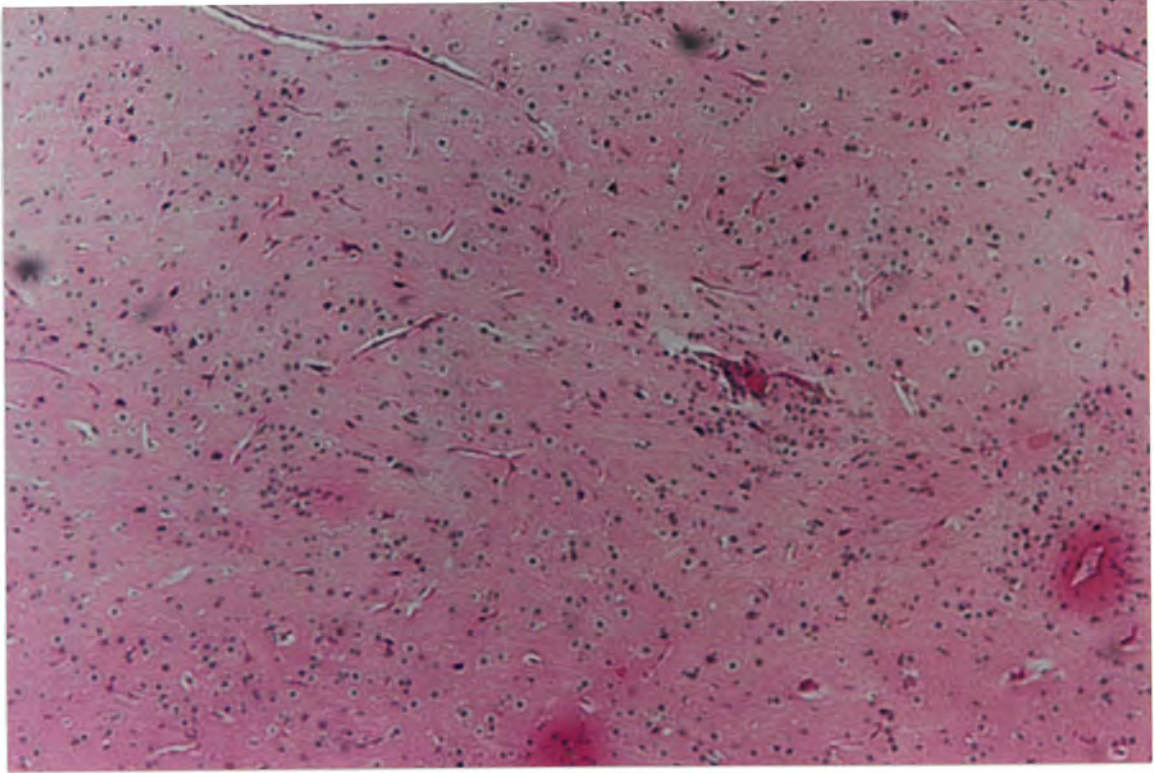
##### 4.1.2.2.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 13. prikazuje utjecaj somatostatina apliciranog periferno (subkutano) **sedmog** dana po aktivnoj imunizaciji. Žestina simptoma kliničke slike u grupi tretiranoj somatostatinom bila je izrazito pojačana u usporedbi sa grupom tretiranom fiziološkom otopinom. Statistički značajno povećanje intenziteta kliničke slike primjećeno je 15-og dana po aktivnoj imunizaciji ( $X=3 \pm 0.15$ ) u grupi tretiranoj somatostatinom u odnosu na ( $X=1.3 \pm 0.13$ ) u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom; ( $p<0.01$ ). U razdoblju od 15-og do 20-og dana po aktivnoj imunizaciji žestina simptoma bolesti je značajno pojačana u grupi tretiranoj somatostatinom u usporedbi sa grupom tretiranom fiziološkom otopinom. Interesantno je zamijetiti odgođenu pojavu akutnog stadija bolesti u grupi tretiranoj somatostatinom, u vrijeme u kojem se pojavljuje kratkotrajna remisija u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom.

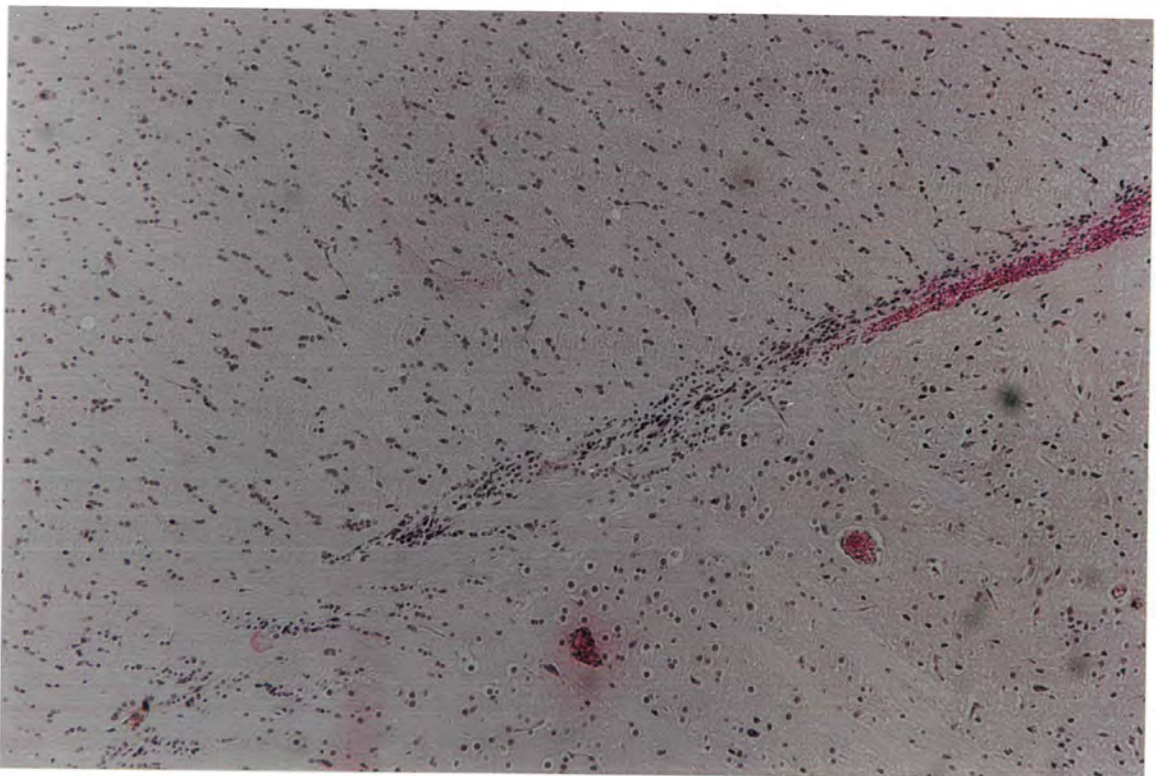


Slika 13. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG PERIFERNO (SUBKUTANO) SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U DA STAKORA

Slijedeće dvije Slike (Slika 33. i Slika 34.) pokazuju histološke preparate DA štakora tretiranih periferno somatostatinom (Slika 33.) i fiziološkom otopinom (Slika 34.) **sedmog** dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 33. (Slika iznad teksta) prikazuje moždano tkivo DA štakora periferno tretiranog somatostatinom **sedmog** dana po aktivnoj imunizaciji. Perivaskularni infiltrat smješten je malo desno od središta slike. Preparat je napravljen 15-og dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 34. (predhodna stranica) prikazuje moždano tkivo DA štakora periferno tretiranog fiziološkom otopinom **sedmog** dana po aktivnoj imunizaciji. Infiltrat upalnih stanica smješten u blizini krvne žile. Preparat je napravljen 15-og dana po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.2. UČINCI SOMATOSTATINA INJICIRANOG CENTRALNO ILI PERIFERNO U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ)

##### 4.2.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA U MOŽDANE VENTRIKULE

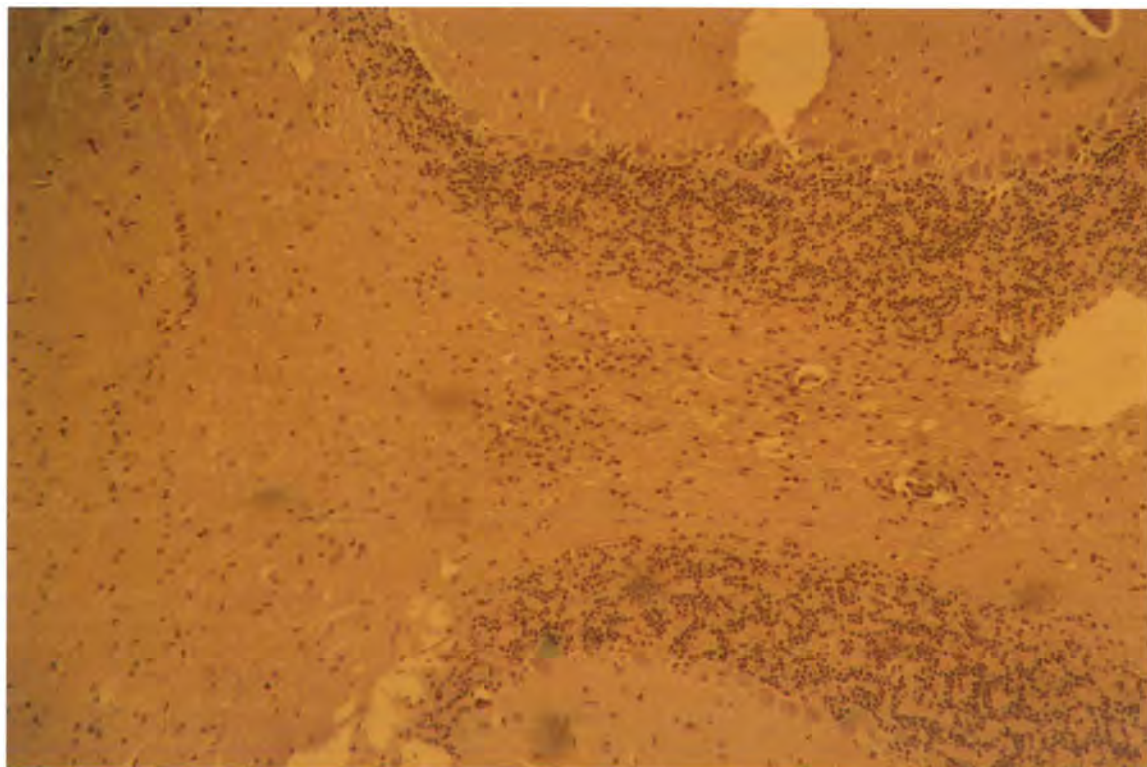
##### 4.2.1.1. INJICIRANJE SOMATOSTATINA U AO ŠTAKORA DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

##### 4.2.1.1.1. KLINIČKA SLIKA

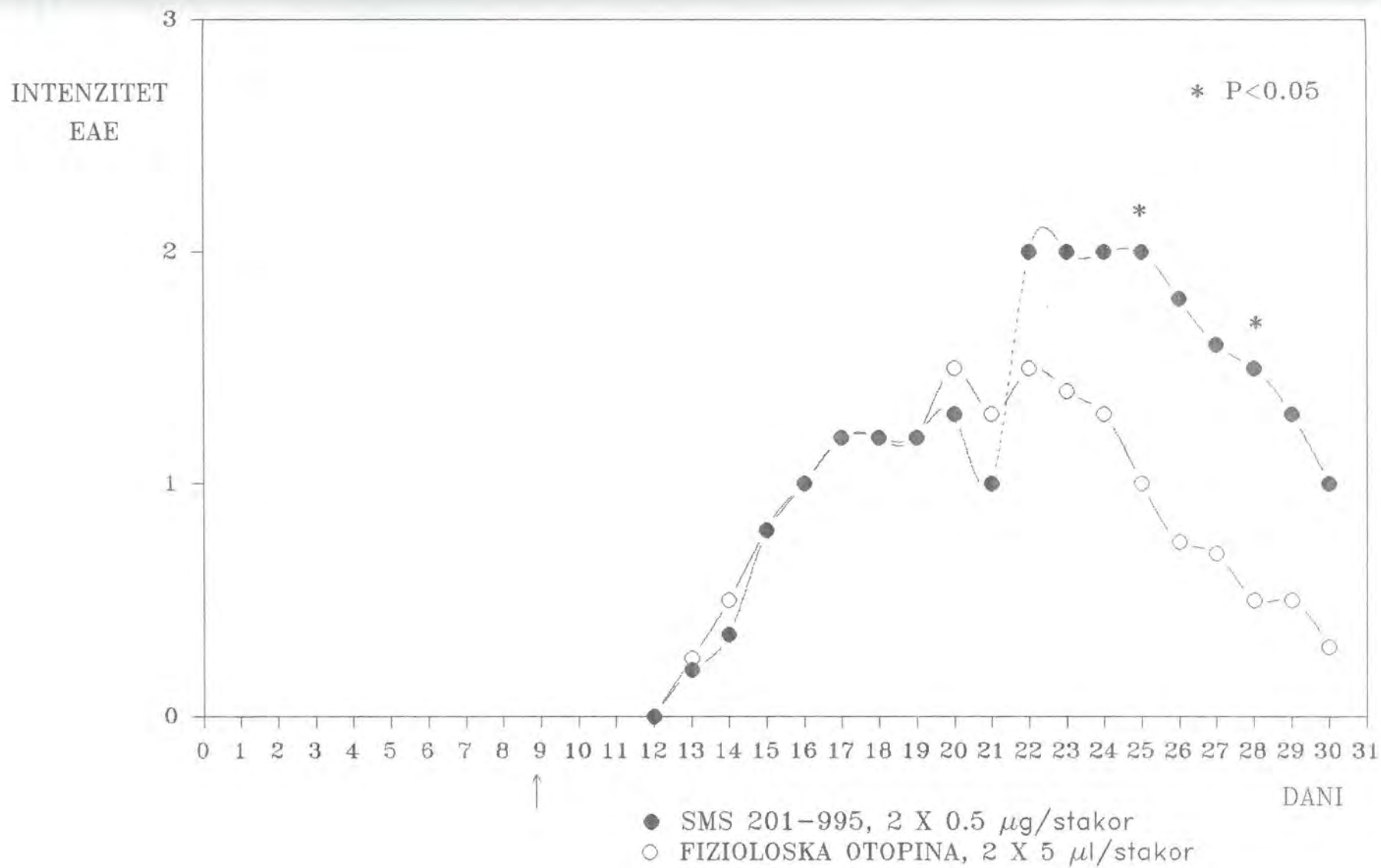
Način injiciranja i eksperimentalni protokol opisali smo u odsječku Plan pokusa (3.7) i prikazali na Slici 1. (protokol g).

Slika 14. pokazuje klinički tijek EAE-a u AO štakora. Centralna aplikacija somatostatina dovodi do indukcije intenzivnijih kliničkih znakova EAE-a u odnosu na grupu AO štakora tretiranu fiziološkom otopinom. Značajne razlike u intenzitetu kliničke slike bile su prisutne 25-og i 28-og dana po aktivnoj imunizaciji u grupi tretiranoj somatostatinom u odnosu na grupu tretiranu fiziološkom otopinom ( $p < 0.05$  Mann-Whitney-Wilcoxon-ov test).

Slijedeće dvije Slike (Slika 35. i Slika 36.) prikazuju histološke preparate mozga AO štakora tretiranih somatostatinom intracerebroventrikularno **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji somatostatinom (Slika 35.) i fiziološkom otopinom (Slika 36.).

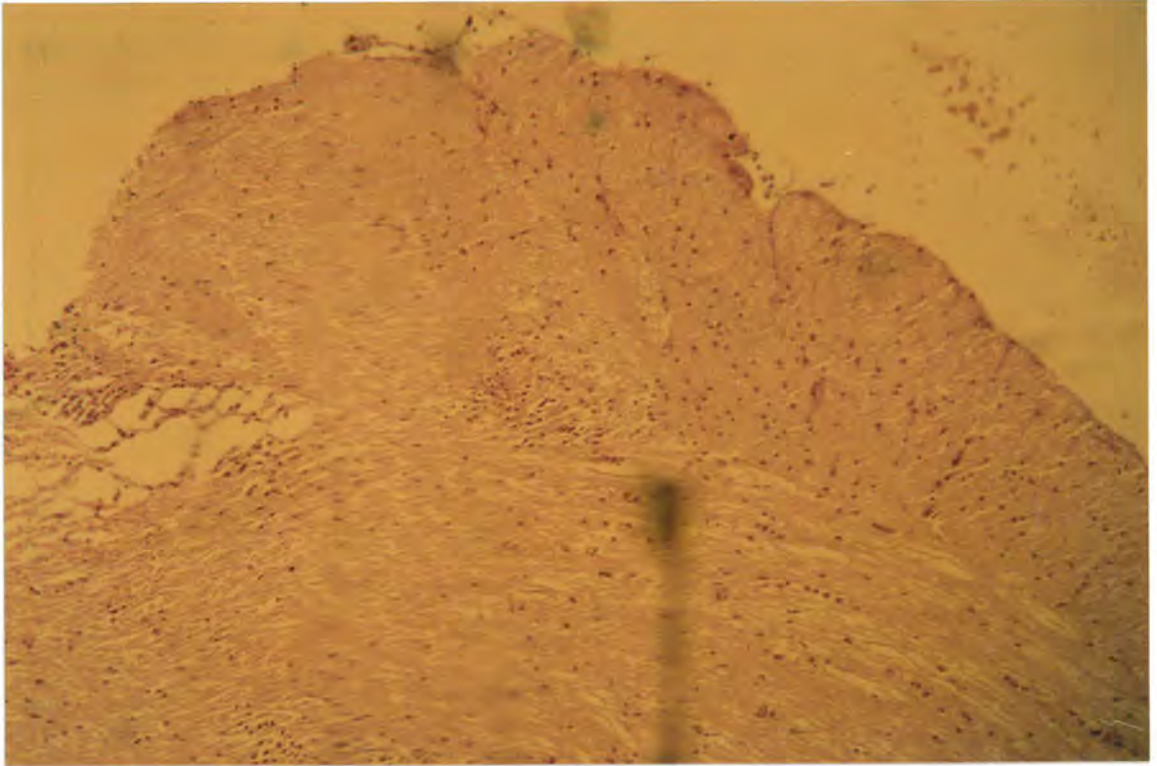






Slika 14. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG INTRACEREBROVENTRIKULARNO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U AO STAKORA

Slika 35. (prethodna stranica) prikazuje tkivo malog mozga AO štakora tretiranog somatostatinom intracerebroventrikularno **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. U središtu slike unutar bijele tvari vidi se difuzna nakupina upalnih stanica. Preparat je napravljen 34-og dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 36. prikazuje leđnu moždinu AO štakora tretiranog intracerebroventrikularno fiziološkom otopinom **devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika prikazuje difuznu nakupinu upalnih stanica unutar moždanog tkiva. Preparat je napravljen 34-og dana po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ)

##### 4.2.2.1. UTJECAJ DOZE I VREMENA INJICIRANJA SOMATOSTATINA NA INDUKCIJU KLINIČKIH ZNAKOVA EAE-A U AO ŠTAKORA (RELATIVNO REZISTENTNI SOJ)

Način injiciranja i eksperimentalni protokol opisani su u odsječku Plan pokusa (3.7) i prikazali na Slici 1. (protokoli a-f).

PROTOKOL	SOMATOSTATIN		FIZIOLOŠKA OTOPINA	
	BOLESNI/ UKUPNO BROJ	%	BOLESNI/ UKUPNO BROJ	%
(3x1) 1. DAN PO A. I.	3/17	17	6/17	35
3x(3x1) 1.-3. DAN PO A. I.	2/5	40	0/5	0
(3x1) 5. DAN PO A. I.	3/11	27	4/12	33
(3x1) 7. DAN PO A. I.	1/6	16	1/6	16
3x(3x1) 7.-9. DAN PO A. I.	11/20*	55	3/17	17
(3x1) 9. DAN PO A. I.	1/10	10	1/10	10

A. I. = AKTIVNA IMUNIZACIJA

\*  $p < 0.05$  SOMATOSTATIN : FIZIOLOŠKA OTOPINA

**Tablica 1. INDUCIBILNOST EAE-A U AO ŠTAKORA  
TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO  
(SUBKUTANO)**

Ispitali smo mogućnost indukcije EAE-a u relativno rezistentnog AO soja štakora nakon perifernog tretmana somatostatinom. Pri tome smo koristili različite aplikacijske protokole u kojima je somatostatin apliciran svakih osam sati po aktivnoj imunizaciji: prvi, prvi do treći, peti, sedmi, sedmi do deveti i deveti dan. Vrijeme aplikacije somatostatina prikazuje Tablica 1.. Pokazalo se da vrijeme aplikacije statistički značajno utječe na incidenciju EAE-a što je primjećeno nakon aplikacije od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ). Incidencija EAE-a je varirala od 10% u grupi tretiranoj somatostatinom sedmog dana po aktivnoj imunizaciji do 55% u grupi tretiranoj somatostatinom od sedmog do devetog dana.

Kontrolna skupina AO štakora bila je tretirana fiziološkom otopinom u istim vremenskim intervalima. Incidencija EAE-a varirala je od totalne odsutnosti nakon aplikacije od prvog do trećeg dana do 35% u grupi tretiranoj prvog dana po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.2.2.2. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

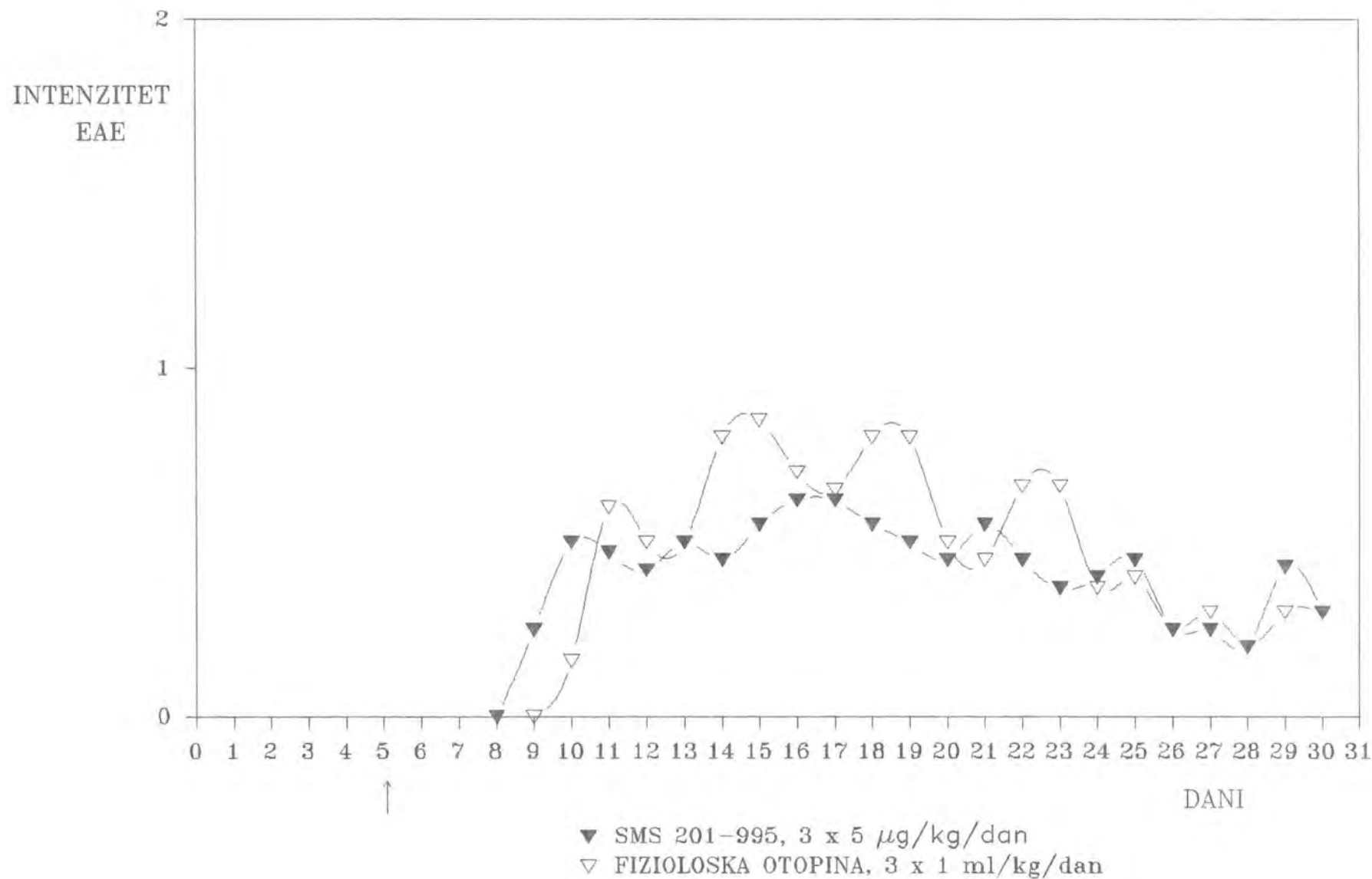
##### 4.2.2.2.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 15. pokazuje utjecaj aplikacije somatostatina **petog** dana po aktivnoj imunizaciji na razvoj kliničke slike EAE-a u AO štakora. Uočljivo je da u ovom periodu somatostatin ne dovodi do indukcije EAE-a.

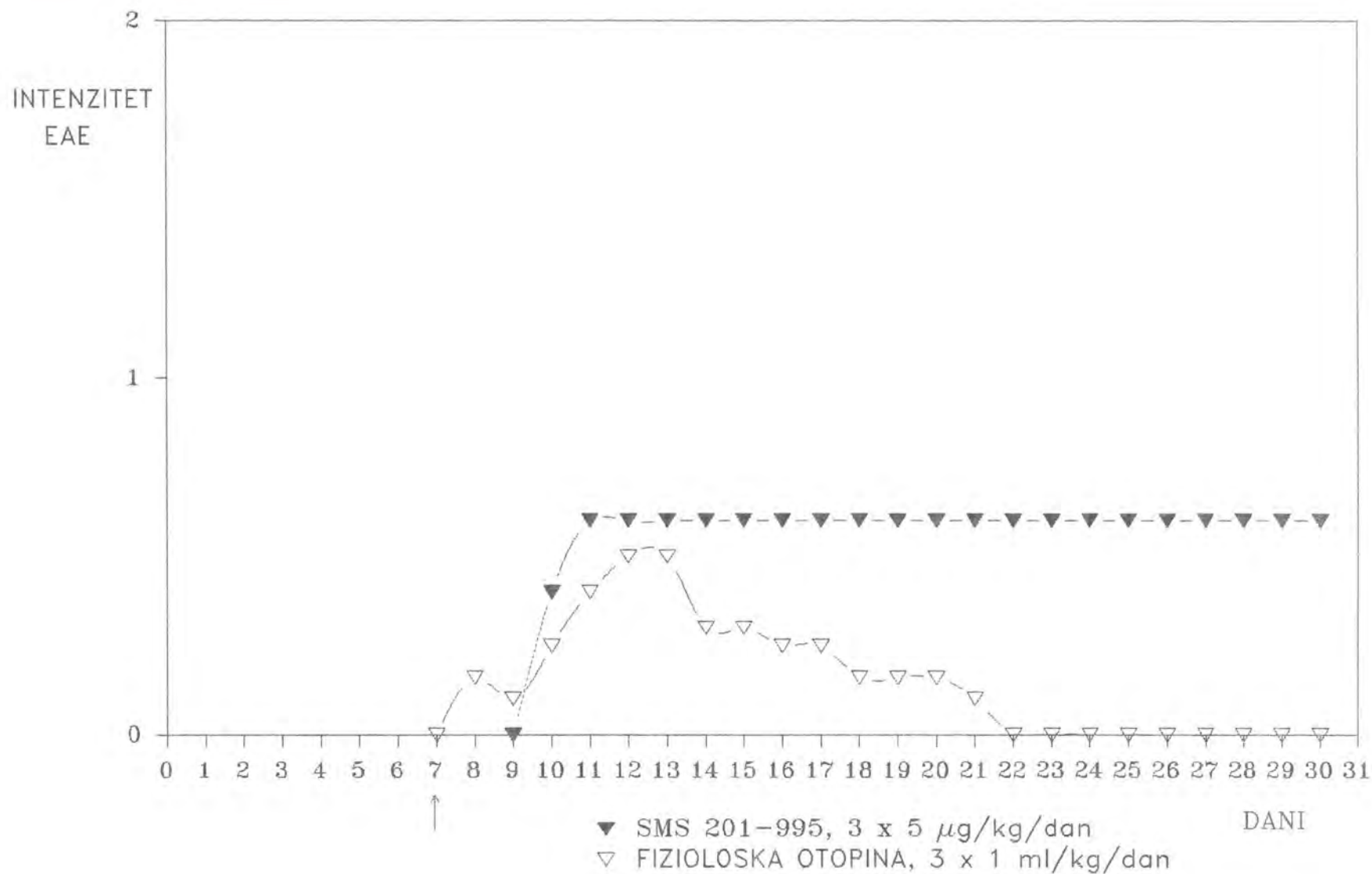
#### 4.2.2.3. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

##### 4.2.2.3.1. KLINIČKA SLIKA

Slika 16. prikazuje utjecaj aplikacije somatostatina **sedmog** dana po aktivnoj imunizaciji na razvoj kliničkih znakova EAE-a. U ovom intervalu nije došlo do statistički značajnih promjena u intenzitetu kliničkih znakova EAE-a između grupe tretirane somatostatinom i grupe tretirane fiziološkom otopinom. Međutim, statistički značajna razlika između grupe tretirane somatostatinom i grupe tretirane fiziološkom otopinom bila je prisutna nakon tretmana od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji.



Slika 15. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG PERIFERNO (SUBKUTANO) PETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U AO STAKORA



Slika 16. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG PERIFERNO (SUBKUTANO) SEDMOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA INTENZITET EAE U AO STAKORA

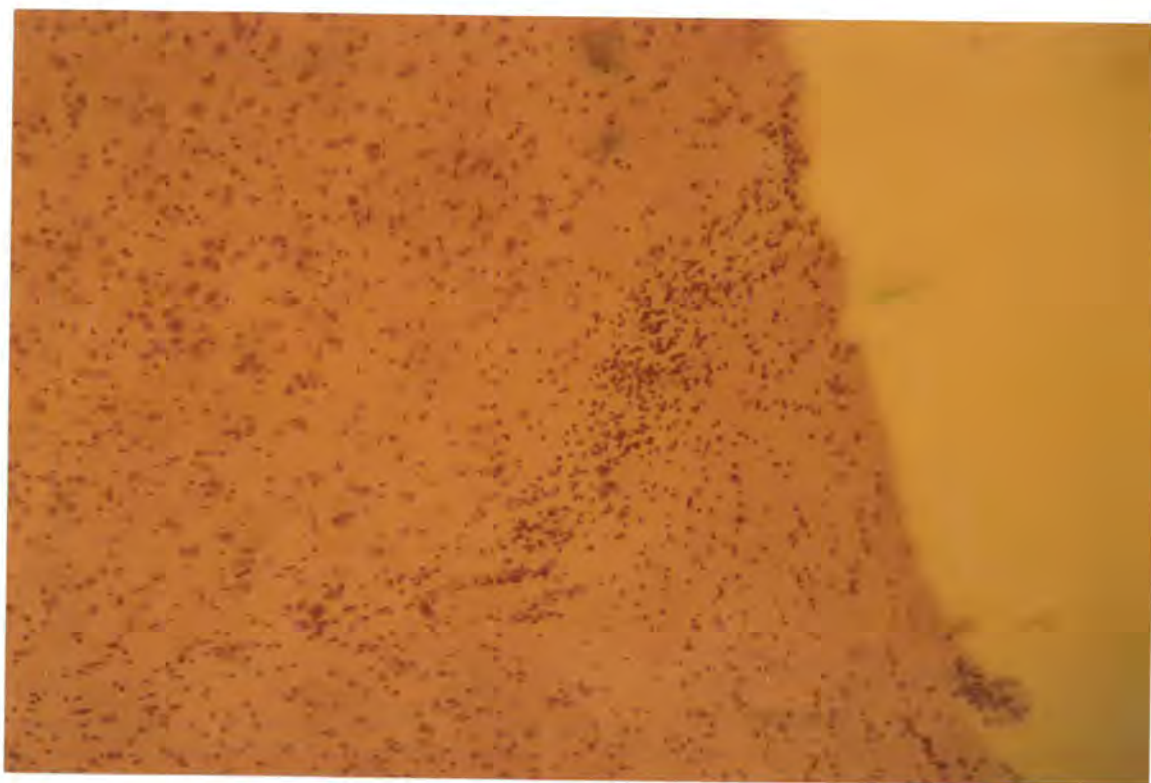
#### 4.2.2.4. PERIFERNO INJICIRANJE SOMATOSTATINA OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACJI

##### 4.2.2.4.1. KLINIČKA SLIKA I INCIDENCIJA EAE-A

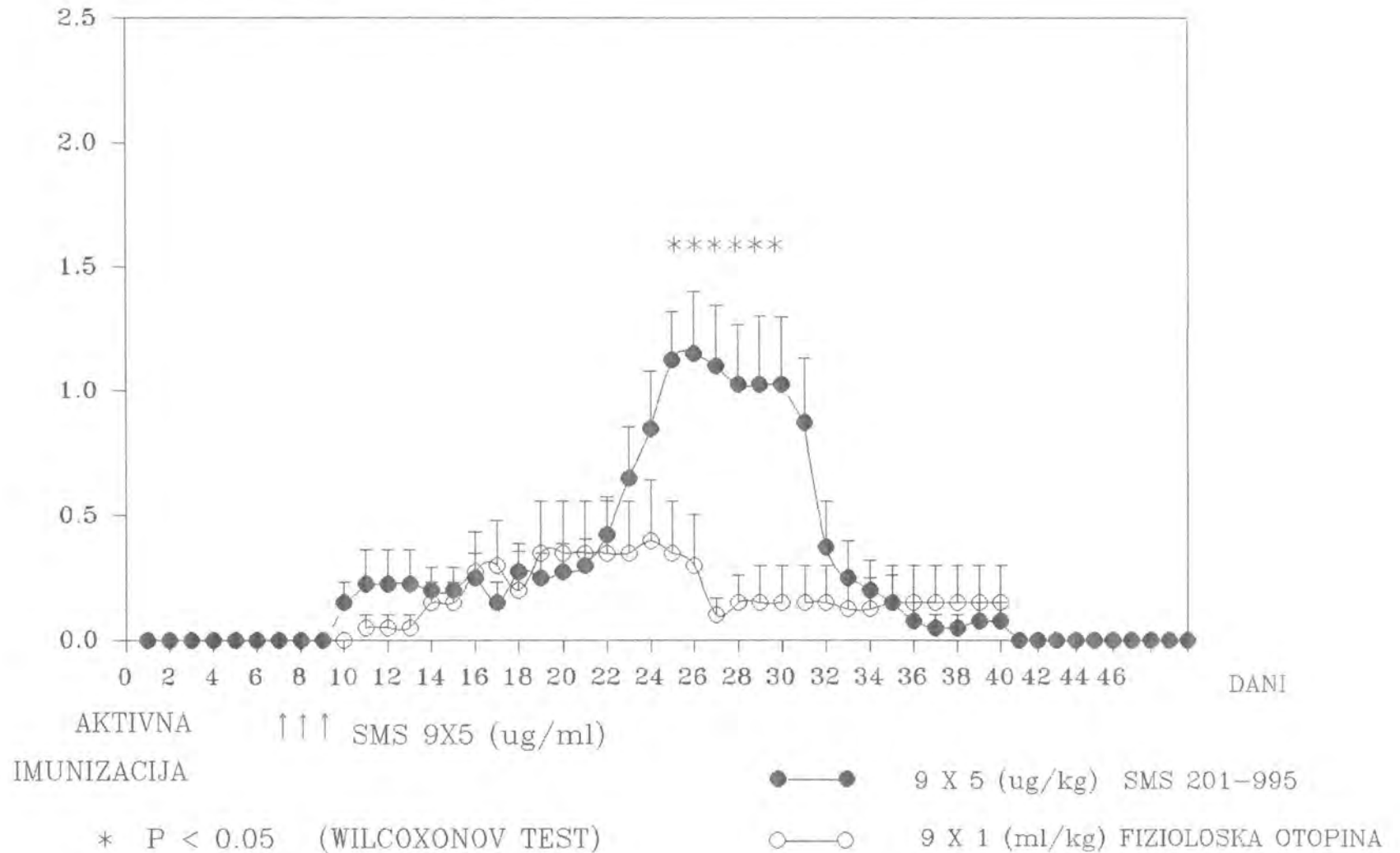
Pojavu kliničkih znakova bolesti u AO štakora nakon tretmana somatostatinom i fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji prikazuje Slika 17. Klinička slika intenziteta 1 i većeg od toga bila je prisutna od 25-og do 30-og dana po aktivnoj imunizaciji bio je statistički značajan u odnosu na prosječni klinički intenzitet grupe tretirane fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. Nakon toga dolazi do naglog pada intenziteta kliničkih znakova. Potrebno je ujedno zamijetiti da tretman somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji izaziva odgođenu pojavu prvih kliničkih znakova što govori o razvoju subakutnog oblika EAE-a.

Razlike u incidenciji EAE-a između AO štakora tretiranih somatostatinom, te AO štakora tretiranih fiziološkom otopinom u istom vremenskom intervalu, te razlika u odnosu na incidenciju EAE-a u aktivno imuniziranih životinja prikazane su na Tablici 2. Somatostatinom tretirani AO štakori razvili su kliničku sliku EAE-a u 55% slučajeva, AO štakori tretirani fiziološkom otopinom u 17%, a štakori koji su samo aktivno imunizirani u 9%. Razlika u incidenciji između grupe tretirane somatostatinom i grupe tretirane fiziološkom otopinom bila je statistički značajna ( $p < 0.05$ ), kao i razlika između grupe tretirane somatostatinom i aktivno imuniziranih životinja ( $p < 0.01$ ).

Na slijedećim Slikama vidimo histološke preparate AO štakora periferno tretiranih **somatostatinom** (Slike 37. i 38.) te **fiziološkom otopinom** (Slike 39. i 40.) od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji.



PROSJEKAN INTENZITET EAE



Slika 17. UTJECAJ SOMATOSTATINA APLICIRANOG PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI NA PROSJEKAN INTENZITET EAE U AO STAKORA



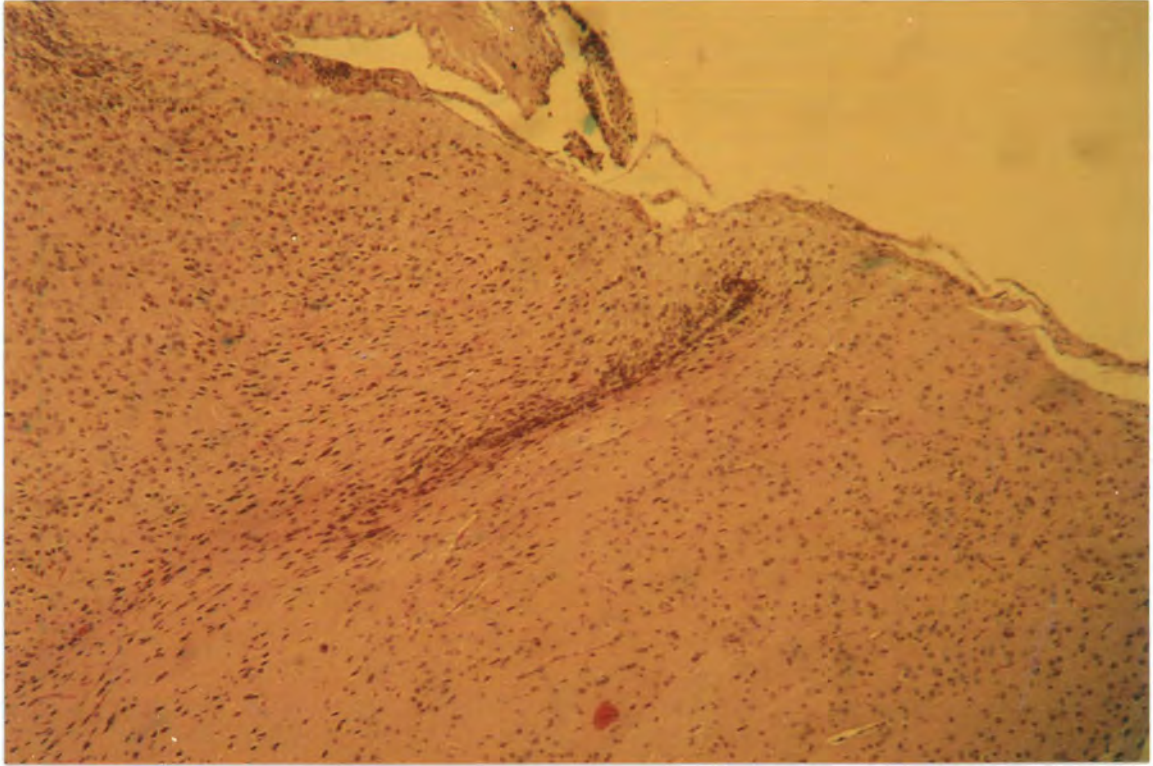
protokol	bolesni/zdravi	postotak
a) sms 201-995	11/20 b*,c**	55
b) fiziološka otopina	3/17	17
c) neinjicirani	2/22	9

b \*       $p < 0.05$

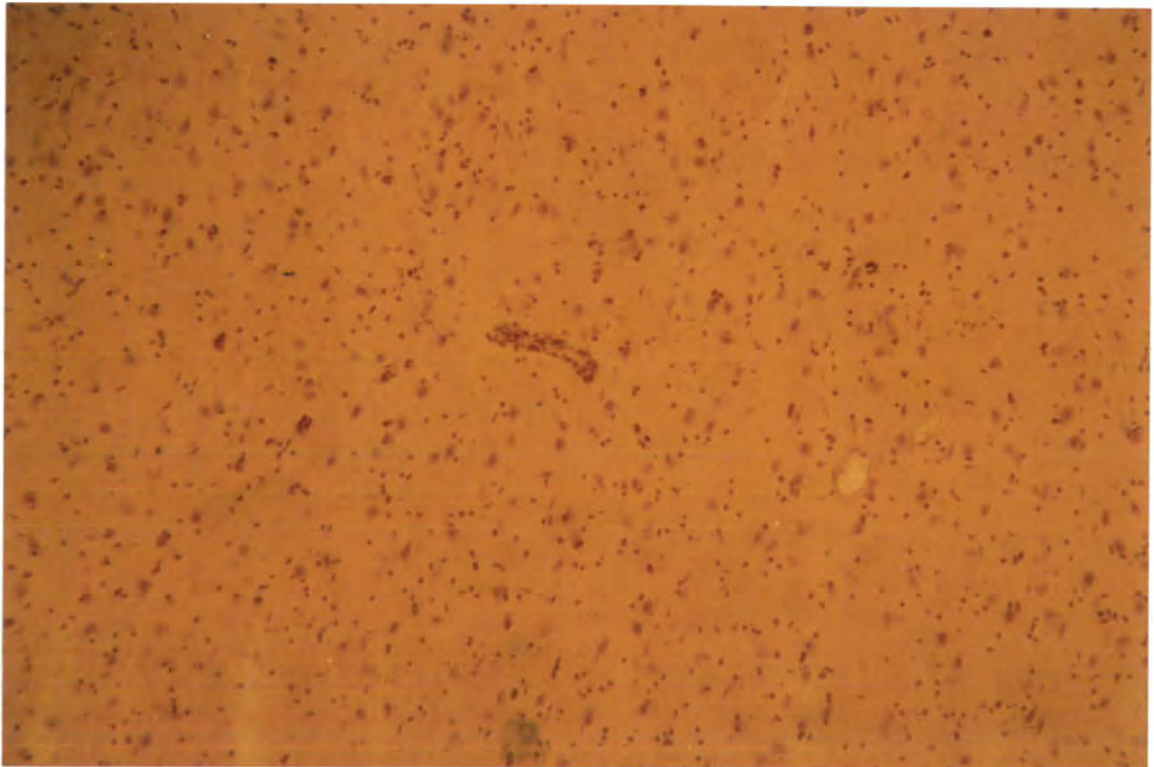
c \*\*      $p < 0.01$

Tablica 2. INDUCIBILNOST EAE U AO ŠTAKORA TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

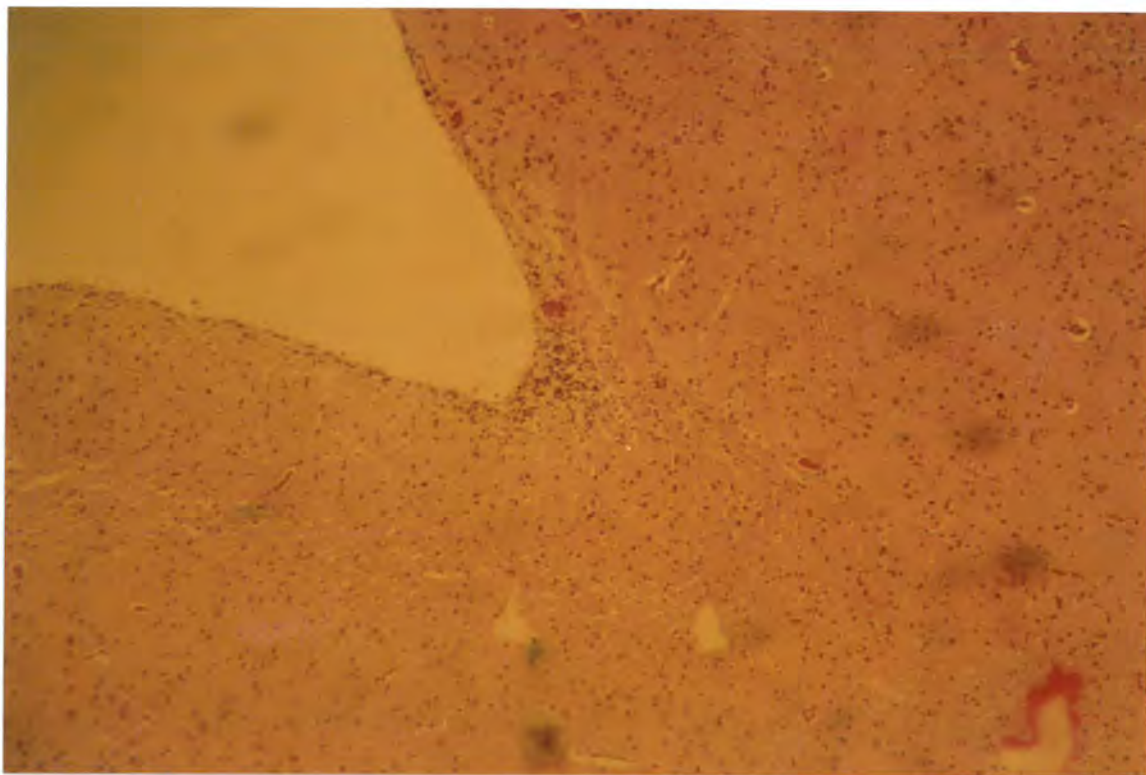
Na Slici 37. (prethodna stranica) vidimo moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Možemo vidjeti infiltrat upalnih stanica na površini i unutar moždanog tkiva. Preparat je napravljen 46. dan po aktivnoj imunizaciji.



Slika 38. (Slika iznad teksta) prikazuje moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika prikazuje infiltrate upalnih stanica smještene perivaskularno i difuzno unutar moždanog parenhima. Preparat je napravljen 126. dan po aktivnoj imunizaciji.

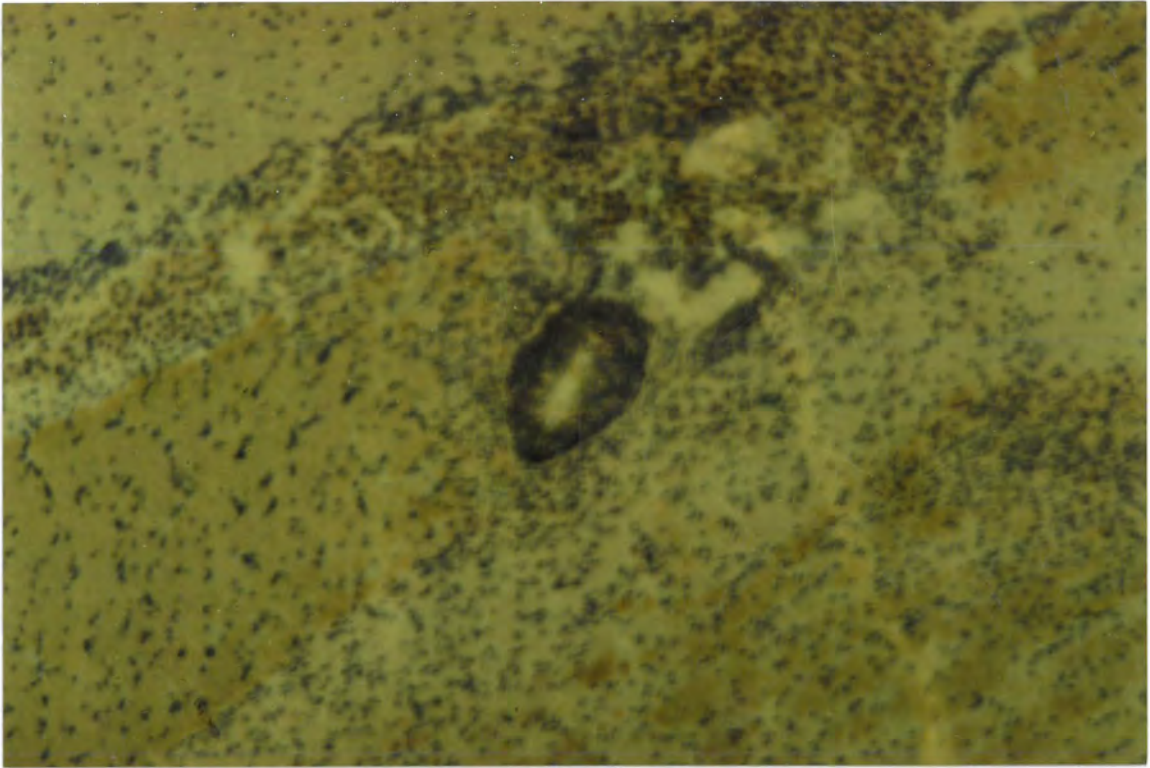


Slika 39. (prethodna stranica) prikazuje moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **fiziološkom otopinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Prikazan je presjek krvne žile u moždanom parenhimu. Ne vide se infiltrati upalnih stanica. Preparat je napravljen 46. dan po aktivnoj imunizaciji.

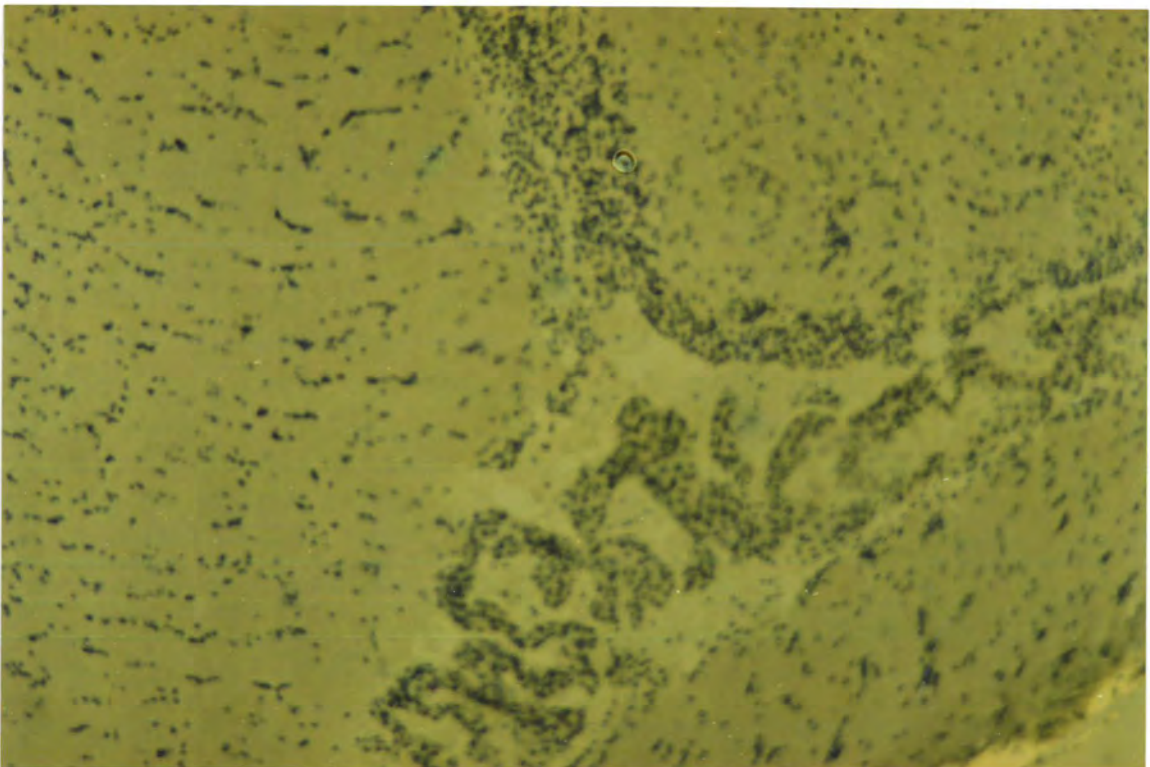


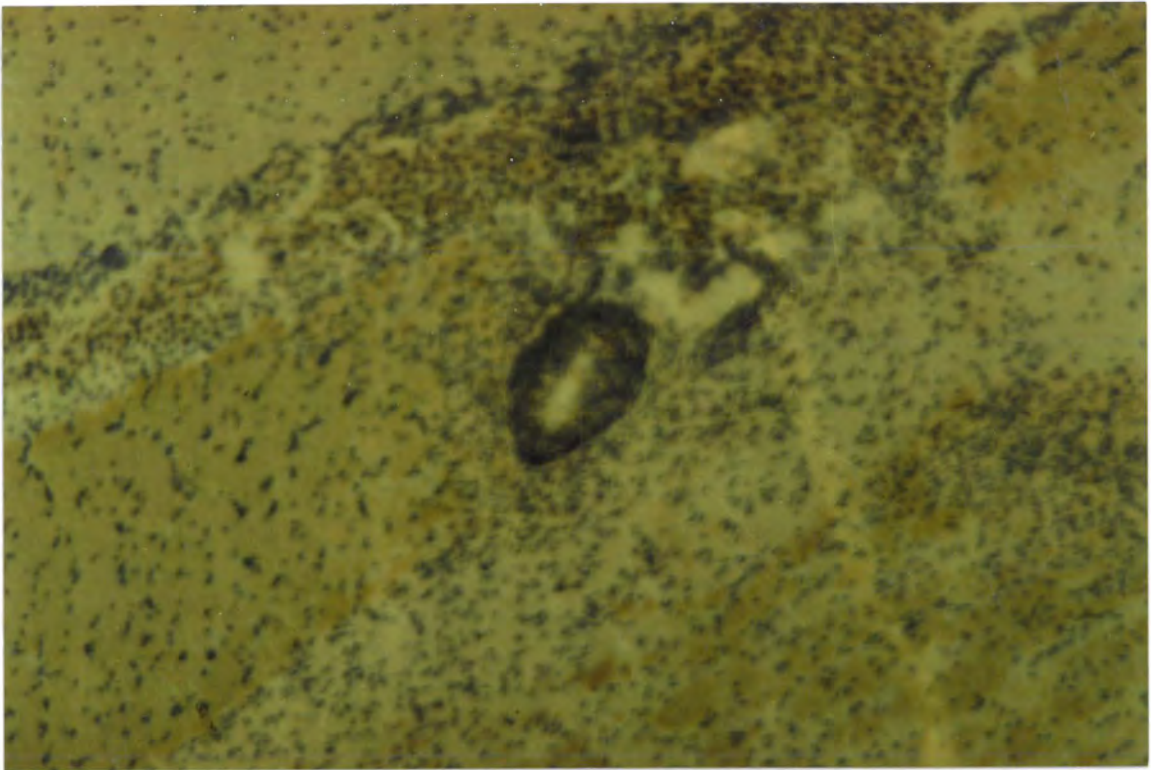
Slika 40. prikazuje infiltrat upalnih stanica neposredno ispod moždane površine u AO štakora tretiranog **fiziološkom otopinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Preparat je napravljen 126-og dana po aktivnoj imunizaciji.

Slijedeće Slike (Slike 41.-51.) prikazuju imunohistološke preparate moždanog tkiva AO štakora periferno tretiranih **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji (Slike 41-46) dok moždano tkivo AO štakora tretiranih **fiziološkom otopinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji prikazuju Slike 47.-51. Svi imunohistološki preparati napravljeni su 46-og dana po aktivnoj imunizaciji.

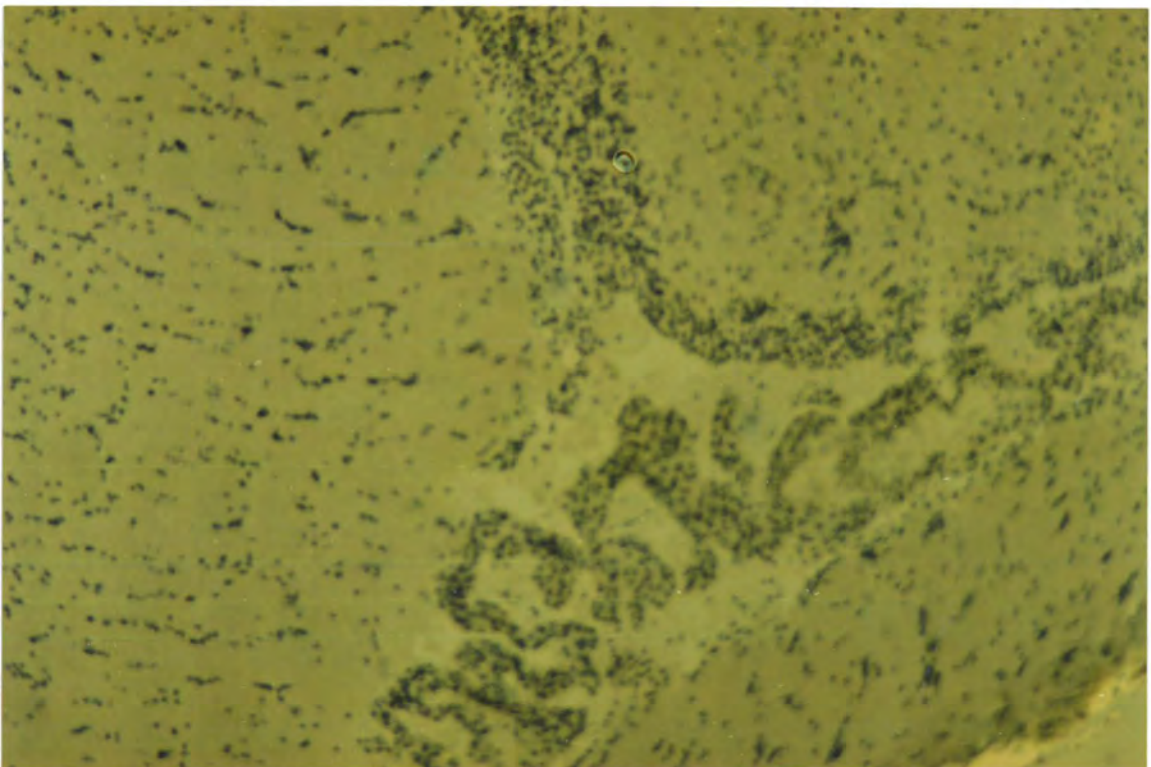


Slika 41. (Slika iznad teksta) prikazuje kontrolni preparat moždanog tkiva AO štakora periferno tretiranog somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. Ne vide se pozitivne stanice. (povećanje 400x).

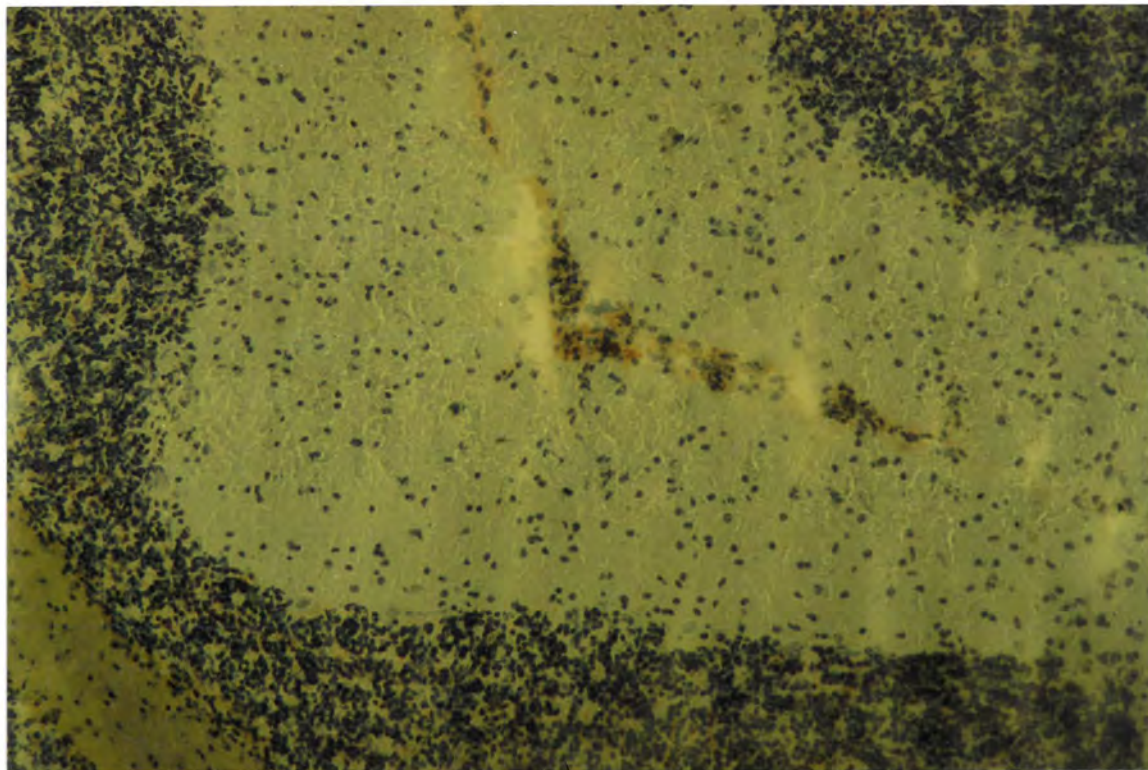




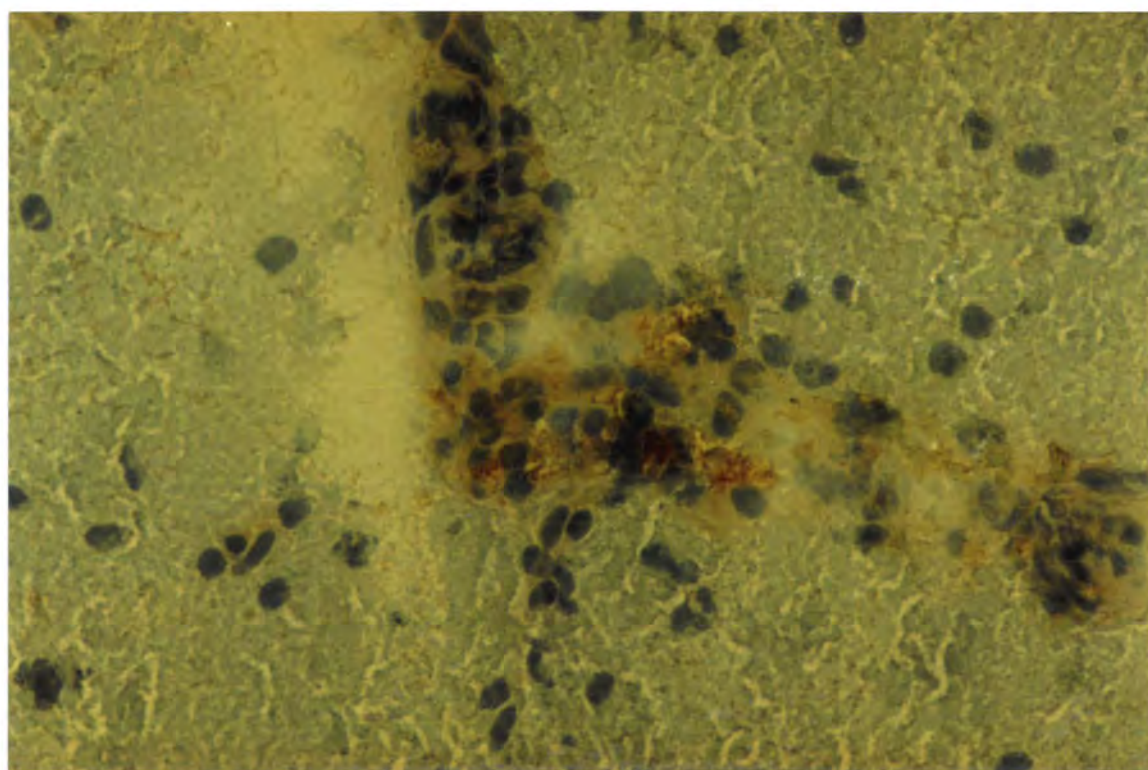
Slika 41. (Slika iznad teksta) prikazuje kontrolni preparat moždanog tkiva AO štakora periferno tretiranog somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. Ne vide se pozitivne stanice. (povećanje 400x).



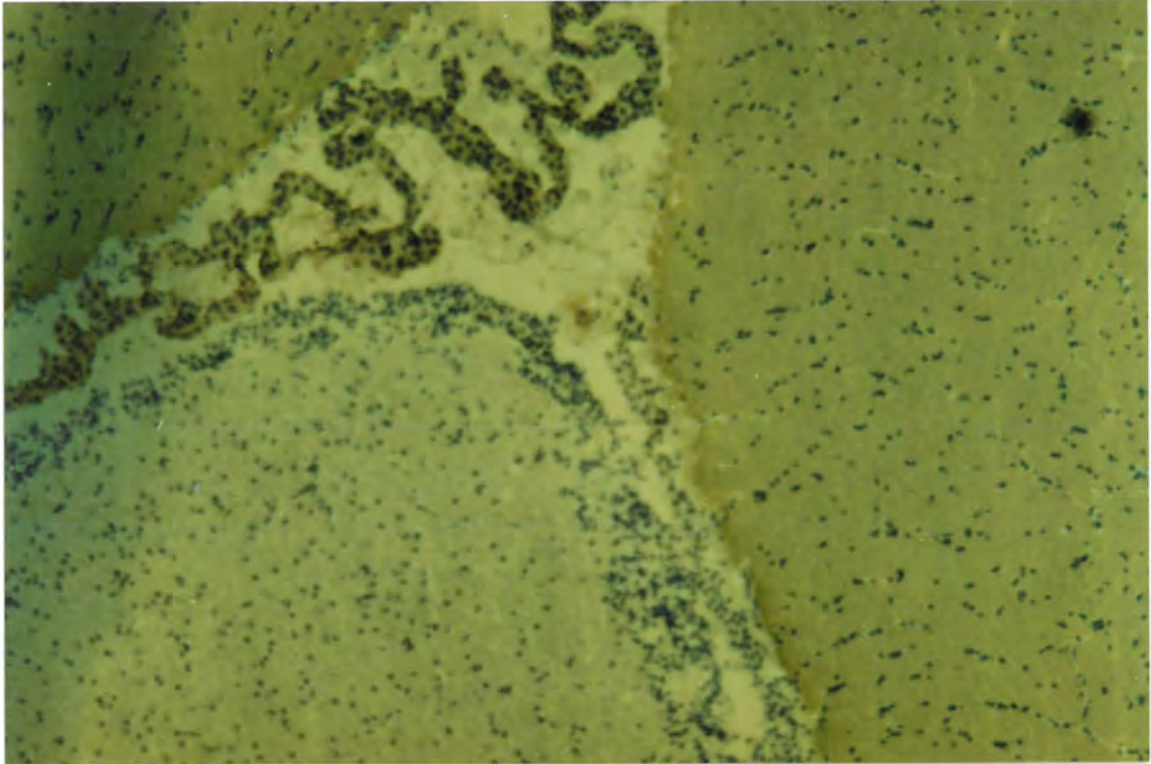
Slika 42. (predhodna stranica) prikazuje preparat moždanog tkiva AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom od sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Preparat prikazuje zastupljenost OX8 pozitivnih stanica u CNS-u. Ne vide se pozitivne stanice. (povećanje 200x)



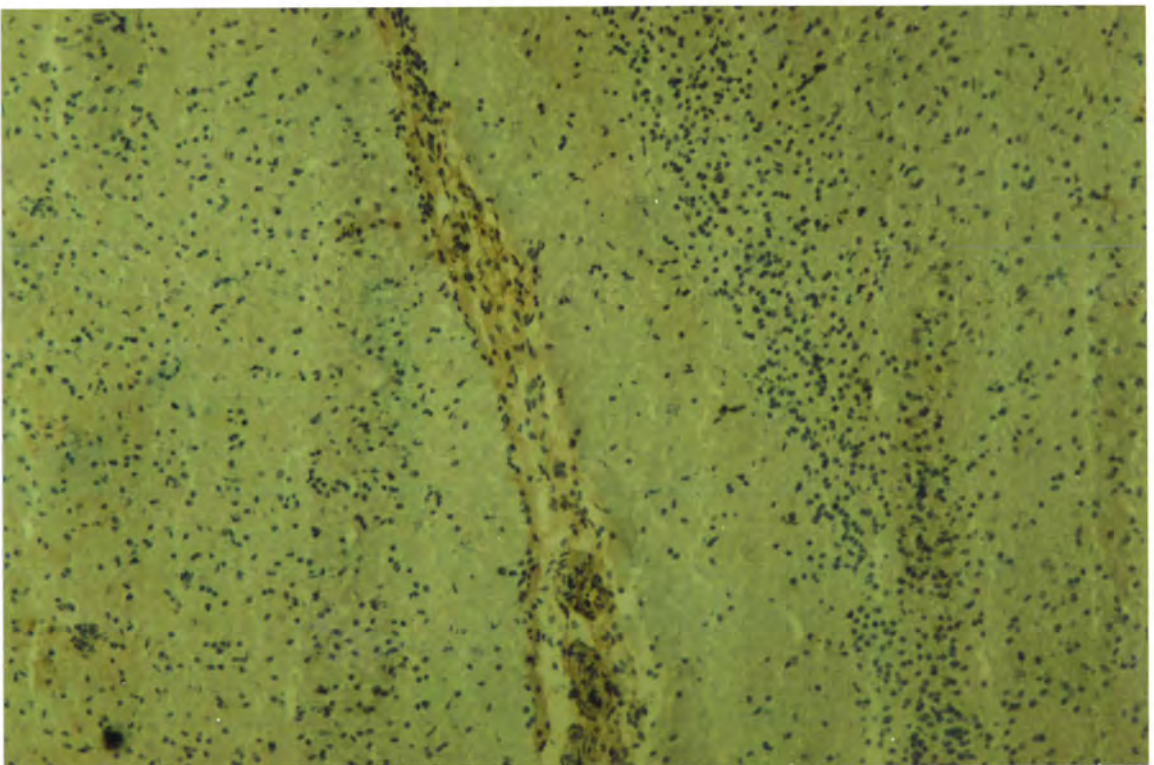
Slika 43. (Slika iznad teksta) prikazuje moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom od sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika prikazuje infiltrat unutar bijele tvari malog mozga. Naziru se W3/25 pozitivne stanice (narančasto obojene) (povećanje 200x).



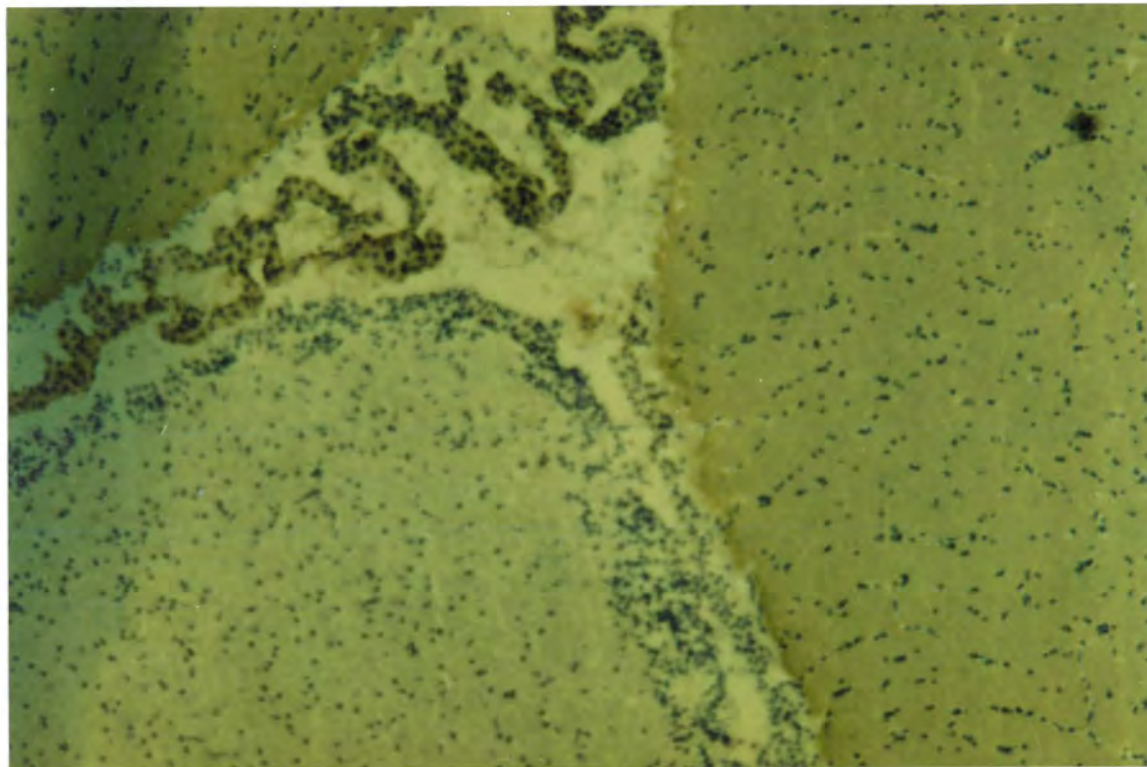
Slika 44. (predhodna stranica) prikazuje moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika (povećanje 400x) prikazuje infiltrat sa prethodne slike. Vidi se nekoliko jasno pozitivnih stanica (W3/25 pozitivne).



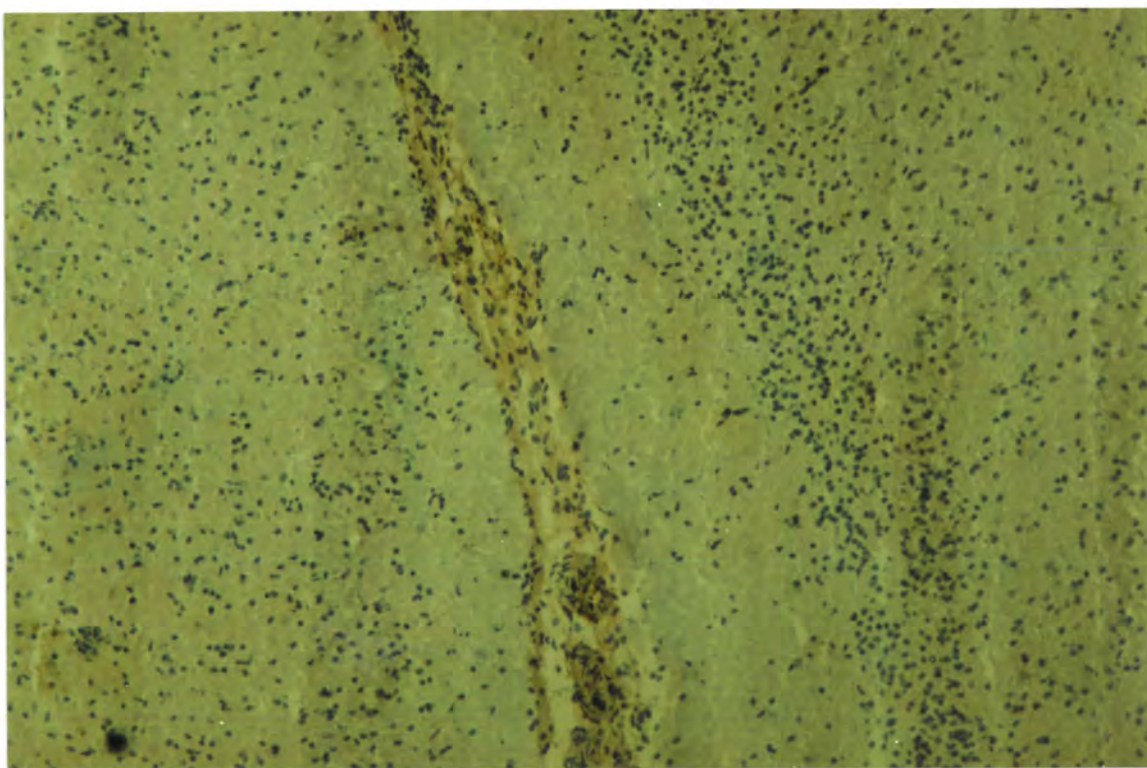
Slika 45. (gore) prikazuje zastupljenost Mac-1 pozitivnih stanica (makrofagni biljeg) u AO štakora periferno tretiranih **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Ne vide pozitivne stanice. (povećanje 200x).



Slika 44. (predhodna stranica) prikazuje moždano tkivo AO štakora periferno tretiranog **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Slika (povećanje 400x) prikazuje infiltrat sa prethodne slike. Vidi se nekoliko jasno pozitivnih stanica (W3/25 pozitivne).



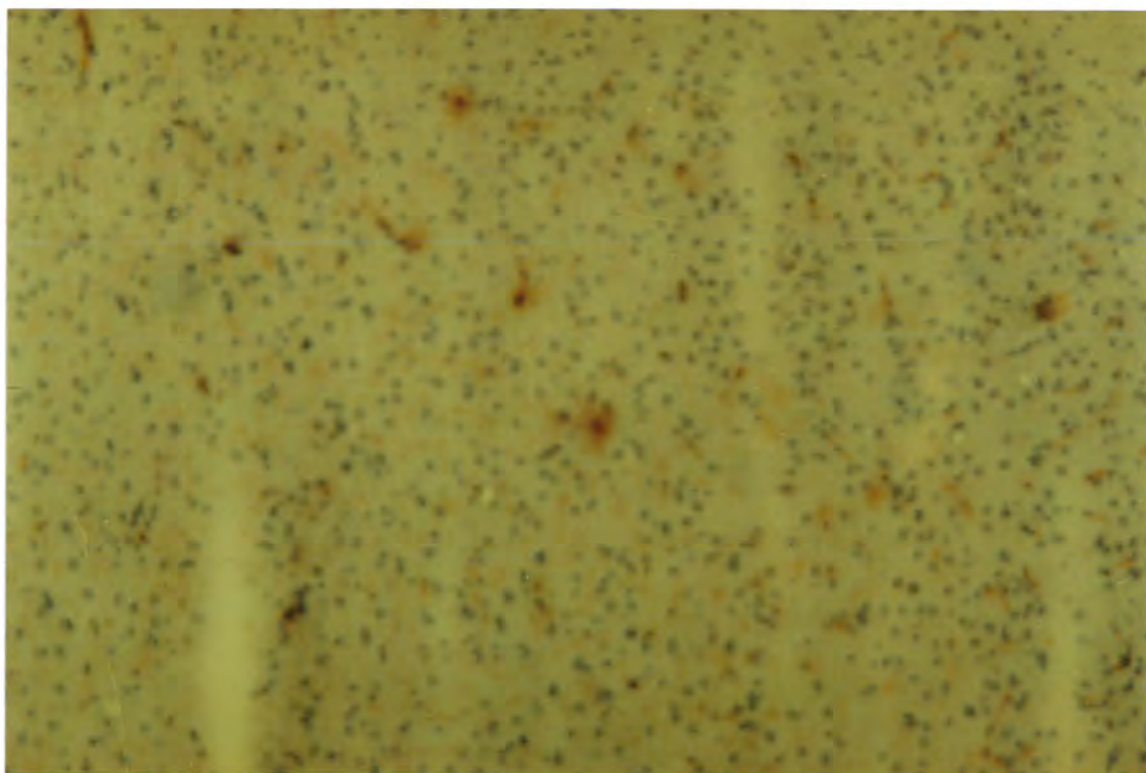
Slika 45. (gore) prikazuje zastupljenost Mac-1 pozitivnih stanica (makrofagni biljeg) u AO štakora periferno tretiranih **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Ne vide pozitivne stanice. (povećanje 200x).



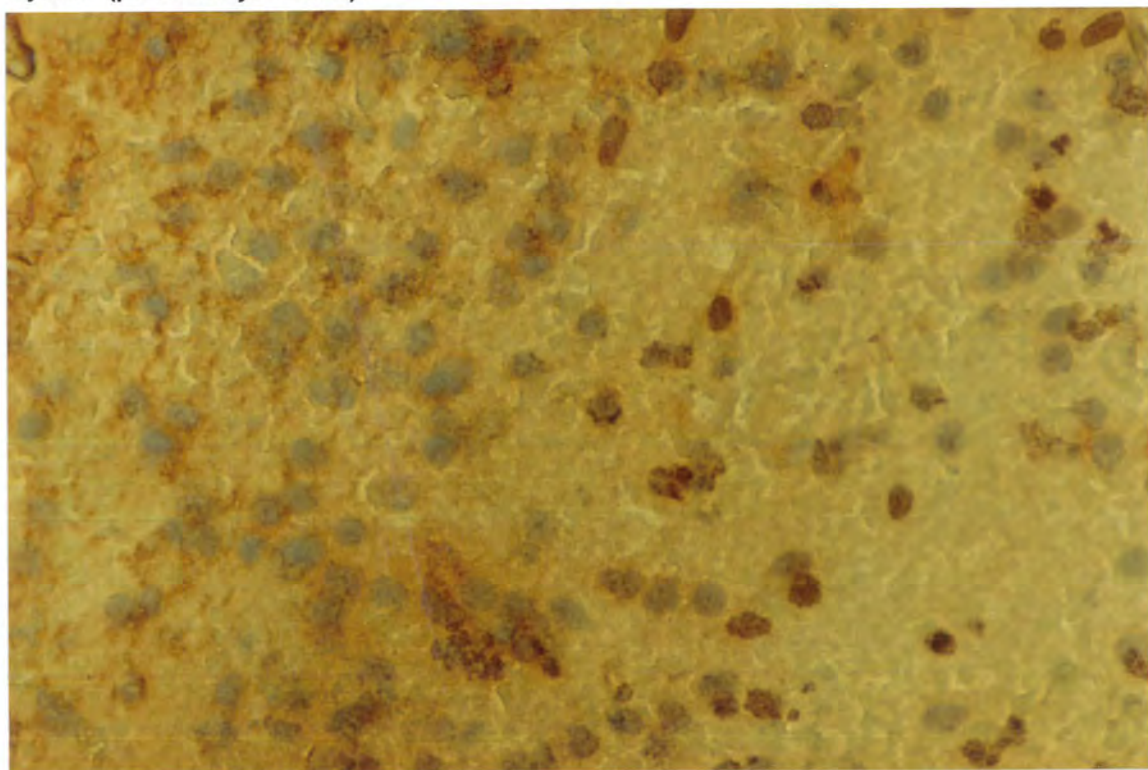


Slika 46. (predhodna stranica) prikazuje zastupljenost Mac-3 pozitivnih stanica (biljeg aktiviranih makrofaga) u AO štakora periferno tretiranih **somatostatinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Ne vide se pozitivne stanice. (povećanje 200x).

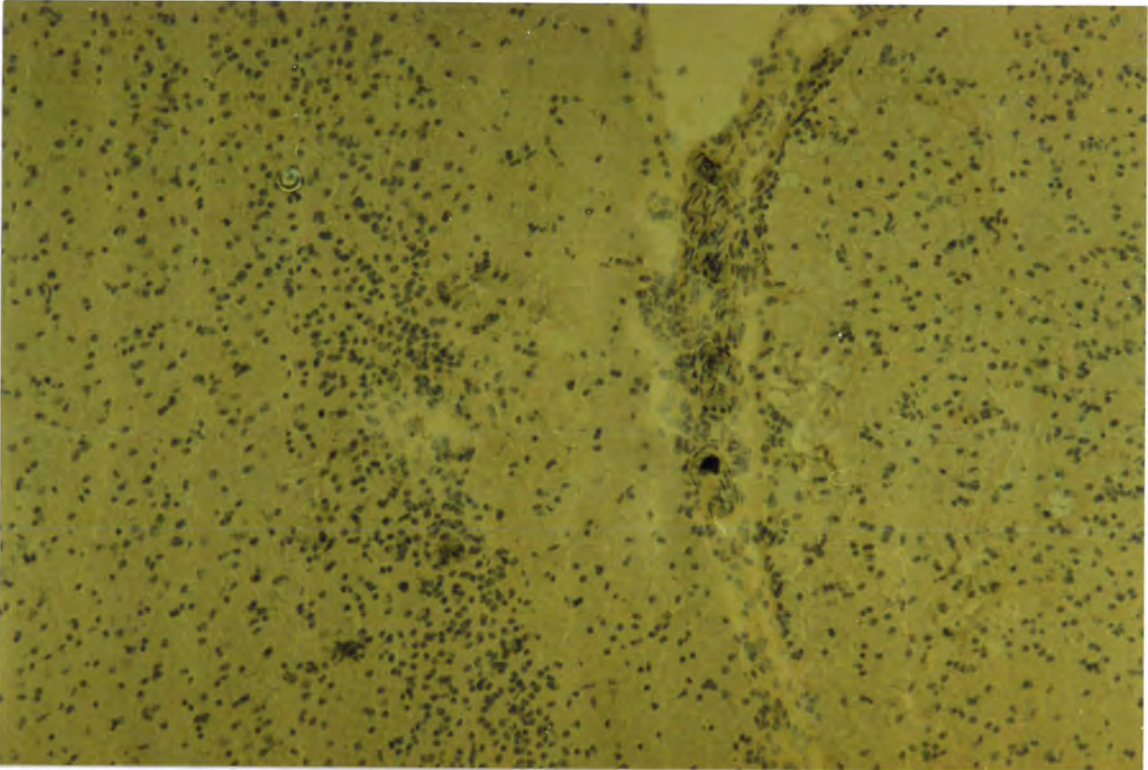
Slike 47.-51. pokazuju imunohistološki nalaz u AO štakora periferno tretiranih **fiziološkom otopinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji.



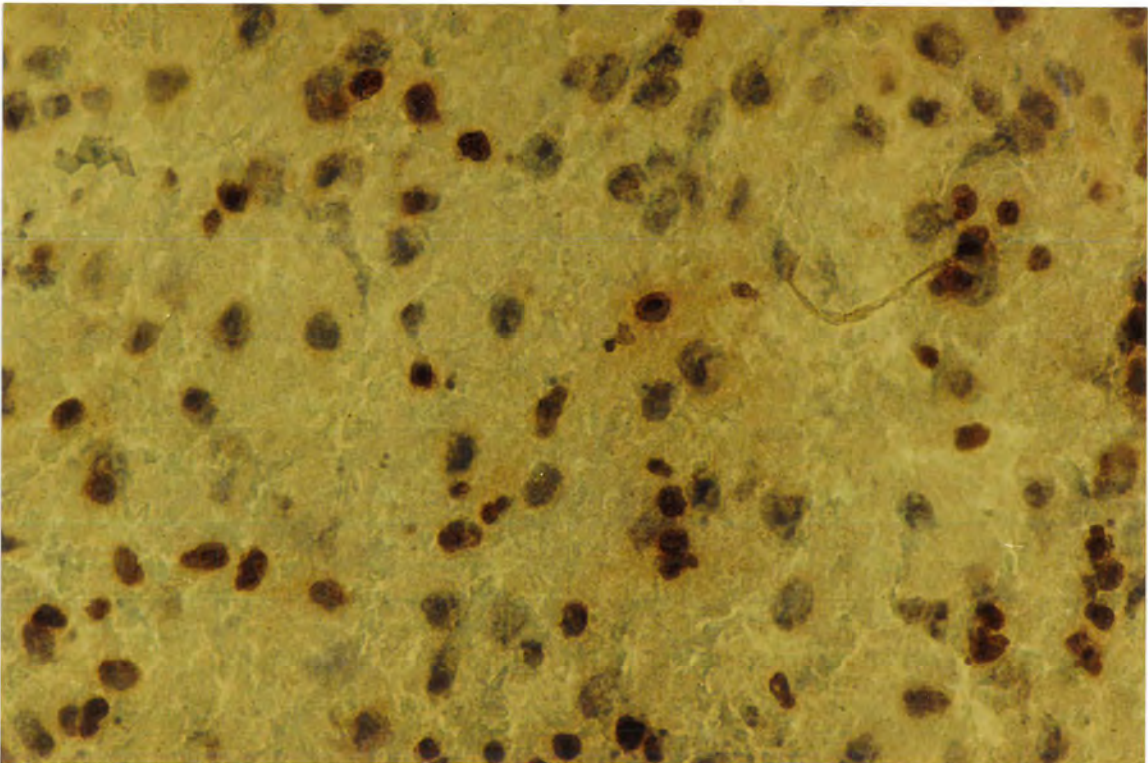
Slika 47. (Slika gore) prikazuje kontrolni preparat AO štakora periferno tretiranog **fiziološkom otopinom** od **sedmog do devetog** dana po aktivnoj imunizaciji. Vidi se da pojedine stanice mogu nespecifično vezati sekundarna antitijela. (povećanje 200x).



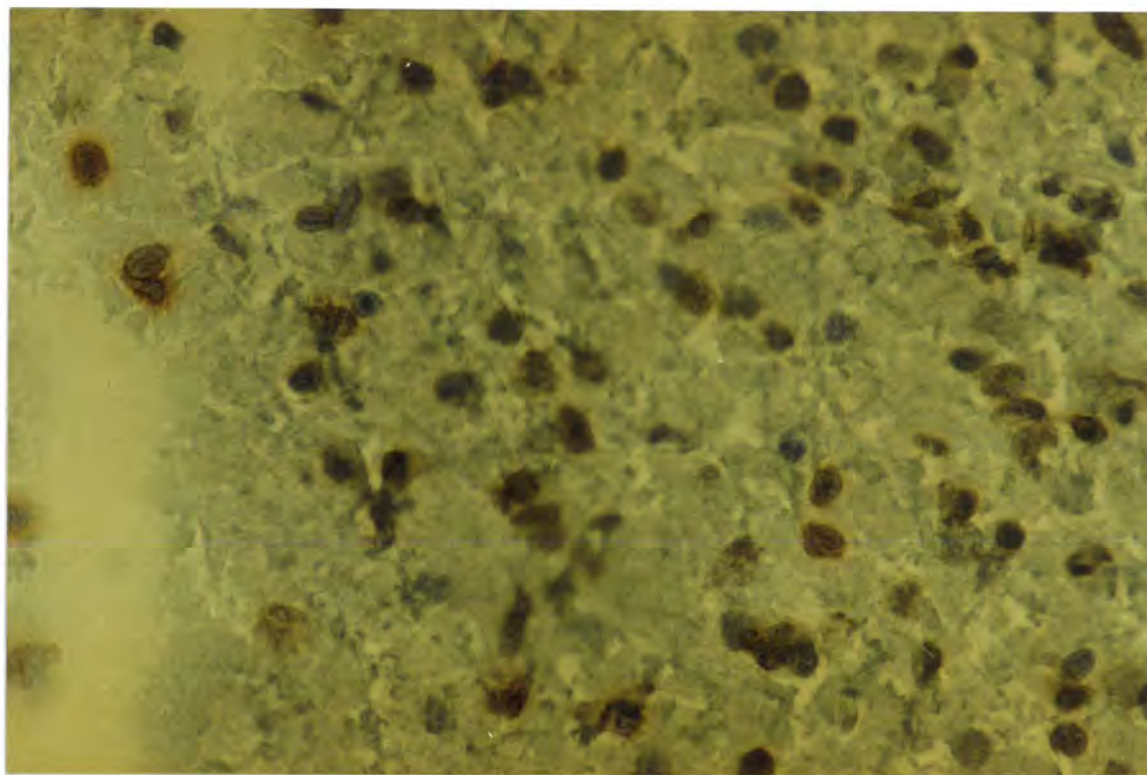
Slika 48. (prethodna stranica) prikazuje zastupljenost OX8 pozitivnih stanica u AO štakora periferno tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. U desnom dijelu preparata vidi se nekoliko pozitivnih stanica. (povećanje 400x)



Na Slici 49. (Slika iznad teksta) vidimo da nema stanica pozitivnih na biljeg W3/25 u AO štakora periferno tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. (povećanje 200x).



Zastupljenost stanica pozitivnih na makrofagni biljeg Mac-1 u AO štakora tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji vidimo na Slici 50. (prethodna stranica). Vide se jasno pozitivne stanice. (povećanje 400x).



Na Slici 51. vidimo stanice jasno pozitivne na biljeg aktiviranih makrofaga Mac-3 u AO štakora tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. (povećanje 400x).

#### 4.2.2.4.2. ANALIZA ZASTUPLJENOSTI BILJEGA NA POVRŠINI STANICA POPLITEALNIH LIMFNIH ČVOROVA I SLEZENE PROTOČNOM CITOMETRIJOM

U narednim istraživanjima nastojali smo odgovoriti na pitanje koje bi stanice mogle biti odgovorne za povećanu incidenciju EAE-a u AO štakora tretiranih somatostatinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji. Pri tome smo protočnom citometrijom ispitivali zastupljenost pojedinih staničnih biljega (OX1, W3/25, OX8 i OX39) na površini splenocita i stanica poplitealnih limfnih čvorova u AO štakora tretiranih somatostatinom ili fiziološkom otopinom (Slike 18., 19., 20. i 21.).

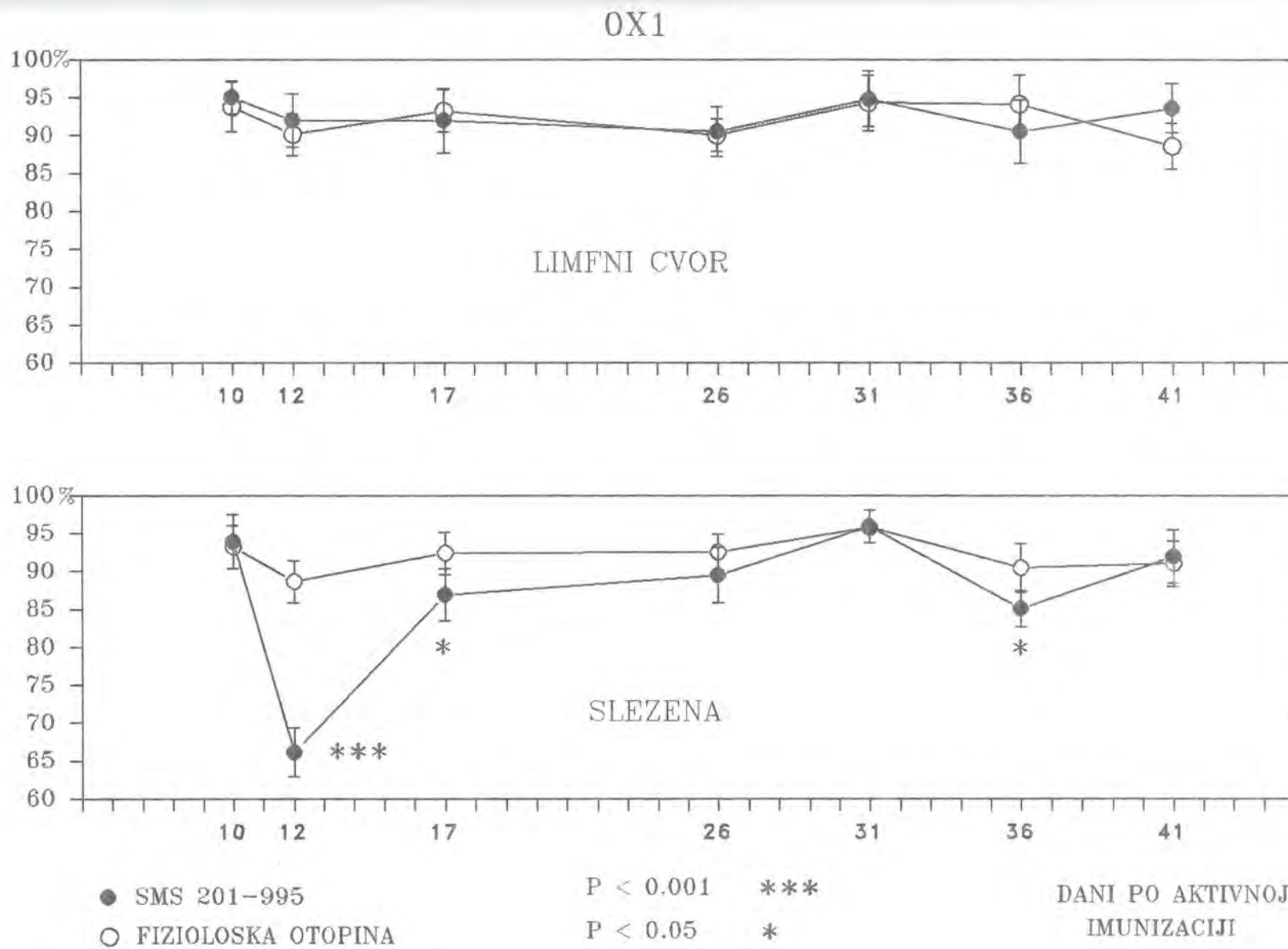
Slika 18. prikazuje postotak stanica poplitealnih limfnih čvorova i slezene pozitivnih na leukocitni stanični biljeg OX1. Postotak stanica limfnih čvorova pozitivnih na leukocitni stanični biljeg OX1 nije se statistički značajno razlikovao između grupe tretirane somatostatinom i grupe tretirane fiziološkom otopinom ni u jednom od sedam testiranih perioda po aktivnoj imunizaciji. Međutim, statistički značajne razlike u postotoku OX1 pozitivnih stanica bile su prisutne u slezeni. Najizraženije sniženje postotka OX1 pozitivnih stanica u slezeni u grupi tretiranoj somatostatinom utvrdili smo 12-og dana po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.001$ ), dok su značajne razlike prisutne još 17. i 36. dan ( $p < 0.05$ ).

Slika 19. pokazuje postotak stanica limfnih čvorova i slezene pozitivnih na stanični biljeg W3/25. Statistički značajne promjene primjećene su 10., 17., 26., 31. i 41. dan po aktivnoj imunizaciji. Statistički značajno povećanje opaženo je 12., 17. i 26. dan ( $p < 0.05$ ), te 41. dan ( $p < 0.01$ ) po aktivnoj imunizaciji u grupi tretiranoj somatostatinom.

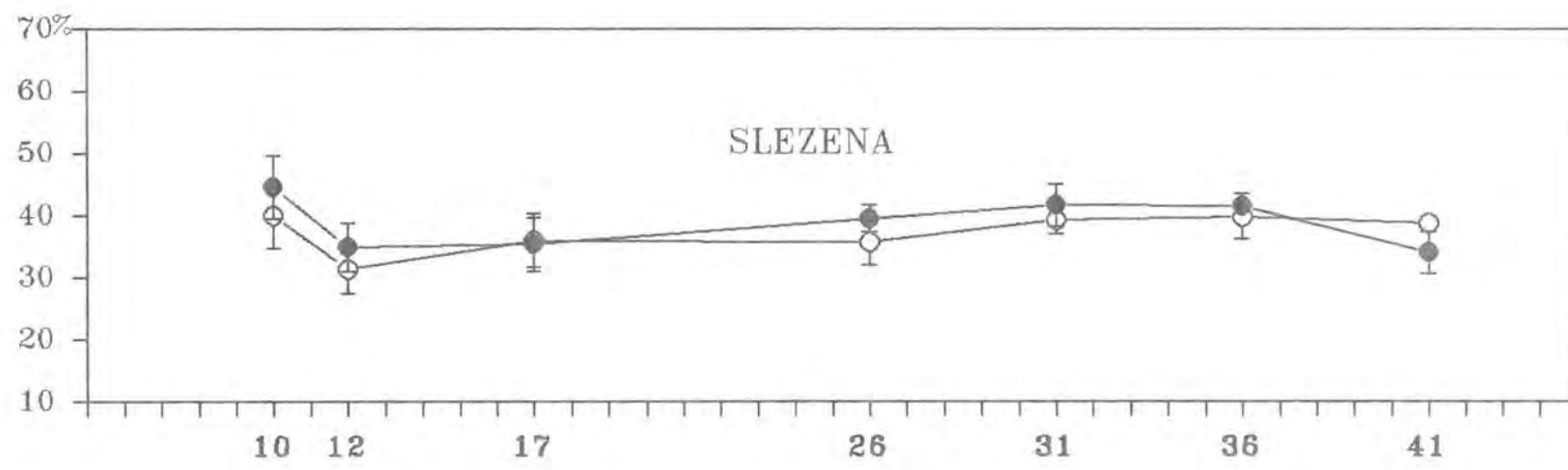
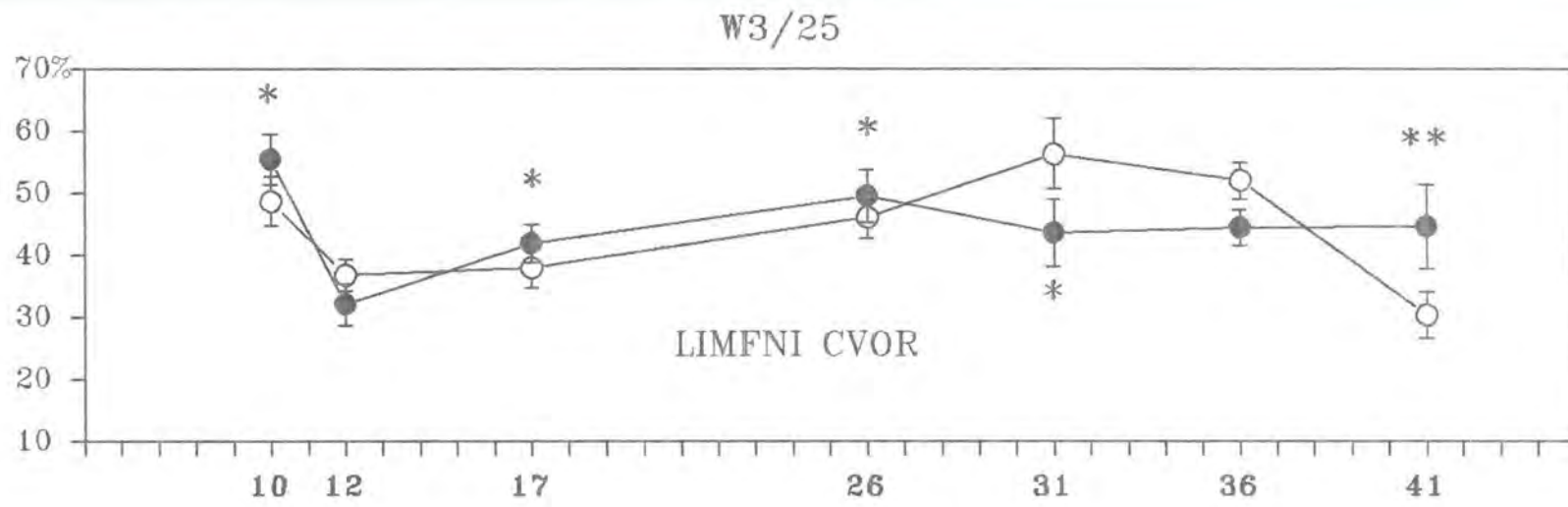
Značajno sniženje postotka stanica pozitivnih na stanični biljeg W3/25 - primjećeno je 31. dan ( $p < 0.05$ ). U slezeni ni u jednom od sedam testiranih perioda po aktivnoj imunizaciji nije bilo značajnijih razlika.

Slika 20. pokazuje postotak stanica limfnih čvorova i slezene pozitivnih na stanični biljeg OX8. Statistički značajne razlike u postotku OX8 pozitivnih stanica u limfnom čvoru primjećene su 10., 12., 17., 26., 31. i 36. dan po aktivnoj imunizaciji. Sniženje postotka OX8 pozitivnih stanica primjećeno je 10., 26. i 31. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ), te 12. i 36. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.001$ ), dok je povećanje postotka OX8 pozitivnih stanica primjećeno 17. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ). Postotak stanica limfnih čvorova pozitivnih na stanični biljeg OX8 bio je statistički značajno snižen 12. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ).

Slika 21. pokazuje postotak stanica limfnog čvora i slezene koji je pozitivan na stanični biljeg OX39. Statistički značajno povećanje postotka OX39 pozitivnih stanica prisutno je u limfnom čvoru 17. ( $p < 0.001$ ), 26. i 41. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ). Statistički značajno povećanje postotka OX39 pozitivnih stanica primjećeno su na stanicama slezene 26. i 31. dana po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.05$ ), dok je značajno sniženje bilo prisutno 17. dan po aktivnoj imunizaciji ( $p < 0.01$ ).



Slika 18. POSTOTAK OX1 POZITIVNIH STANICA POPLITEALNIH LIMFNH CVOROVA I SLEZENA U AO STAKORA TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI



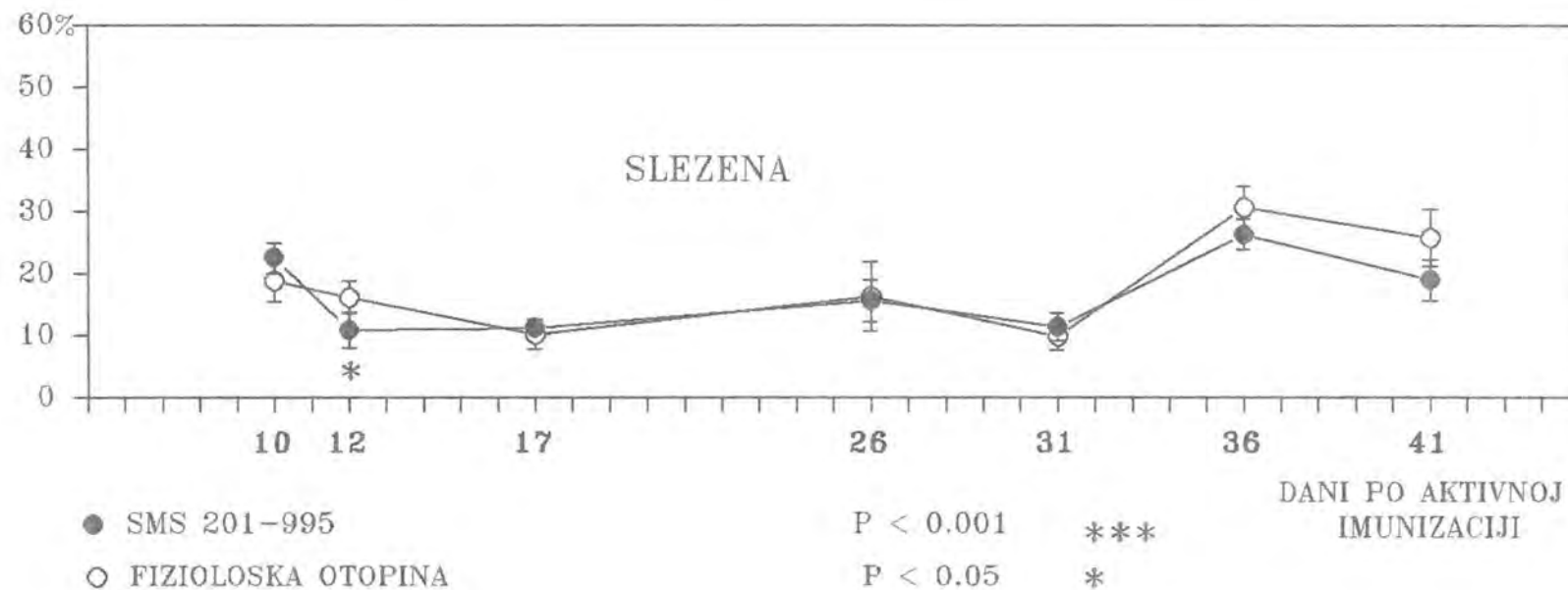
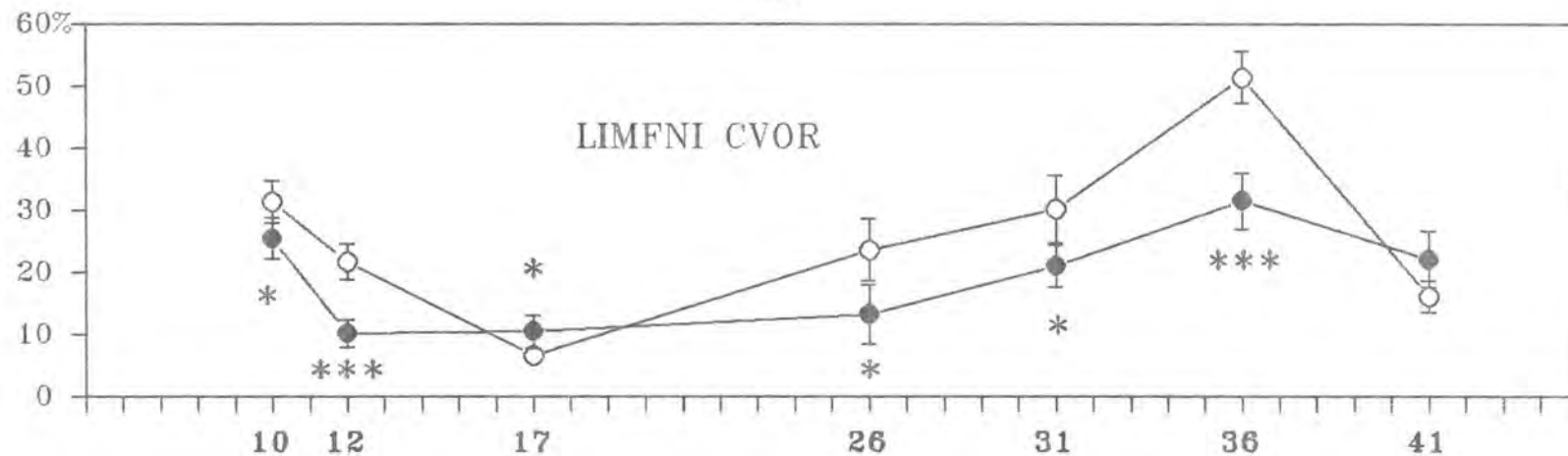
● SMS 201-995  
 ○ FIZIOLOSKA OTOPINA

$p < 0.01$  \*\*  
 $P < 0.05$  \*

DANI PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

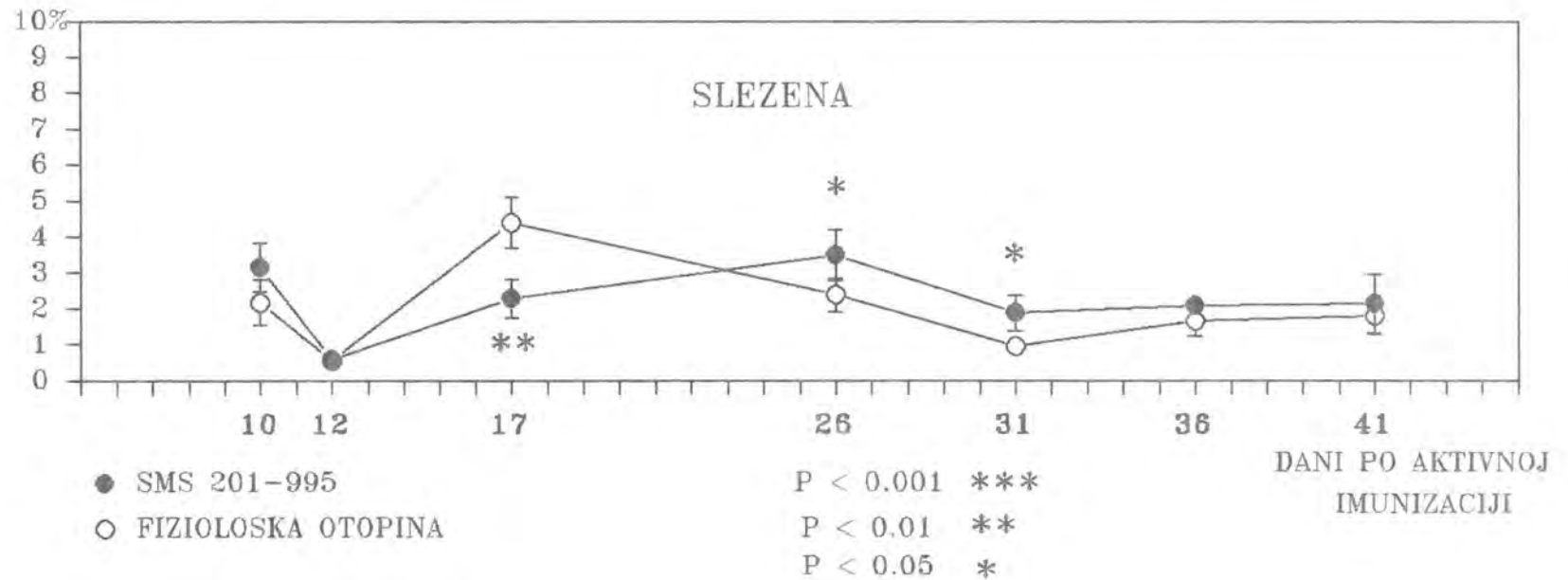
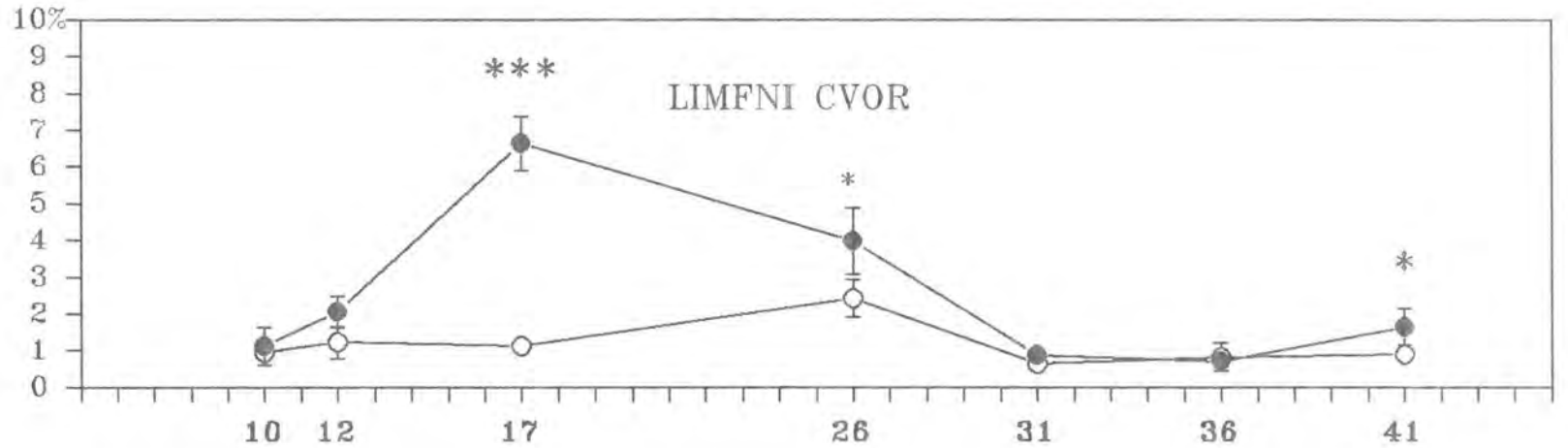
Slika 19. POSTOTAK W3/25 POZITIVNIH STANICA POPLITEALNIH LIMFNIH CVOROVA I SLEZENE U AO STAKORA TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

OX8



Slika 20. POSTOTAK OX8 POZITIVNIH STANICA POPLITEALNIH LIMFNH CVOROVA I SLEZENA U AO STAKORA TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI

# OX39



Slika 21. POSTOTAK OX39 POZITIVNIH STANICA POPLITEALNIH LIMFNH CVOROVA I SLEZENE U AO STAKORA TRETIRANIH SOMATOSTATINOM PERIFERNO (SUBKUTANO) OD SEDMOG DO DEVETOG DANA PO AKTIVNOJ IMUNIZACIJI



#### 4.2.2.4.3. ANALIZA FUNKCIONALNE REAKTIVNOSTI SPLENOCITA NA KONKANAVALIN A I MIJELINSKI BAZIČNI PROTEIN

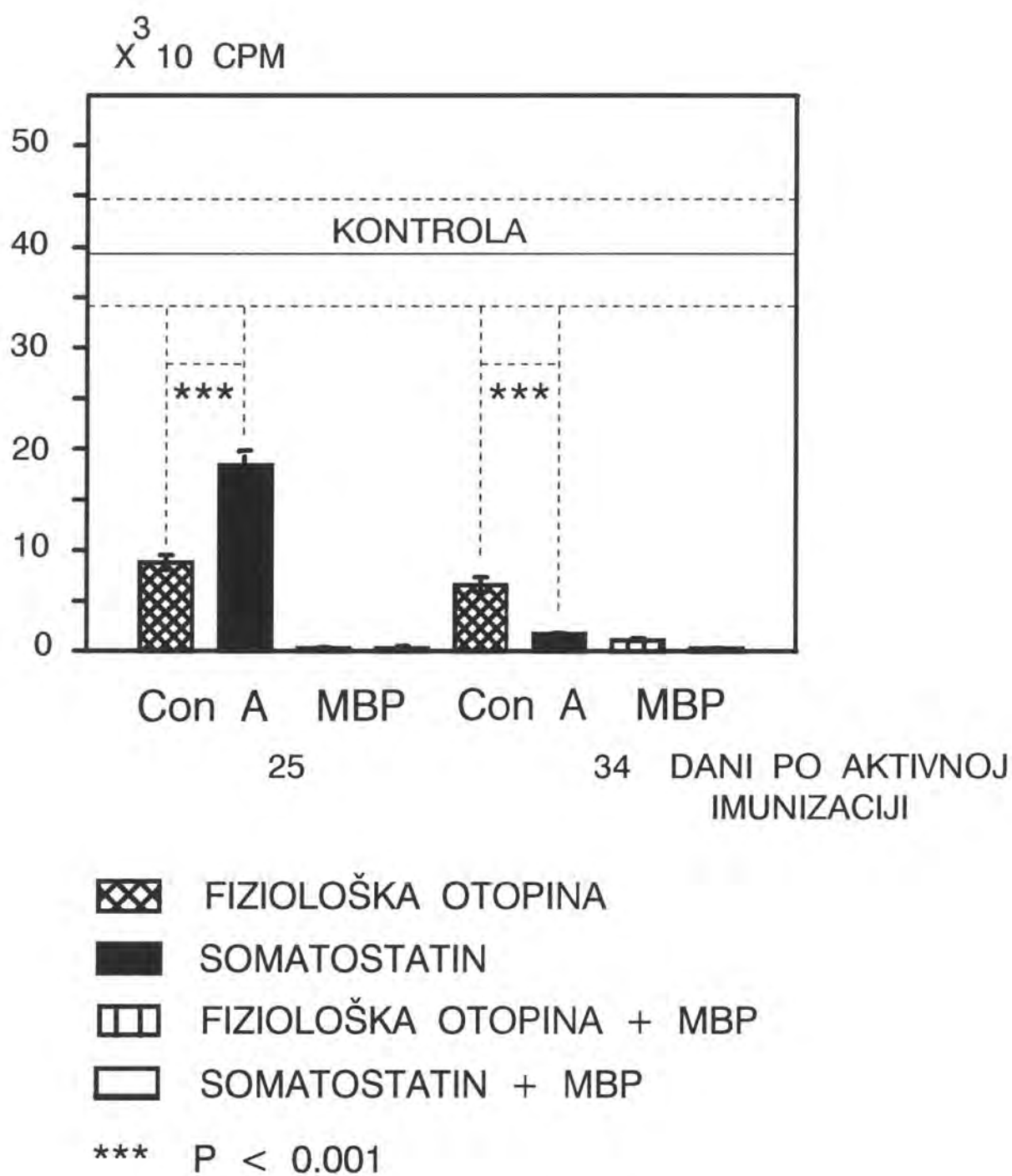
Funkcionalnu reaktivnost splenocita u AO štakora tretiranih *in vivo* somatostatinom na konkanavalin A i mijelinski bazični protein (MBP) prikazuje Slika 22. Proliferativni odgovor limfocita na navedene antigene analiziran je 25. dan po imunizaciji (na početku kliničkih simptoma) i 34. dan po imunizaciji (po prestanku kliničkih simptoma EAE-a). Proliferativni odgovor na konkanavalin A je u grupi tretiranoj fiziološkom otopinom kao i u grupi tretiranoj somatostatinom bio značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu aktivno imuniziranih životinja (na Slici 22. označeno kao kontrola). Omjer proliferativnog odgovora na konkanavalin A između grupe tretirane somatostatinom i grupe tretirane fiziološkom otopinom iznosio je približno 2. Specifični proliferativni odgovor na MBP nije bio prisutan u obje ispitivane grupe. Vidimo da 34. dan po aktivnoj imunizaciji nastupa smanjenje proliferativnog odgovora na konkanavalin A u grupi tretiranoj somatostatinom u odnosu na kontrolnu skupinu životinja tretiranu fiziološkom otopinom. Ako usporedimo proliferativni odgovor u grupi tretiranoj somatostatinom 34. dan po aktivnoj imunizaciji sa proliferativnim odgovorom u istoj grupi 25. dan po aktivnoj imunizaciji vidimo da dolazi do njegovog daljnjeg smanjenja. Proliferativni odgovor na MBP nije bio prisutan ni 34. dan po aktivnoj imunizaciji.

#### 4.3. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA CNS-A

Histološka analiza CNS-a potvrdila je prisutnost upalnih infiltrata u CNS-u eksperimentalne u kontrolne skupine životinja unatoč odsutnosti kliničkih znakova EAE-a. Histološki i klinički znakovi povezani su sa genetičkim osobitostima (109). Ovi rezultati pokazuju da kasni histološki znakovi ne moraju biti povezani s kliničkim znakovima EAE-a u AO štakora.

#### 4.4. IMUNOHISTOLOŠKA ANALIZA CNS-A

Imunohistološka analiza CNS-a je pokazala prisutnost W3/25 pozitivnih stanica u CNS-u AO štakora *in vivo* tretiranih somatostatinom (od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji) uz odsustvo stanica pozitivnih na OX8, Mac-1 i Mac-3 biljeg. U AO štakora *in vivo* tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji imunohistološka pokazala je prisutnost stanica pozitivnih na OX8, Mac-1 i Mac-3 biljeg uz odsustvo stanica pozitivnih na W3/25 biljeg.



Slika 22. FUNKCIONALNA REAKTIVNOST SPLENOCITA AO ŠTAKORA *IN VIVO* TRETIRANIH SOMATOSTATINOM NA KONKANAVALIN A I MIJELINSKI BAZIČNI PROTEIN

## 5. RASPRAVA

Iz pregleda opisanog u Općem dijelu jasno je da je EAE autoimuna bolest CNS koja je uzrokovana različitim čimbenicima. Prema novijim hipotezama (273) u njenoj patogenezi ključnu ulogu imaju dva seta gena koji kodiraju: 1) abnorman reaktivnost imunološkog sustava i 2) primarnu osjetljivost ciljnog organa ili ciljnih tkiva na štetno djelovanje staničnih ili humoralnih imunoloških mehanizama. Autoimuna bolest nastaje samo onda kad su u pojedincu prisutna oba seta gena. Esencijalni geni kodiraju npr. hiperreaktivnost perifernih limfocita na mitogene, sekreciju IL-2 ili produkciju protutijela, a esencijalni su i geni koji predodređuju ciljni organ na oštećenje npr. sklonost organotropnoj virusnoj infekciji. Osim toga, konačni ishod kombinacije seta esencijalnih gena ovisi i o djelovanju različitih modulirajućih čimbenika, koji utječu ili na imunološki sustav ili na ciljne organe. Tako funkciju imunološkog sustava mogu modulirati haplotipovi glavnog sustava histokompatibilnosti, spol i glukokortikoidni hormoni, a funkciju predodređenih ciljnih organa nadzire napr. sadržaj joda u hrani (u slučaju autoimunog tireoiditisa). Maksimalni intenzitet autoimune bolesti nastaje onda kad su prisutni svi esencijalni geni i dostatna količina modulirajućih čimbenika (273).

Isti postulati vrijede i za model EAE. Pokazalo se da je mogućnost indukcije bolesti vrlo različita u životinja različitih vrsta. Posebno su osjetljivi Lewis štakori, koji razvijaju EAE nakon imunizacije sa MBP ili nakon pasivnog prijenosa limfocita kultiviranih *in vitro* sa MBP-om. Isti soj je vrlo osjetljiv na indukciju erozivnog poliartritisa nakon intraperitonealnog davanja peptidoglikana iz stijenke streptokoka grupe A. U našim pokusima sličnu razliku u reaktivnosti primjetili smo u štakora soja DA i AO. Dok su DA štakori nakon aktivne imunizacije sa junećim homogenatom u Freundovom adjuvansu gotovo u 100% razvijali EAE, AO štakori su na istu senzibilizaciju odgovarali samo u 9% slučajeva.

Razlike u reaktivnosti pojedinih štakorskih vrsta pokušavaju se tumačiti već opisanim razlikama u prisustvu i djelovanju esencijalnih i modulirajućih faktora koji dozvoljavaju razvoj autoimune bolesti. Opisuju se razlike u prepoznavanju encefalogeničnih determinanti MBP-a, ekspresiji la antigena, produkciji pro-upalnih citokina IL-2 i IFN- $\gamma$ , te u vrsti limfatičkih stanica u regionalnim limfnim čvorovima i upalnim lezijama (163,283). U posljednje vrijeme sve se više naglašava i mogućnost da su ove razlike u reaktivnosti vezane uz promjene u neuro-endokrino-imunološkoj komunikaciji (237,238). Vrlo važan modulirajući čimbenik u kontroli nastanka autoimunosti je, naime, intaktna osovina između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde. Tako je u Lewis štakora dokazano postojanje defekta u aktivaciji ove osovine i u njenoj imunoneuroendokrinoj povratnoj spregi (237,238). Zaključak se temelji na opažanju da Lewis štakori imaju manje adrenalne žlijezde u usporedbi sa kontrolnim, nereaktivnim, Fisher sojem štakora, da izlučuju manje ACTH i glukokortikoida nakon stimulacija sa IL-1- $\alpha$ , CRH, streptokoknim peptidoglikanom ili serotoniniskim agonistom, te da ne sintetiziraju CRH mRNA u paraventricularnim jezgrama hipotalamusa nakon davanja IL-1- $\alpha$  (237,238).

Na isti zaključak o važnoj ulozi intaktne HHA osovine za održavanje rezistencije prema autoimunosti navode opažanja o ukidanju rezistencije u neosjetljivog PVG soja nakon davanja MBP uz adenalektomiju (149), te o razvoju autoimunog artritisa u Fisher soja, nakon primjene antagonista glukokortikoidnih receptora-RU 486 ili serotoninskih antagonista (237,238).

Budući da neuroendokrinu homeostazu osim glukokortikoida osiguravaju i brojni drugi hormoni, u ovom radu je posebna pažnja poklonjena djelovanju somatostatina, kao tvari sa neurotransmitterskim, endokrinim i parakrinim djelovanjem. Testirani su njegovi učinci na EAE u štakora, koji su različito osjetljivi na indukciju bolesti i to nakon intracerebroventrikularnog i perifernog davanja, kako bi se eventualno razlučilo njegovo lokalno i periferno djelovanje, a mijenjalo se i vrijeme njegove aplikacije u odnosu na davanje encefalitogena, kako bi se razlučilo na koje faze autoimunog procesa više djeluje.

Rezultati su pokazali da se somatostatinom može promijeniti tijek bolesti i u osjetljivih DA štakora i u rezistentnih AO štakora. U pokusima se primjenjivao somatostatinski analog SMS-201-995, koji ima produženo i naglašeno inhibicijsko djelovanje na sekreciju hormona rasta, ali koji blokira i sekreciju TSH, ACTH, melatonina i mnogih lokalnih hormona gastrointestinalnog trakta (inzulina, glukagona, gastrina, motilina, kolekistokinina i sekretina), te djelovanje raznih neurotransmitera u CNS-u (78) i perifernom nervnom sustavu (22). Njegovim injiciranjem narušava se, stoga, neuro-endokrina homeostaza i postiže učinak vrlo sličan onim postupcima, koji blokiraju osovину između hipofize, hipotalamusa i nadbubrežne žlijezde suprimirajući djelovanje glukokortikoida, kao glavnih hormona u nadzoru imunoloških funkcija. Inhibicijskom djelovanju somatostatina na stanice hipotalamusa i adenohipofize (143), treba pridodati i izravno inhibicijsko djelovanje na adrenalne žlijezde (161).

Uzme li se u obzir da tijekom autoimunog procesa glukokortikoidi djeluju kao limitatori procesa koji izazivaju autoagresiju i kao skretničari, koji pretvaraju proinflamatorni TH1 odgovor u modulacijski TH2 odgovor (148), očito je da bi ovakvim djelovanjem somatostatin mogao pojačati simptome EAE-a.

Rezultati naših pokusa to i pokazuju. U DA štakora injiciranje somatostatin intracerebroventrikularno, u svim testiranim intervalima, bez obzira na vrijeme njegovog injiciranja u odnosu na MBP (Slike 4.-8.), izaziva pojačanje kliničke slike EAE-a, pogotovo u njegovoj kasnijoj fazi, kada u kontrolnim grupama simptomi već jenjavaju. Egzarcerbacija simptoma je naročito naglašena u grupama tretiranim somatostatinom nakon primjene encefalitogena, posebno **drugog** (Slika 5.) i **petog** (Slika 6.) dana po aktivnoj imunizaciji, kada se primjećuje i ranija pojava simptoma bolesti. Slične, još naglašenije promjene utvrđene su i nakon periferne aplikacije somatostatina **petog** (Slika 12.), te naročito **sedmog** (Slika 13.) po aktivnoj imunizaciji. Budući da je to vrijeme kad T-limfociti, aktivirani na periferiji MBP-om počinju ulaziti u CNS (84), moguće je da je SMS povećao i propusnost krvno-moždane barijere i time

pridonio autoagresiji. Ipak, vjerojatnije je da injiciranje SMS dovodi do neuroendokrinog disbalansa kojim se blokira aktivacija osovine između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde npr. interleukinom IL-1, IL-6- ili ostalim citokinima, koje otpuštaju aktivirani T-limfociti. Nedostatak glukokortikoida može tada rezultirati i izostankom klonalne delecije autoreaktivnih limfocita uslijed manje intenzivnih procesa apoptoze (283), uslijed izostanka inhibicije transkripcije pro-upalnih citokina (77), uslijed neaktiviranja imunosupresijskih mehanizama (50), kao i uslijed izostanka nespecifičnog protuupalnog djelovanja kortizola (9). Blokada glukokortikoida somatostatinom bi stoga rezultirala većom antigenskom prezentacijom, većom kemotaksijom autoreaktivnih limfocita, monocita i granulocita, većom citotoksičkom aktivnošću, te zbog izostanka blokade IFN- $\gamma$ , i većom ekspesijom antigena klase II na ciljnom tkivu.

Da ovi modulirajući učinci somatostatina mogu biti vrlo intenzivni upozoravaju i rezultati dobiveni u AO štakora, koji su prirodno rezistentni na indukciju bolesti. U ovih štakora periferna primjena somatostatina od **sedmog do devetog** dana nakon senzibilizacije izaziva bolest u 55% životinja, dok je u kontrolnoj grupi životinja, injiciranih na isti način fiziološkom otopinom, incidencija bolesti bila samo 17% (Tablica 2). Slika 17. prikazuje da je prosječan intenzitet bolesti u ovih štakora porastao sa indeksa 0,1 na indeks 1,4. Somatostatin, dakle, i u rezistentnog soja štakora može izazvati bolest, slično kao što antagonisti osovine između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde ili blokatori receptora za glukokortikoide mogu inducirati autoimunu bolest u drugim rezistentnim sojevima štakora (Fisher ili PVG štakori (238,239).

Treba, međutim, istaknuti i druga djelovanja somatostatina, koja su također vidljiva u našim rezultatima. Lokalna, intracerebroventrikularna aplikacija somatostatina u DA štakora, **devetog** dana nakon senzibilizacije dovela je do statistički značajnog odgađanja pojave kliničkih znakova bolesti, unatoč tome što se trajanje bolesti produžilo (Slika 8), Sličnu odgodu pojave bolesti u DA štakora opisali smo i u našem ranijem radu (165) nakon produžene periferne aplikacije somatostatina od 1-3 dana nakon aktivne imunizacije. Ovi rezultati ukazuju na imunosupresijsko djelovanje somatostatina u vrijeme indukcije imunološkog odgovora (pri perifernom davanju), odnosno, u vrijeme pojave kliničkih simptoma (pri centralnom davanju). Budući da vrlo veliki broj literaturnih podataka ukazuje na izravno imunosupresijsko djelovanje somatostatina i njegovih analoga (110,200), ove rezultate nije teško objasniti. Naime, somatostatinski receptori utvrđeni su ne samo na strukturama CNS i endokrinom tkivu, već i na različitim vrstama limfatičkih stanica (53,78,233, 235). Posebno mnogo ih ima na B limfocitima u Payerovim pločama (233), ali i na T limfocitima, te monocitima u slezeni i drugim limfatičkim organima (233). Unutar T stanične populacije više su zastupljeni na CD8+ stanicama supresijsko/citotoksičnog fenotipa (233). Somatostatinski receptori su utvrđeni su i na astrocitima i glija stanicama, odnosno na APS u CNS Izravno vezanje SOM sa receptorima na limfocitima ima za posljedicu uglavnom supresijsko djelovanje (110,185,191,200,210) ali su mogući i izuzeci (176). U

našim vlastitim, ranijim pokusima utvrditi smo tako da se primjenom SMS-a *in vivo*, odnosno *in vitro* može blokirati lokalnu GVHR (eng. graft versus host reaction), humoralnu imunost na ovčje eritrocite, mitogenima induciranu blastičnu proliferaciju limfocita, kao i rast pojedinih hibridomskih linija (192). Učinak na blastičnu transformaciju je, međutim, ovisio i o načinu stimulacije limfocita, pa se utvrdilo da somatostatin ne blokira proliferaciju induciranu samo sa anti CD3 antitijelima, ali da blokira onu potaknutu sa anti CD3 antitijelima + PMA.

Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da somatostatin blokira različite unutarstanične putove nakon aktivacije limfocita, neke od akcesornih molekula, ili pak lučenje određenih citokina koji su potrebni za punu aktivaciju limfocita. Osim toga, djelovanja somatostatina su ovisna i o tipu receptora na koji se somatostatin veže. Do danas je opisano 5 različitih subtipova somatostatinskih receptora, od kojih neki pokreću različite unutarstanične mehanizme (147). Odgoda pojave bolesti u našim pokusima mogla bi se stoga, protumačiti izravnim, receptorima posredovanim, inhibicijskih djelovanjem somatostatina na funkciju APS, na limfocitnu proliferaciju, na njihovu sposobnost lučenja pro-upalnih citokina ili na citotoksičko djelovanje.

Uz sve to, treba uzeti u obzir i činjenicu da i sami limfociti imaju sposobnost *de novo* sinteze imunoreaktivnih peptida poput hormona rasta, endorfina, TSH-a i drugih hormona (22,78). Nakon sinteze oni se vežu na receptore, koji se pojavljuju na aktiviranoj stanici, te se tako autokrinom sekcijom podržava njihova proliferacija i diferencijacija (22). Blokiranjem stvaranja limfocitnog hormona rasta SMS bi, stoga i mimo vezanja za svoje specifične receptore, mogao inhibirati imunološku reakciju. Ukidanje inhibicijskog djelovanja SMS-a istovremenom primjenom hormona rasta podržava ovu hipotezu (192).

Kako bi bar djelomično odgovorili na pitanja o mehanizmu djelovanja somatostatina na limfatičku homeostazu i funkciju limfocita, u ovom radu smo prilikom davanja somatostatina u AO štakore, u kojima smo uspjeli ukinuti prirodnu rezistenciju na indukciju EAE, pratili i fenotipsku zastupljenost pojedinih limfocita u slezeni i poplitealnim limfnim čvorovima. Utvrdili smo da je pojava kliničkih znakova bolesti u ovih štakora, nakon davanja somatostatina između 7. i 9. dana po senzibilizaciji, praćena statistički značajnim smanjenjem stanica, koje eksprimiraju OX1 (panleukocitni) biljeg u slezeni (Slika 18), povećanjem proporcije W3/25+ (CD4) i OX39+ (IL-2R) stanica u slezeni (Slike 19 i 21), te smanjenjem postotka OX8+ (CD8) stanica u poplitealnom limfnom čvoru (lika 20). Budući da je malo vjerojatno da somatostatin izravno mijenja broj markera na površini limfocita, iako je opisano da on može dovesti do down regulacije MHC receptora razreda II (193), ovi rezultati najvjerojatnije ukazuju na migracijska kretanja pojedinih limfocitnih subpopulacija i na njihovu aktivaciju. Hormonska neravnoteža uzrokovana blokadom hipotalamo-hipofizno-adrenalne osi bi stoga mogla biti praćena većom proliferacijom TH1 stanica (porast W3/25 ekspresije) i njihovom aktivacijom (porast OX39 markera), te smanjenjem broja supresijskih limfocita (porast OX8 ekspresije). Izrazito smanjivanje broja splenocita sa OX1 biljegom

možda ukazuje na njihovu veću migraciju u područje CNS-a, gdje se odigravaju autoimuni procesi.

Testovi blastične transformacije splenocita, uzetih iz životinja tretiranih SMS-om 25 dana nakon senzibilizacije (Slika 22), odnosno u vrijeme kad se u slezeni nalazi značajno više IL-2R+ stanica (Slika 21) pokazali su snažniji intenzitet reakcije na Con A u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Kako Con A inducira na proliferaciju supresijske stanice dobivene iz slezene (49), te stimulira ne samo diferencirane, već i ontogenetski mlađe limfocite moguće je da je njihova veća mitogena sposobnost vezana i uz izostanak, prije opisanih zaštitnih mehanizama glukokortikoida u somatostatinom tretiranih životinja. U svakom slučaju, značajno je istaknuti da se ova veća aktivnost gubi u kasnijim stadijima EAE-a.

Sumarno, mogli bi naglasiti da rezultati ovog rada u potpunosti podržavaju hipoteze o značajnoj modulirajućoj ulozi neuro-endokrinog sustava u kontroli imunološke reakcije autoimunog tipa. Pritom, somatostatin može djelovati indirektno, jer kao neurotransmiter i hormon utječe na neuro-endokrinu homeostazu, a može djelovati i direktno na limfatičke stanice. Rezultati sugeriraju da indirektni mehanizmi, koji inaktiviraju zaštitne mehanizme hormona osovine između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde rezultiraju uglavnom pogoršavanjem kliničke slike EAE-a u osjetljivih sojeva štakora (DA), pa čak i ukidanjem prirodene rezistencije na indukciju EAE u AO štakora. Nasuprot tome, direktni mehanizmi, posredovani somatostatinskim receptorima na limfatičkim stanicama, čini se da idu uglavnom sa inhibicijskim djelovanjem i odgađanjem pojave kliničke slike bolesti.



## 6. ZAKLJUČCI

Istraživanja opisana u ovom radu imala su za cilj utvrditi mogućnosti moduliranja eksperimentalnog alergičkog encefalomijelitisa u štakora somatostatinskim analogom SMS 201-995. Korišteni su **DA i AO štakori**, odnosno dva soja štakora, koji su različito osjetljivi na indukciju EAE, a uspoređivani su učinci:

- A) centralne- intracerebroventrikularne (i.c.v.) i**  
**B) periferne-supkutane (s.c.) aplikacije somatostatina.**

Pritom se SMS injicirao u različito vrijeme nakon primjene encefalitogena (**neposredno nakon aktivne imunizacije, u vrijeme veće propusnosti krvno-moždane barijere, te prilikom pojave prvih kliničkih simptoma bolesti**) kako bi se utvrdio način njegova djelovanja na pojedine faze autoimunog procesa. Rezultati su procjenjivani na osnovu promjena u kliničkoj slici, fenotipskoj zastupljenosti limfocita u perifernim limfatičkim organima, te promjena u imunohistološkim nalazima u CNS-u.

Na osnovu postignutih rezultata mogli bismo zaključiti slijedeće:

**Ad A) Centralna (Intracerebroventrikularna) aplikacija somatostatina u DA štakora:**

- a) **prvog dana** po aktivnoj imunizaciji (a.i.) uzrokuje blago pojačanje intenziteta kliničke slike EAE-a u odnosu na kontrolnu grupu DA štakora injiciranih fiziološkom otopinom.
- b) **drugog dana** po a.i. značajno pojačava intenzitet bolesti u odnosu na kontrolu. Međutim, nakon injiciranja i SMS i fiziološke otopine razvio se monofazni oblik bolesti, pa se čini da u to vrijeme sam postupak i.c.v injiciranja utječe na razvoj bolesti.
- c) **petog dana** po a.i. (odnosno u vrijeme veće propusnosti krvno-moždane barijere) ubrzava pojavu kliničkih simptoma bolesti i produžuje trajanje bolesti.
- d) **sedmog dana** po a.i. lagano odgađa pojavu bolesti, ali izrazito produžuje njeno trajanje. Osim toga, postotak preživljava štakora u ovoj grupi bio je izrazito nizak.
- e) **devetog dana** po a.i. značajno odgađa pojavu bolesti i smanjuje intenzitet kliničkih simptoma.

**Ad A) Centralna (intracerebroventrikularna) aplikacija somatostatina u AO štakora:**

- a) **devetog dana** po a.i. statistički značajno odgađa pojavu kliničkih simptoma bolesti, ali produžava njeno trajanje

**Ad B) Periferna (supkutana) aplikacija somatostatina u DA štakora:**

a) **petog dana** po a.i. (u vrijeme veće propusnosti krvno moždane barijere) lagano ubrzava pojavu prvih simptoma bolesti i značajno pojačava intenzitet bolesti 11. dana nakon aktivne imunizacije.

b) **sedmog dana** po a.i. izrazito povećava intenzitet bolesti.

**Ad B) Periferna (supkutana) aplikacija somatostatina u AO štakora:**

a) **Između DA i AO štakora postoji velika razlika u mogućnosti indukcije EAE.** Za razliku od DA štakora koji lako razvijaju bolest, u AO štakora svega 9% životinja razvija kliničke znakove EAE. Somatostatin povećava inducibilnost, ali učinak mu ovisi o vremenu injiciranja i dužini tretmana.

b) injiciranjem SMS-a **petog dana** po a.i. ne utječe se bitno na intenzitet bolesti.

c) primjena SMS-a **sedmog dana** po a.i. također ne izaziva statistički značajne promjene.

d) prolongirana primjena SMS-a od **sedmog do devetog dana** po a.i., u dozi 3 x 5 µg/kg na dan, potencira razvoj bolesti, te i vremenu od 25.- 30. dana po aktivnoj imunizaciji inducira kliničke simptome intenziteta većeg od 1, što je rijetkost u štakora AO soja.

e) **Fenotipska analiza stanica** poplitealnih limfnih čvorova i slezene u AO štakora tretiranih somatostatinom pokazala je slijedeće promjene:

- značajno sniženje OX1 pozitivnih stanica u slezeni tijekom predkliničkog stadija EAE-a;

- značajno povećanje W3/25 pozitivnih stanica u poplitealnim limfnim čvorovima u predkliničkom stadiju bolesti, na početku bolesti i nakon prestanka kliničke slike kao i sniženje W3/25 pozitivnih stanica pred početak slabljenja kliničkih simptoma bolesti;

- značajno sniženje postotka OX8 pozitivnih stanica u predkliničkom stadiju bolesti, kako za vrijeme trajanja bolesti tako i nakon prestanka kliničkih simptoma;

- značajno sniženje OX39 pozitivnih stanica u limfnim čvorovima u predkliničkom stadiju, na početku pojave kliničkih simptoma kao i nakon

prestanka kliničke slike dok je u slezeni primjećeno sniženje u predkliničkom stadiju ali i povećanje tijekom trajanja bolesti;

f) **Analiza funkcionalne aktivnosti stanica slezene** u AO štakora tretiranih SMS pokazala je slijedeće: na početku pojave kliničkih simptoma (25-og dana po aktivnoj imunizaciji) je proliferativni odgovor splenocita na konkanavalin A pokazao statistički značajno povećanje intenziteta u odnosu na proliferativni odgovor u kontrolnoj skupini životinja, dok je nakon prestanka kliničkih simptoma (34-og dana po aktivnoj imunizaciji) isti bio snižen.

g) **Imunohistološka analiza CNS-a** je pokazala prisutnost W3/25 pozitivnih stanica u CNS-u AO štakora *in vivo* tretiranih somatostatinom (od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji) uz odsustvo stanica pozitivnih na OX8, Mac-1 i Mac-3 biljeg. U AO štakora *in vivo* tretiranih fiziološkom otopinom od sedmog do devetog dana po aktivnoj imunizaciji imunohistološka pokazala je prisutnost stanica pozitivnih na OX8, Mac-1 i Mac-3 biljeg uz odsustvo stanica pozitivnih na W3/25 biljeg.

Sumarno mogli bi reći da somatostatinski analog SMS 201-995 može modulirati tijek EAE u štakora. Učinak mu, međutim, ovisi o vremenu i mjestu aplikacije što se može objasniti njegovim izravnim djelovanjem na limfatičke stanice, ali i neizravnim učincima, vezanim uz izazivanje poremećaja u neuroendokrinoj homeostazi.

## **7. POPIS LITERATURE**

1. ADER R, FELTEN DI and COHEN N eds 1991 Psychoneuroimmunology, 2nd Ed, Academic, New York
2. ALEGRETTI N i suradnici 1991 IV izdanje, Školska knjiga Zagreb
3. ALVORD EC Jr, KIES MW, SUCKLING AJ 1984 Experimental allergic encephalomyelitis - a useful model for multiple sclerosis Alan Liss, New York
4. BAR-SHAVIT Z, GOLDMAN R, STABINSKY Y et al Enhancement of phagocytosis-a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence; Biochem Biophys Res Commun 94:1445-1451
5. BARNETT L and FUJINAMI RS 1992 Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. FASEB 840-844
6. BARON JL (nepublicirana observacija)
7. BARON JL, MADRI JA, RUDDLE NH, HASHIM G and JANEWAY CA 1993 Surface expression of a  $\alpha 4$  integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. J Exp Med 177:57-68
8. BASBAUM AJ, FIELDS HL 1984 Endogenous pain control system brain spinal pathways and endorphin circuits. A Rev Neurosci 7:309-338
9. BATEMAN A, SINGH A, KRAL T, SOLOMON S 1989 The immune hypothalamic pituitary axis. Endocr Rev 10:92-112
10. BAZAN JF 1991 Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. Neuron 7:197-208
11. BEHAN P O, CURRIE S 1978 Clinical Neuroimmunology. W.B. Saunders. London, 1-19, 61-80,97-112
12. BEITZ AJ, SHEPAR RD, WELLS W 1983 The periaqueductal gray-raphe magnus projection contains somatostatin, neurotensin and serotonin but not cholecystocynin. Brain Res 261:132-137
13. BELL GI and REISINE T 1993 Molecular biology of somatostatin receptors. Trends Neurosci 16:34-38
14. BENET GW, EDWARDSON JA, MARCANO De CD, BERELOWITZ M, PRIMSTONE B, KRONHEIM S 1979 Release of somatostatin from rat brain synaptosomes. J Neurochem 32:1127

15. BENEVENISTE EN, SPARACIO SM and BETHEA JR 1989 Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances interferon- $\gamma$  mediated class II antigen expression on astrocytes. *J Neuroimmunol* 25:209
16. BENVENISTE EN, SPARACIO SM, NORRIS JG, GRENET HE and FULLER GM 1990 Induction and regulation of IL-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 30:201
17. BERCZI I ed 1986 *Pituitary Function and Immunology* CRC Press, Boca Raton, Florida
18. BEVILACQUA MP, POBER JS, WHEELER ME, COTRAN RS and CIMBRONE MA Jr 1985 Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leucocytes, monocytes and related leucocyte cell lines. *J Clin Invest* 76:2003-2011
19. BHATENA SJ, LOVIE J, SCHECHTER GP, REDMAN RS, WAHL RS, RECENT L 1981 Identification of human mononuclear leucocytes and glucagon. *Diabetes* 30:127-130
20. BHATENA SJ, RECENT L 1980 Somatostatin receptors on circulating human blood cells. *Hormone Metab Res* 12:277-278
21. BILLIAU A, HEREMANS H, VANDEKERCKHOVE F, DIJKMANS R, SOBIS H, MEULEPAS E and CARTON H 1988 Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN- $\gamma$ . *Journal of Immunology*, 140:1506-1510
22. BLALOCK JE 1989 A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 69:1-32
23. BORNSTEIN MB, MILLER A, SLAGLE S, WETZMAN M, CRYSTAL H, DREXLER E, KEILSON M, MERRIAM M, WASSERTHEIL-SMOLLER S, SPADA V, WEIS W, ARNON R, JACOBSON I, TEITELBAUM D, and SELA M 1987 A pilot trial of Cop1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 317:408-414
24. BOTAZZO GF, PUYOL-BORRELE R, HANAFUSA T, and FELDMANN M 1983 Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 2, 1115-1118
25. BOURNE HR, LICHENSTEIN LM, MELMON L, HENNY C, WEINSTEIN Y, SHEARER GM 1974 Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 184:19-27

26. BRAZEAU P, VALE W, BURGUS R 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*:179:77-79

27. BREAK E, BREAK H, WEINDL A 1985 Somatostatin-like immunoreactivity in non pyramidal neurons of the human isocortex. *Anat. Embriol* 173:237-246

28. BRETT J, GERLACH H, NAWROTH P, STEINBERG S, GODMAN G and STERN D 1989 Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169:1977

29. BROWN M, RIVIER J, VALE W 1981 Somatostatin-28: selective action on pancreatic B-cells and brain. *Endocrinology* 108:2391-2393

30. BROWN MR 1983 Central nervous system sites of action of bombesin and somatostatin to influence plasma epinephrine levels. *Brain Research* 246:253

31. BROWNSTEIN M 1978 Are hypothalamic hormones central neurotransmitters? *Centrally Acting Peptides*. Huges J. The Macmillan Press LTD. Biological Concil: The coordination comitee for symposium in drug action. 37-48

32. BURGER MM, BOMBI BM, BRECANRIDGE BMcL, SHEPPARD JR 1972 Growth control and cyclic Amp in cell cycle. *Nature New Biol* 239:161-163

33. BURKLEY LC, Lo D, KANAGAWA O, BRINSTER RL & FLAVILLE RA 1989 T cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with non-lymphoid expression of MHC class II I-E. *Nature* 342:564.

34. BURNS FR, LI X, SHEN N, OFFNER H, CHOU Y, VANDENBARK AA and HEBER-KATZ E 1989 Both rat and the mouse T cell receptors specific for the encephalitogenic determinant of myelin basic protein and similar  $V\alpha$  i  $V\beta$  chain genes even though the major histocompatibility complex and encephalitogenic determinants being recognized are different. *J Exp Med* 169:27-39

35. BUTCHELOR JR, COMPSTON A and Mc DONALD 1978 The significance of the association between HLA and multiple sclerosis *Br Med Bull* 34:279

37. CANELLA B, CROSS A H, and RAINE S C 1990 Upregulation and coexpression of adhesion molecule correlate with relapsing



autoimmune demyelination in the central nervous system. *J Exp Med* 172:1521-1524

38. CANNELLA B and RAINE C S 1989 Cytokines up-regulate Ia expression in organotopic cultures of central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 24:239-248

39. CHAN SH, PERUSSIA B, GUPTA JW, KOBAYASKHI M, POSPISIL M, YOUNG HA, WOLF SF, YOUNG D, CLARK SC and TRINCHIERI G 1991 Induction of interferon  $\gamma$  production natural killer cell stimulatory factor: characterisation of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173:869-879

40. CHEN Y, KUCHROO VK, INOBE J, HAFLER DA, WEINER HL 1994 Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240

41. CHUNG IY and BENVENISTE EN 1990 Tumor necrosis factor  $\alpha$  production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$ , and IL-1  $\beta$ . *J Immunol* 144: 2999-3007

42. CHUNG IY, NORRIS JG and BENVENISTE EN 1991 Differential tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant rat strains. *J Exp Med* 173: 801-811

43. COHEN I R & WEINER H L 1988 T cell vaccination *Immunol Today* 9, 332-335

44. CORREALE J, OLSSON T, BJÖRK J, SMEDEGÅRD G, HÖJEBERG B and LINK H 1991 Sulfasalazine treatment of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: Disease relapse and increase of autoreactive T cells. *Journal of Neuroimmunology* 34:109-120

45. CRAIG SW, CEIRA JJ 1971 Peyer's patches: an enriched source of precursors for Ig A producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* 1971:134:188

46. CRAMER H, SCHAUDT D, RISSLER K, STRUBEL D, WARTER JM, KUNTZMANN F 1985 Somatostatin-like immunoreactivity and substance P-like immunoreactivity in the CSF of patients with senile dementia of Alzheimer type, multi-infarct syndrome and communicating hydrocephalus. *J Neurol* 232:346-351

47. CROWLEY WR, TERRY LC 1980 Biochemical mapping of somatostatinergic systems in the rat brain. *Brai Res* 283:291

48. CUNNINGHAM BA, HEMPERLY JJ, MURRAY BA, PREDIGER EA, BRACKENBURY R and EDELMAN GM 1987 Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806
49. DAVIDSEN B D 1988 Concanavalin A induced suppressor activity exerted by peripheral blood mononuclear cells-with special reference to chronic inflammatory bowel disease. *Danish Med Bulletin* 35:201-221
50. DAYNES RA, ARANEO BA 1989 Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin-2 and interleukin-4. *Eur J Immunol* 19:2319-2325
51. DEGREE M, DAHL H, VANDVIK B 1976 Interferon in the serum and cerebrospinal fluid patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *Acta Neurol Scand* 53:152.
52. DINARELLO CA 1984 Interleukin 1. *Rev of Infect Dis* 6:51
53. EFENDIĆ S, HOKFELT T, LUFT R 1978 *Adv Metab Disord* 9: 367-424
54. EFENDIĆ S, LUFT R 1980 Somatostatin. *Ann Clin Res* 12:87-94
55. ELSON CO, HECK JA, STROBER WT 1979 T cell regulation on murine Ig A synthesis. *J Exp Med* 149:632
56. FABRY Z, RAINE CS and HART MN 1994 Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunology Today* 15:218-224
57. FELTEN DL, FELTEN SY, BELLINGER DL, CARLSON SL, ACKERMAN KD, MADDEN KS, OLSCHOWKI JA, LIWNAT S 1987 Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: the structure and the function. *Immunol Rev* 100:225-260
58. FIERZ W, ENDLER B, RESKE K, WEKERLE H and FONTANA A 1985 Astrocytes as antigen presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol.* 134:3785
59. FINSEN B, SORENSEN T, CASTELLANO B., PEDERSEN EB and ZIMMER J 1991 Leucocyte infiltration and glial reaction in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. *J Neuroimmunol* 32:159-183

60. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMAN TR 1989 Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081
61. FISCHER DA and BROWN MR 1980 Somatostatin analog: Plasma catecholamine suppression mediated by the central nervous system *Endocrinology* 107:(3) 714-718
62. FONTANA A, FIERZ W and WEKERLE H 1984 Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cell lines. *Nature (Lond.)* 307:273-276
63. FONTANA A, FREI K, BADMER S and HOFER E 1987 Immune-mediated encephalitis: on the role of antigen-presenting cells in brain tissue. *Immunol Rev* 100:185
64. FONTANA A, KRISTENSEN F, DUBS R, GEMSA D and WEBER E 1982 Production of prostaglandin E and interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol* 129:2413
65. FREI KD, NODAL D, PFISTER HF, and FONTANA A 1993 Lysteria meningitis: identification of cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin 10. *J Exp Med* 178:1255
66. FRITZ RB, JEN CHOU CH, Mc FARLIN DE 1983 Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL)F1 mice by myelin basic protein and its peptides. Localisation of a second encephalitogenic determinant. *J. Immunol.* 130:191
66. FROHMAN EM, FROHAMN TC, DUSTIN ML, VAYUVEGULA B, CHOI B, GUPTA A, van der NOORT S and GUPTA S 1989 The induction of intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , lymphotoxin and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol* 23:117
67. FUJIMOTO WY, ENSINCK JW, WILLIAMS RH 1974 Somatostatin inhibits insulin and glucagon release by monolayer cell cultures of rat endocrine pancreas. *Life Sci* 15:1999-2001
68. FUJINAMI RS, and OLDSTONE MBA 1985 Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and viruses: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045
69. FUKAYAMA M, HAYASHI Y, SHIOZAWA Y, MAEDA Y, and KOIKE m 1990 Human chorionic gonadotropin in the thymus. *Am J Pathol* 136:123-129

70. FULLER PJ and VERITY K 1989 Somatostatin gene expression in the thymus gland. *J Immunol* 143:1015-1017

71. GARSIA-SEVILLA JA, MAGNUSSON T, CARLSSON A 1978 Effect of intracerebroventricularly administered somatostatin on brain monoamine turnover. *Brain Res* 155:159-164

72. GASSER DL and all 1973 Genetic control of susceptibility of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Science* 181:872-873.

73. GASSER DL, NEWLIN CM, PALM J and GONATAS NK 1973 Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Science* 181:872-873

74. GEHRMAN J, GOLD R, LINNINGTON C, LANNES-VIEIRA J, WEKERLE H and KREUTZBERG GW 1993 Microglial involvement in experimental autoimmune inflammation of the central and peripheral nervous system. *Glia* 7:50-59

75. GIULIAN D, LACHMAN LB 1985 Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228:497

76. GIULIAN D, BAKER T, J SHIH L-CN and LACHMAN LB 1986 Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 164:594

77. GO C, MILLER J 1992 Differential induction of transcription factors that regulate the interleukin 2 gene during anergy induction and restimulation. *J Exp Med* 175:1327-1336

78. GOETZL EJ, ADELMAN DC, and SREEDHARAN SP 1990 *Neuroimmunology*, *Adv Immunol* 48:161-190

79. GOETZL EJ and SREEDHARAN SP Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *The FASEB Journal* vol 6:2646-2652, June 1992

80. GOLDMAN MP, DRAET P and GLEICHMANN E 1991 Th2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 12:223

81. GOMARIZ RP, LORENZO MJ, CACICEDO L, VICENTE A, and Zapata AG 1990 Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus. *Brain Behav Immun* 4:151-161

82. GORDON LB, KNOPF PM, CSERR HF 1992 Ovalbumin is more immunogenic when introduced into brain or cerebrospinal fluid than into extracerebral sites. *J Neuroimmunol* 40:81-88
83. GOVERMAN J, WOODS A, LARSON L, WEINER L P, HOOD L and ZALLER DM 1993 Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72:551-560
84. GRUNDQUE-IQBAL I, LASSMANN H, WISNIEWSKI H M 1980 Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Immunohistochemical studies. *Arch Neurol* 37:651-656
85. HAPP MP, WETTSTEIN P, DIETZCHOLD B, and HEBER-KATZ E 1988 Genetic control of the development of experimental allergic encephalomyelitis in rats: Separation of MHC and non-MHC gene effects. *J Immunol* 141:1489-1494
86. HARLING-BERG C, KNOPF PM 1991 Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1991:35:45-51
87. HARLING-BERG C, KNOPF PM, MERRIAM J, CSERR HF 1989 Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused in rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 25:185-193
88. HASKARD D, CAVANDER D, BEATTY P, SPRINGER P and ZIFF M 1986 T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol* 137:2901-2906
89. HEATH WR, ALLISON J, HOFFMAN MW, SCHONRICH G, HAMMERLING C, ARNOLD B & MILLER JFAP 1992 Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 359:547
90. HEDRICK SM, ENGEL I, Mc ELLIGOTT DL, FINK PJ, HSU ML, HANSBURG D, MATIS LA 1988 Selection of amino acid sequences in the beta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239:15141.
90. HICKEY WF 1991 Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1, 97-105
91. HICKEY WF and HIROMITSU K 1988 Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science (Wash.DC.)* 239:290-292

92. HICKEY WF, HSU BL and KIMURA H 1991 T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neuro Sci Res* 28:254-260

93. HIGGINS P J and WEINER H L 1988 Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen specific CD8+T lymphocytes. *J Immunol* 142:748-752

94. HINTERBERGER W, CERRY C, KINAST H, POINTER H, TRAGL H 1978 Somatostatin reduces the release of colony-stimulating activity (CSA) from PHA-activated mouse spleen lymphocytes. *Experientia* 34:860-862

95. HO RH 1988 Somatostatin Immunoreactive structures in the rat developing spinal cord. *Brain Research Bulletin* 21:105-116

96. HOLDA JH and SWANBORG R H 1982 Autoimmune effector cells. 2. Transfer of experimental allergic encephalomyelitis with a subset of lymphocytes T. *Eur. J. Immunol.*12:453-455

97. HOWARD M and O' GARRA A 1992 Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today*, 13:198-200

98. HURTNUG HP, WOLTERS K, TOYKA KV 1986 Binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. 136:3856-3863

99. HURWITZ AA, LYMAN WD, GUIDA MP, COLDERON TM, BERMAN JW Tumor necrosis factor induces adhesion molecule expression on human fetal astrocytes. *J Exp Med* 176:1992

100. IJZERMANS JNM and MORQUET RL 1989 Interferon gamma: a review. *Immunobiology* 179:456-73

101. ISSAZADEH S, LJUNGDAHL Å, HÖBERG B and OLSSON T 1994b Dynamics of mRNA expression for interleukin 10, Interleukin 12, cytolysin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and  $\beta$  in the central nervous system of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis. In preparation.

102. ISSAZADEH S, MUSTAFA M, LJUNGDAHL Å, HÖBERG B and OLSSON T 1994a Interferon- $\gamma$ , interleukin 4 and transforming growth factor  $\beta$  in experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats; dynamics of cellular mRNA expression in the central nervous system and lymphoid cells. *Journal of neuroscience*, in press.

103. JACSON KM, YATES AM, OROSZ CG and WHITACRE CC 1987 Gangliosides suppress the proliferation of autoreactive cells in

experimental allergic encephalomyelitis: gangliosides effects on IL-2 activity. *Cell Immunol* 104:169.

104. JENKINS MK, PARDOLL DM, MIZUGUCHI J, CHUSED TM and SCHWARTZ RH 1987 Molecular basis in the induction of a nonresponsive state in interleukin-2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5409.

105. JENKINS MK, SCHWARTZ RH 1987 Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165:302

106. JOHNSON RT 1983 Persistent viral infections and demyelinated disease. In *Viruses and Demyelinating Diseases/MIMS CA, CUZNER ML AND KELLY RE., (EDS) pp7-19, Academic, New York*

107. JOLY EL, MUCKE L and OLDSTONE MBA 1991 Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science (Wash. DC)* 253:1283

108. KALIA M, FUEL K, AGNATI L, HÖKFELT T, ÄRFSTRAND A 1984 Somatostatin produces apnea and is localised in medullary respiratory nuclei/ possible role in apneic syndromes. *Brain Res* 296:339-343

109. KALLEN B and NILSSON O 1986 The dissociation between histological and clinical signs of experimental auto-immune encephalomyelitis. *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. A.* 94: 159-164

110. KARALIS K, MASTORAKOS G, CHROUSOS GP, TOLIS G 1994 Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 93:(5):2000-2006

111. KARLSSON L, PELERAUX R, LINDSTED R, LILJEDAHL M, ter PETERSON A 1994 Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 266:1569-1573

112. KARPUS WJ and SWANBORG RH 1991 CD4+ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Immunol* 146:1160-1168

113. KARPUS WJ, GTOULD KE and SWANBORG RH 1992 CD4<sup>+</sup> suppressor cells of autoimmune encephalomyelitis respond to T cell receptor-associated determinants of effector cells by interleukin-4 secretion. *European Journal of Neuroscience*, 22:1757

114. KARUSIS DM, SLAVIN S, LEHMAN D, MIZRACHI-KOLL R, ABRAMSKY O, BEN-NUN A 1992 Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis and induction of tolerance with acute immunosuppression followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 148:1693-1698

115. KEITH AB 1978 Sex difference in Lewis rats in the incidence of recurrent experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 272:824

116. KENNEDY MK, Dal CANTO MC, TROTTER JL and MILLER SD 1988 Specific immune regulation of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 141:2986-2993

117. KENNEDY MK, TAN LL-J, Dal CANTO MC, TOUHY VK, LU Z, TROTTER JL and MILLER SD 1990 Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J Immunol* 144:909-915

118. KENNEDY MK, TORRANCE DS, PICHA KS and MOHLER KM 1992 Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *Journal of Immunology* 149:2496-2505

119. KENNEDY MK, TORRANCE DS, PICHA KS and MOHLER KM 1992 Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *Journal of Immunology* 149:2496-2505

120. KESSLER JA, ADLER JE, BLACK B 1983 Substance P and somatostatin regulate sympathetic noradrenergic function. *Science* 221:1059-1061

121. KHOURY SJ, HANCOCK WW and WEINER HL 1992 Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor  $\beta$ , interleukin 4 and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med*, 176:1355-1364

122. KIEVIT J, KUYPERS HGJM 1974 Basal forebrain and hypothalamic connections to frontal and parietal cortex in resus monkey. *Science* 187:660-662



123. KLUXEN F, BRUNS C and LUBBERT H 1992 Expression cloning a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc Acad Sci* 89:4618-4622
124. KOHLER J, SCHRÖTER E, CRAMER H 1982 Somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of neurological patients. *Arch. Psychiatr Nervenkr* 231:503-508
125. KOJIMA K, BERGER T, LASSMANN H, HINZE-SELCH D, ZHANG Y, GEHRMANN J, RESKE K, WEKERLE H and LININGTON C 1994 Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 $\beta$  molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 180:817-829
126. KOPROWSKI H et al 1960 Etudes sur le mechanisms de l'encephalite allergique chez le Rat. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*. 250:2956-2958
127. KUCHROO VK, MARTIN CA, GREER JM, JU S-T, SOBEL RA and DORF ME 1993 Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 151:4371
128. KURUVILLA AP, SHAH R, HOCHWALD GM, LIGGITT HD, PALLADINO MA and THORBECKE GJ 1991 Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci* 88:2918-2921
129. LAFFERTY K J & CUNNINGHAM A J 1975 A new analysis of allogenic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53:27
130. LAMBRACHT HALL M, KONSTANTINIDOU A D and THEOHARIDES T C 1990 Serotonin release from rat brain mast cells in vitro. *Neuroscience* 39:199-207
131. LAMONT, A. G., GORDON, M., FERGUSON, A. 1988 T lymphocyte function in protein deprived mice. *Clin. Exp. Immunol.* 72:113-117
132. LAMPSON L 1987 Molecular basis of the immune response to neural antigens. *Trends Neurosci* 10:211-216
133. LANDO Z, TEITELBAUM D, and ARNON R 1979 Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE. *J Immunol* 123:2156-2160

134. LANGMAN R E 1989 The immune system. Academic Press, Inc, New York
135. LANIER LL, CHANG C, AZUMA M, RUITENBERG JJ, HEMPERLY JJ, and PHILLIPS JH 1991 Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146:4421-4426
136. LAVI E, SUZUMURA A, MURASKO D M, MURRAY E M, SILBERBERG D H and WEISS S K 1988 Tumor necrosis factor induces expression of MHC class I antigens on mouse astrocytes. *J Neuroimmunol* 18:245
137. LEDER RA and PAUL WE 1994 Acquisition of lymphokine-producing phenotypes by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635
138. LEE CM, IVERSEN LL 1981 Release of somatostatin from extrahypothalamic rat brain slices: Inhibition by dopamin and morphine *Brain Res* 219:355-361
139. LIDER O, SANTOS L B M., LEE CSZ., HIGGINS P J, and WEINER HL 1989 Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein: II Suppression of disease and in vitro immune responses mediated by antigen specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 142:748-752
140. LININGTON C, BERGER T, PERRY L, WEERTH S, HINZSELCH D, ZHANG Y, LU HSI-CHI, LASSMANN H and WEKERLE H T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23(6):1364-1372
141. LJUNGAHL Å, OLSSON T, Van der MEIDE P, HOLMDAHL R, KLARESKOG L and HÖJEBERG B 1989 Interferon-gamma-like immunoreactivity in certain neurons of the central and peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 24:451-456
142. LOGIN IS, JUDD AM 1986 Trophic effects of somatostatin on calcium flux: dynamic analysis and correlation with pituitary hormone release. *Endocrinology* 119:1703-1707
143. LUINI A, LEWIS D, GUILD S, SHOFIELD G G & WEGIHT FF 1986 Somatostatin an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltage-dependent calcium current in the pituitary cell line. *Journal of Neuroscience* 6: 3128-3132
144. Mac MICKING JD, WILLENBORG DO, WEIDEMANN MJ, ROCKETT KA and COWDEN WB 1992 Elevated secretion of reactive

nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis. Enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J Exp Med* 176:303-307

145. Mac NEIL IA, SUDA T, MOORE KW, MOSMANN TR and ZLOTNIK A 1990 IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 145:4167

146. MAIN E K, MONOS D S AND LAMPSON L A 1988 IFN- $\gamma$ -treated neuroblastoma cell lines remain resistant to T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 141:2943

147. MARTIN JB and REICHLIN S 1987 *Clinical Neuroendocrinology* FA Davis, Comp., Philadelphia.

148. MASON D 1991 Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. *Immunol Today* 12:57-60

149. MASON DW, Mac PHEE I, ANTONI F 1990 The role of the neuroendocrine system in determining genetic susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Immunology* 70:1-5

150. MASSA P T Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain enriched gangliosides. *J Exp Med* 178:1357-1363

151. MASSA P T, BRINKMANN R AND V ter MEULEN 1987 Inducibility of Ia antigen on astrocytes by murine coronavirus JHM is rat strain dependent. *J Exp Med* 166:259

152. MASSA P T, COWAN E P, LEVI B-Z, OZATO K AND Mc FARLIN D E 1989 Genetic regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) antigen induction on astrocytes. *J Neuroimmunol* 24:125

153. MASSA P T, SCHIMPL A, WECKER E and V ter Meulen 1987 Tumor necrosis factor amplifies measles virus-mediated Ia induction on astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7242

154. MASSA PT, ter MEULEN V and FONTANA A 1987 Hyperinducibility of Ia astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4219-4223

155. Mc COY KL, NOONE M, INMAN JK and STUTZMAN R 1993 Exogenous antigens internalized through transferrin receptors activate CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunology* 150:1691-1704

156. MILLER A, ALSABAGH A, SANTOS LBM, PRABHU-DAS M and WEINER HL 1993 Epitopes of myelin basic protein (MBP) that trigger TGF- $\beta$  release following oral tolerization to MBP are different from encephalitogenic epitopes. *Journal of Immunol.* 151:7307-7315

157. MILLER A, HAFLER DA and WEINER HL 1991 Tolerance and mechanisms in experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for immunotherapy of human autoimmune diseases. *Faseb*, 5: 2560-2566

158. MILLER RG 1986 Veto phenomenon and T-cell regulation *Immunol Today* 7:112

159. MIOSSEC P, YU C H and ZIFF M 1984 Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin-1. *J Immunol* 133:2007

160. MÖLLER G 1987 Antigenic requirements for the activation of MHC restricted responses. *Immunol. Rev.* 98:1

161. MOREL G, LEROUX P, GARCIA CABALLERO T, BEIRAS A, GOSSARD F 1990 Ultrastructural distribution of somatostatin-14 and -28 in rat adrenal cells. *Cell Tissue Res* 261: 517-524

162. MOSMANN TR and COFFMAN RL 1989 Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173

163. MOSTARICA-STOJAKOVIĆ M, PETROVIĆ M, & LUKIĆ ML 1989 Resistance to the induction of EAE in AO rats. Its prevention by the pretreatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clin Exp Immunol* 50:311-317

164. MOWAT A M 1987 The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 8:93-98

165. MUHVIĆ D, RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ B, PUGEL E, RUKAVINA D, SEPČIĆ J and EFENDIĆ S 1992 Modulation of experimental allergic encephalomyelitis by somatostatin. *Ann N Y Acad Sci* 650:170-178

166. MÜLLER V, JONGENEEL CV, NADOSPASOV SA, LINDAHL K F and STEINMETZ M 1987 Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in mouse major histokompatibility complex *Nature (Lond.)* 325:265

167. MUSTAFA M, DIENER P, HÖJEEBERG B, Van der MEIDE P and OLSSON T 1991 T cell immunity and interferon- $\gamma$  secretion during experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of Neuroimmunology* 31:165-177
168. MUSTAFA M, VINGSBO C, OLSSON T, LJUNGDAHL Å, HÖJEBERG B and HOLMDAHL R 1993 The major histocompatibility complex influences myelin basic protein 63-88 induced T cell cytokine profile and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J of Immunol* 23:3089-3095
169. NOHAVA K, MALIPIERO U, FREI K and FONTANA A 1992 Neurons and neuroblastoma as a source of macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 22:2539-2545
170. NUSSENBLATT RB, CASPI RR, MAHDI R, CHAN C-C, ROBERGE F, LIDER O and WEINER HL 1989 Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol* 144: 1689-1695
171. OFFNER H, VAINIENE M, GOLD DP, CEELNIK B, WANG R, HASHIM GA and VANDENBARK AA 1992 Characterisation of the immune response to a secondary encephalitogenic epitope of basic protein in Lewis rats. T cell receptor peptide regulation of T cell receptor peptide regulation of T cell receptor V $\beta$  expression predominates in spinal cord infiltrating T cells. *J Immunol* 148:1712
172. OLSSON T, HOLMDAHL R, KLARESKOG L and FORSUM U 1983 Ia expressing cells and T lymphocytes of different subsets in peripheral nerve tissue during experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Scandinavian Journal of Immunology* 18:339-343
173. OLSSON T, MAEHLÉN J, LÖVE A, KLARESKOG L and KRISTENSSON K 1987 Induction of class I and II transplantation antigens in rat brain during fatal and non-fatal measles virus infection. *Journal of Neuroimmunology* 16:215-224
174. OTAWAY CA, BERNAERTS C, CHAN B, GRENBORG GR 1983 Specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* 61:644
175. PANITCH HS, HIRSCH RL, SCHINDLER J and JOHNSON KP 1987 Treatment of multiple sclerosis with  $\gamma$ -IFN exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37:1097-1102
176. PAWLIKOWSKI M, KUNERT-RADEK J, STEPIEN H 1988 Somatostatin - an antiproliferative hormone? *Progress in neuropeptide research*, Birkhauser Verlag Basl 55:61

177. PAWLIKOWSKI M, STEPIEN H, KUNERT-RADEK J, YELAZOWSKY P, SCHALLY A 1987 Immunomodulatory action of somatostatin. *Ann N Y Acad Sci* 496:233-239
178. PAWLIKOWSKI M, STEPIEN H, KUNERT-RADEK J, SCHALLY A V 1985 Effect of somatostatin on proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 129:1/52-55
179. PAYAN DG, BREWSTER DR, GOETZL EJ 1983 Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131:1613
180. PAYAN DG, HESS CA, GOETZL J 1984 Inhibition by somatostatin of T-lymphocytes and Molt-4 lymphoblast. *Cell Immunol* 84:433-438
181. PETTINELLI CB and Mc FARLIN DE 1981 Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: Requirement for Lyt 1+2-T lymphocytes. *J Immunol* 127:1420
182. PICKER LJ and BUTCHER EC 1992 Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10:561
183. PIOTROWSKI W, FORMAN JC 1985 On the actions of substance P, somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide on rat peritoneal mast cells and human skin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 331:364-368
184. POBER JS, LAPIERRE LA, STOLPEN AH, BROCK TA, SPRINGER TA, FIERS W, BEVILACQUA MP, MENDRICK DL and GIMBRONE MA 1987 Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 138:3319
185. POLIĆ L, RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ B, RUKAVINA D, EFENDIĆ S 1983 Humoral immune response of mice and rats treated with somatostatin. *Period biol* 85:(Supp 3):101-102
186. POLIĆ L, RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ B, RUKAVINA D, EFENDIĆ S 1985 Survival of allogeneic tumor transplantat in mice treated with somatostatin. *Jug Physiol Pharmacol Acta* 21:267-269
187. POWELL MB, MITCHEL D, LEDERMAN J, BUCHMEIER J, ZAMVIL SS, GRAHAM M, RUDDLE NH and STEINMAN L 1990

Lymphotoxin production of myelin basic protein specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *International Immunology*, 2:539

188. POWELL MB, MITCHELL D, LEDERMAN J, BUCKMEIER J, ZAMVIL SS, GRAHAM M, RUDDLE NH and STEINMAN L 1990 Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein specific T cell lines correlate with encephalogenicity. *Int Immunol* 2:539

189. PRANGE AJ, NEMEROFF CB, LOOSEEN PT 1978 Behavioral effects of hypothalamic peptides, Centrally Acting Peptides. Huges J The Macmillan Press LTD. Biological Council: The coordination committee for symposia on drug section 99:118

190. RACKE M, CANELLA B, ALBERT P, SPORN M, RAINE CS and Mc FARLIN DE 1992 Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-b1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Interational Immunology*, 5:615-620

191. RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ, B 1996 (Rad u pripremi)

192. RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ B, POLIĆ L, RUKAVINA D, EFENDIĆ S 1983 Inhibition of local graft-versus-host reaction in mice. *IRCS Med Sci* 11:1097

193. RADOŠEVIĆ-STAŠIĆ B, TROBONJAČA Z, LUČIN P, ČUK M, POLIĆ B and RUKAVINA D 1995 Immunosuppressive and antiproliferative effects of somatostatin analog SMS 201-995. *Intern J Neuroscience* 81:283-297

194. RAINE C S, CANELLA A M, DIJVESTIJN A M and CROSS A H 1990 Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest* 63:476

195. RAMMENSEE HG, KROSCHEVSKI R and FRANGUOLIS B 1989 Clonal anergy induced in Vb6+ T lymphocytes on immunising Mls-1<sup>b</sup> mice with Mls-1<sup>a</sup> expressing cells. *Nature* 339:541

196. RAMSDELL F, LANTZ T and FOWLKES BJ 1989 A non-deletional mechanism of thymic self-tolerance. *Science* 246:1038-1041

197. RAYNOR K and REISINE T 1993 Somatostatin receptors. *Crit Rev Neurobiol* 16:273-289

198. RAYNOR K, MURPHY W, COY D, TAYLOR J, MOREAU J-P, YASUDA K, BELL G and REISINE T 1993 Cloned somatostatin

receptors: Identification of subtype selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. *Molec. Pharmac.* 44:385-392

199. RENNO T, LIN JY, PICCIRILLO C, ANTEL J and OVENS T 1994 Cytokine production by cells in cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *Journal of neuroimmunology*, 49,1-7

200. RICHARDSON S B, HPOLLANDER C S, PRASAD J A, JHIROOKA Z 1981 Somatostatin release from the rat hypothalamus *in vitro*. Effects of melatonin and serotonin. *Endocrinology* 109:602-606

201. RICHMAN L, GRAEFF AS, YARCHOAN R, STROBER W 1981 Simultaneous induction of antigen specific Ig A helper T cell and Ig G suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J Immunol* 126:20

202. ROBBINS D S, SHIRAZZI Y, DRYSDALE B E, LEIBERMAN A, SHIN H S and SHIN M L 1987 Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* 139:2593

203. ROBERT F, GREENEN V, SCHOENEN J, BURGEON E, De GROOTE D, DEFRESNE MP, LEGROS JJ and FRANCHIMONT P 1991 Colocalization of immunoreactive oxytocin, vasopressin and interleukin-1 in human thymic epithelial neuroendocrine cells. *Brain Behav Immun* 5:102-115

204. RÖCKEN MJ, URBAN J and SHEVACH EM 1994 Antigen specific activation, tolerization and reactivation of the interleukin pathway *in vivo*. *J Exp Med* 179:1885

205. ROOT O, FLEISCHER B and CASH E Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1994, 24:1434-1440

206. ROSENAL BM H.O.R.N. An electron microscopic study of somatostatin immunoreactive structures in lamina II of the rat spinal cord. *Brain Research Bulletin* 22:439-451

207. RUDDLE N 1992 Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and limfotoksin (TNF- $\beta$ ). *Current opinion in immunology*, 4:327-332

208. RUDDLE N, BERGMAN CM, Mc GRATH KM, LINGENHELD EG, GRUNNET ML, PADULA SJ and CLARK RB 1990 An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med*, 172:1193-1200



209. RUFF MR, WUHL SM, PERT CB 1985 Substance P receptor mediated chemoraxis of human monocytes. *Peptides* 6/suppl. 2/107-111

210. SASSOLAS G, HARRIS G, DEIDIER-JAMES A and the French SMS 201-995 acromegaly study group. 1990 Long effect of incremental doses of the somatostatin analogue SMS 201-995 in 58 acromegalic patients. *J Clin Endocrinol & Metab* 71:391-397

211. SCHLUESNER HJ and LIDER O 1989 Transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2: Cytokines with identical immunosuppressive effects and a potential role in the regulation of autoimmune T cell function. *Journal of Neuroimmunology*, 24:249-258

212. SCHONDRICH G, MOMBERG F, MALISSEN M, SCHMIDT-CERHULST AM, MALISSEN B, HAMMERLING GJ and ARNOLD B 1992 Distinct mechanisms of extratymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen. *Int Immunol* 4:581

213. SCHUSNER M and HAMMERLING U 1974 The postnatal development of antigens on mouse brain cell surfaces. *Brain Res* 73:362

214. SCHWARTZ RH 1990 A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349-1356

215. SCICCHITANO R, DAZIN P, BIENENSTOCK J, PAYAN DG, STANISZ AM 1988 The murine Ig-A secreting plasmocytoma MOPC-315 expresses somatostatin receptors. *J Immunology* 141/3:937-941

216. SEBOUN E, ROBINSON MA, DOOLITTLE TH, CUILLA TA, KINDT TJ and HAUSER SL 1989 A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor B chain complex. *Cell* 57:1095-1100

217. SEDWICK JD, Mc PHEE JHM and PUKLAWEC M 1989 Isolation of encephalitogenic CD4<sup>+</sup> T cell clones in the rat. Cloning methodology and IFN- $\gamma$  secretion. *Journal of Immunology Methods*, 143:3492-3497

218. SELMAJ KW and RAINE CS 1988 Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23:339

219. SELMAJ KW, FAROOQ M, NORTON WT, RAINE CS and BROSANAN CF 1990 Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144:129

220. SELMAJ KW, RAINE CS and CROSS AH 1991 Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 30:694
221. SELMAJ KW, RAINE CS, CANNELLA B, and BROSANAN CF 1991 Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87:949-954
222. SELMAJ KW and RAINE CS 1988 Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage *in vitro*. *Annals of Neurology* 23:339-346
223. SHANAHAN F, DENBURG JA, FO XJ, BIENENSTOCK J, BEFUS D 1985 Mast cell heterogeneity: Effect of neuroenteric peptides on histamin release. *J Immunol* 135:1331-37
224. SIBLEY WA, BAMFORD CR and CLARK K 1985 Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1, 1313-1315
225. SILVERMAN BL, BETTENDORF M, KAPLAN SL, GRUMBACH MM, MILLER WL 1989 Regulation of growth hormone (GH) secretion by GH-releasing factor, somatostatin and insulin-like growth factor I in ovine fetal and neonatal pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 124:84-89  
227
226. SINHA AA, LOPEZ MT and Mc DEVITT HO 1990 Autoimmune disease: The failure of self tolerance. *Science* (Wash. DC) 248:1380
227. SMITH EM, GALIN FS, Le BOEUF RD, COPPENHAVER DH, HARBOUR DV, and BLALOCK JE 1990 Nucleotide and amino acid sequence of lymphocyte-derived corticotropin: Endotoxin induction of a truncated peptide. *Proc Natl Acad Sci* 87:1057-1060
228. SORENSEN KV, CHRISTENSEN SE, DUPONT E, HANSEN A P, PEDERSEN E, ORSKOV H 1983 Cerebrospinal fluid somatostatin inversly correlated with disease activity in multiple sclerosis. *Lancet* I:988 (6,7)
229. SORENSEN KV, CRISTENSEN SE, DUPONT E, HANSEN AP, PEDERSEN E, ORSKOV H 1980 Low somatostatin content in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 61:186-191
230. SRIRAM S, SCHWARTZ G and STEIMAN L 1983 Administration of myelin basic protein-coupled spleen cells prevents experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* 75:378-382

231. SRIRAM S, SOLOMON D, ROUSE RU and STEINMAN 1982 Identification of T cell subsets and B lymphocytes in mouse brain experimental allergic encephalitis lesions. *J Immunol* 129:1649
232. STANICZ AM, BEFUS D, BIENENSTOCK J 1986 Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer-patches, mesenteric lymph nodes and spleen. *J Immunol* 136:152
233. STANISZ AM, SCICCHITANO R, PAYAN DG, BIENENSTOCK J 1986 In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin. *Ann N Y Acad Sci* 496:217-226
234. STEAD RH, TOMIOKA M, QUINONEZ G, SIMON GT, FELTEN SY and BIENENSTOCK J 1987 Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2975-2979
235. STEAD RH, BIENENSTOCK J, STANISZ AM 1987 Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunol. Rev.* 100:333-358
236. STEINMAN L and Mc DEVIT HO 1989 T cell receptors in murine autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol* 7:731
237. STERNBERG EM, HILL JM, CHROUSOS GP, KAMILARIS T, LISTWAK SJ, GOLD PW and WILDER RL 1989 Inflammatory mediator-induced hypothalamic pituitary adrenal axis activation is defective in streptococcal cell-wall induced arthritis susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7/:2374-2378
238. STERNBERG EM, SCOUT-YOUNG III W, BERNARDI R, CALOGERO AE, CHROUSOS GP, GOLD PW and WILDER RL 1989 A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4771-4775
239. STREILEN JW 1987 Immune regulation and the eye: A dangerous compromise. *FASEB J* 1:199-208
240. STRIGÅRD K, HOLMDAHL R, van der MEIDE P, KLARESKOG L, and OLSSON T 1989 In vivo treatment of rats with monoclonal antibodies against gamma interferon: effect of experimental allergic neuritis. *Acta Neurological Scandinavica*, 80:201-207
241. SUCKLING AJ, WILSON NR, KIRBY JA & RUMSBY MG 1983 Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: cerebrospinal

fluid citology and comparison with meningeal and spinal cord pathology. *Neuropathol. appl Neurobiol* 9:237

242. SUN D 1991 Glial cells show enhanced interferon- $\gamma$ -induced I a antigen expression after a previous exposure to interferon- $\gamma$ . *J Neurimmunol* 34:205

243. SUN D and WEKERLE H 1986 I a restricted encephalitogenic T lymphocytes mediating EAE lyse autoantigen-presenting astrocytes (Lond.) 320:70

244. SUN D, LE J and COLECLOUGH C 1993 Diverse TcR $\beta$ -chain usage of encephalitogenic cells react to residues 68 to 88 of myelin basic protein in Lewis rat. *Eur J Immunol* 23:494

245. SUN D, LE J, YANG S, MALOTKEY M and COLECLOUGH C 1993 Major role of antigen-presenting cells in the response of rat encephalitogenic T cells to myelin basic proteins 151:111-118

246. SUZUKI K 1965 The pattern of mammalian brain gangliosides- II. Evaluation of the extraction procedures, postmortem changes and the effect of formalin preservation. *J Neurochem* 12:629.

247. SWANBORG RH 1975 Antigen-induced inhibition of experimental allergic encephalitis. III. Localisation of an inhibitory site distinct from the major encephalitogenic determinant of myelin basic protein. *J Immunol*:191-194

248. TABI Z, Mc COMBE PA and PENDER MP Apoptotic elimination of V8.2. cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced by the passive transfer of Vb8.2.+ encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 1994, 24:2609-2617

249. TAN LJ, KENNEDY MK and MILLER SD 1992 Regulation of the effector stages of the experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance induction. II Fine specificity of effector T cell inhibition - *J Immunol* 148:2748-2755

250. TAN LJ, KENNEDY MK, Dal CANTO MC, MILLER SD 1991 Successful treatment of paralytic relapses in adoptive experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance *J Immunol* 147:1797-1802

251. TEITELBAUM D, AHARONI R, ARNON R and SILA M 1988 Specific inhibition of the T cell response to myelin basic protein by syntetic copolymer Cop1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9724-9728

252. TERRY LC, RORSTAD OP, MARTIN JB 1980 The effect of hypophysectomy on somatostatin-like immunoreactivity in discrete hypothalamic and extrahypothalamic nuclei. *Endocrinology* 107:1771-1775

253. TERRY LC, RORSTAD OP, MARTIN JB 1980 The release of biologically and immunologically reactive somatostatin from perfused hypothalamic fragments. *Endocrinology* 107:794-800

254. THOMPSON HSG and STUINES NA 1986 Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* 64:581-586

255. TODD JA, ACHA-ORBEA H, BELL JI, CHAO N, FRONEK Z, JACOB CO, Mc DERMOT M, SINHA AA, TIMMERMAN L, STEIMAN L, and Mc DEVIT HO 1988. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240:1003-1006

256. TONSCH U and BAUER HC 1991 Glial cells and neurons induce blood brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res* 539:247

257. TRAUGOTT U, Mc FARLIN DE and RAINE CS 1986 Immunopathology of the lesion in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Cell Immunology*, 99:395-410

258. TRAUMU G., BEAVILLAN CJ., CROIX D., LEONARDELLI J 1981 Comparative immunocytochemical localisation of enkefalin and somatostatin in the median eminence hypothalamus and adjacent areas of guinea pig-brain. *Brain Res* 215:235-255

259. TROTTER J, SRIRAM S, RASSENTI L, JEN CHOU C-H, FRITZ RB and STEINMAN L 1985 Characterisation of T cells and myelin basic protein. *J Immunol* 134:2322

260. TROUGOTT U 1987 Multiple sclerosis relevance of class I and class II MHC expressing to lesion development. *J Neuroimmunol* 16:283

261. Van der VEEN R, KAPP JA and TROTTER JL 1993 Fine-specificity differences in the recognition of an encephalitogenic peptide by T helper 1 and 2 cells. *Journal of Neuroimmunology*, 48:221-226

262. VASKO MR, HARRIS V 1990 Gama-aminobutyric acid inhibits potassium-stimulate release of somatostatin from spinal cord slices. *Brain Research* 507:129-137

263. VASS K and LASSMANN H 1990 Intratecal application of interferon gamma: progressive appearance of MHC antigen within the rat nervous system. *Am J Pathol* 137:789
264. VELASCO S, TARLOW M, OLSEN K, SHAY JW, McCracken GH Jr. and NISSEN PD 1991 Temperature-dependent modulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha expression in cultured human astroglial cells by dexamethasone and indomethacin. *J Clin Invest* 87:1674-1680
265. VIDOVIĆ M, SPARACIO SM, ELOVITZ M and BENVENISTE 1990 Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 30:189
266. VOORTHUIS JAC, UITDENHAAG BMJ, de GROOT CJA, COEDE HP, van der Meide PH and DIJKSTRA CD 1990 Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clinical and experimental Immunology*, 81:183-188
267. WAHL SM, ALLEN JB, McCARTNEY-FRANCIS N, MORGANTI-MERGENHAGEN SE and ORENSTEIN JM 1991 Macrophage - and astrocyte-derived transforming growth factor-beta as a mediator of central nervous system dysfunction in acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med* 173:981-991
268. WEIGENT DA, WEAR WE, BOST KL and BLALOCK JE 1987 Leukocyte production of growth hormone. *Federation Proc* 46,(926) (abstr.)
269. WEINSTOCK JV and BLUM AM 1990 Detection of vasoactive intestinal peptide and localisation of its mRNA within granulomas of murine schistosomiasis. *Cell Immunol* 125:146-154
270. WEKERLE H and SUN D 1987 Immune reactivity in the nervous system: modulation of T lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132:43
271. WEKERLE H, ENGELHARDT B, RISAU W and MEYERMANN R 1991 Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro. *Brain Pathology* 1:107-114
272. WEKERLE HC, LININGTON C, LASSMAN H and MEYERMANN 1986 Cellular immune reactivity within CNS. *Trends in Neurosciences* 9:271-277

273. WICK G, HU Y, SCHWARTZ S and KROEMER G  
Immunoendocrine communications via the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis in autoimmune diseases. *Endocrine Reviews* vol 14(5) 539-563

274. WOODROOFE MN, BELLAMY AS, FELDMAN M, DAVIDSON AN & CUZNER ML 1986 Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 74:135

275. YAMADA Y, REISINE T, LAW S, IHARA Y, KUBOTA A, KAGIMTO S, SEINO M, BELL GI and SEINO S 1992 Somatostatin receptors, and expanding gene family: cloning and functional characterisation of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Molec Endocr* 6:2136-2142

276. YEDNOCK TA, CANNON C, FRITZ LC, SANCHEZ-MADRID F, STEINMAN L and KARIN N 1992 Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *Nature (Lond.)* 356:63

277. YEE KT, SMETANKA AM, LUND D and RAO K 1990 Differential expression of class I and class II major histocompatibility complex antigen in early postnatal rats. *Brain Res* 530:121-125

278. ZAMVILL SS and L STEINMAN 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8:579.

279. ZAMVILL SS, MITCHELL AC, MOORE K, KITAMURA K, STEINMAN L, and ROTHBARD JB 1986 T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature (Lond.)* 324:258

280. ZAMVILL SS, MITCHELL DJ, LEE NJ, MOORE AC, WALDER MK, SAKAI K, ROTHBARD JB, Mc DEVIT HO, STEINMAN L and ACHA-ORBEA H 1988 Predominant expression of a T cell receptor VB gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 167:1586

281. ZANG ZJ, LEE CSY, LIDER O and WEINER HL 1990 Suppression of adjuvant arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *J Immunol* 145:2489-2493

282. ZIEGLER-HEITBROCK HW, KAFFERLEIN E, HASS J G, MEYER N, STROBEL M, WEBER C AND FLIEGER D 1992 Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J Immunol* 148:1753

283. ZUBIAGA AM, MUNOZ E, HUBER BT 1992 IL-4 and IL-2 selectively rescue Th subsets from glucocorticoid induced apoptosis. J Immunol 149:107-112