

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Iva D. Božić

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

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Iva D. Božić

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

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:**

### **Mentori:**

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

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

### **Članovi komisije:**

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

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

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

Datum odbrane: \_\_\_\_\_2016. godine

## ZAHVALNICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **REZIME**

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

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

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

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

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

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

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurobiologija

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

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

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

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

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Neurobiology

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



## SKRAĆENICE

• $O_2^-$  - super-oksid anjon

**AB** - Alchajmerova bolest

**ALS** - amiotrofična lateralna skleroza

**AP-1** – protein aktivator

**ARG1** - arginaza 1

**ATF2** - aktivacioni transkripcioni factor 2

**ATP** - adenozin trifosfat

**A $\beta$**  - amiloid- $\beta$

**CAT** – katalaza

**CNS** - centralni nervni sistem

**CO** - ugljen-monoksid

**COX** – ciklooksigenaza

**Cu,ZnSOD** - bakar cink superoksid dizmutaza

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

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

**EAE** - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

**eNOS** - endotelska azot-monoksid sintaza

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

**GAPDH** - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

**gp130** - glikoprotein 130

**GPx** - glutation peroksidaza

**GR** - glutation reduktaza

**GSH** – redukovani glutation

**GSSG** – glutation disulfid

**HIV** - humani virus imunodeficijencije

**HO-1** - hem oksigenaza-1

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

**IFN- $\gamma$**  - interferon gama

**IKK** - kinazni kompleks inhibitorne subjedinice  $\kappa$ B

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

**PFA** - paraformaldehid

**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandin E<sub>2</sub>

**PI3K** - fosfatidilinozitol 3-kinaza

**PIP<sub>3</sub>** - fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat

**PKB/Akt** - protein kinaza B

**PRR** (*engl.* pattern recognition receptors) - receptori molekulskih motiva

**RNS** (*engl.* reactive nitrogen species) – reaktivne azotne vrste

**ROS** (*engl.* reactive oxygen species) - reaktivne kiseonične vrste

**sIL-6R** – solubilna forma receptora za interleukin-6

**SOD** - superoksid dismutaza

**STAT** (*engl.* signal transducer and activator of transcription proteins) - proteini prenosnici signala i aktivatori transkripcionih proteina

**TGF-β** (*engl.* transforming growth factor-β) - faktor transformacije rasta beta

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

**TNFR** – receptor faktora nekroze tumora-α

**TNF-α** - faktor nekroze tumora-α

**TPM** - traumatska povreda mozga

# Sadržaj

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

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

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

# **I UVOD**

## 1. Neuroinflamacija

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3. Aktivacija mikroglije**

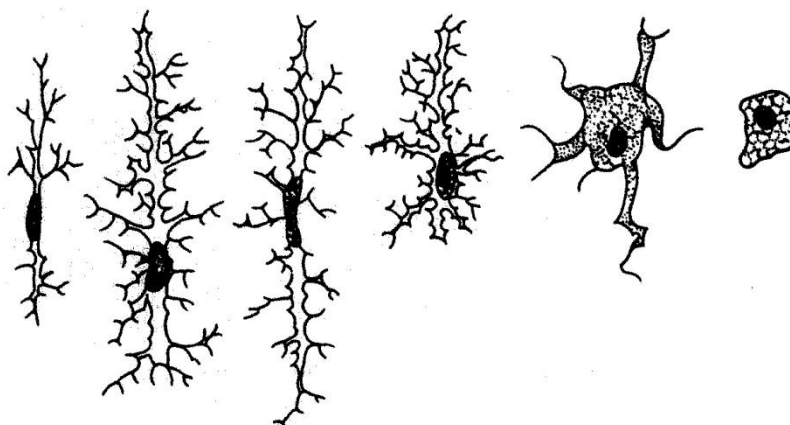
Zahvaljujući dugačkim nastavcima koji su u stalnom pokretu i brojnim receptorima na ćelijskoj membrani, mikroglija može da registruje i najmanje promene u homeostazi CNS-a, odgovarajući na širok opseg strukturno različitih molekula. Aktivaciju mikroglije može da izazove prisustvo faktora koji se normalno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

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

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

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

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



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

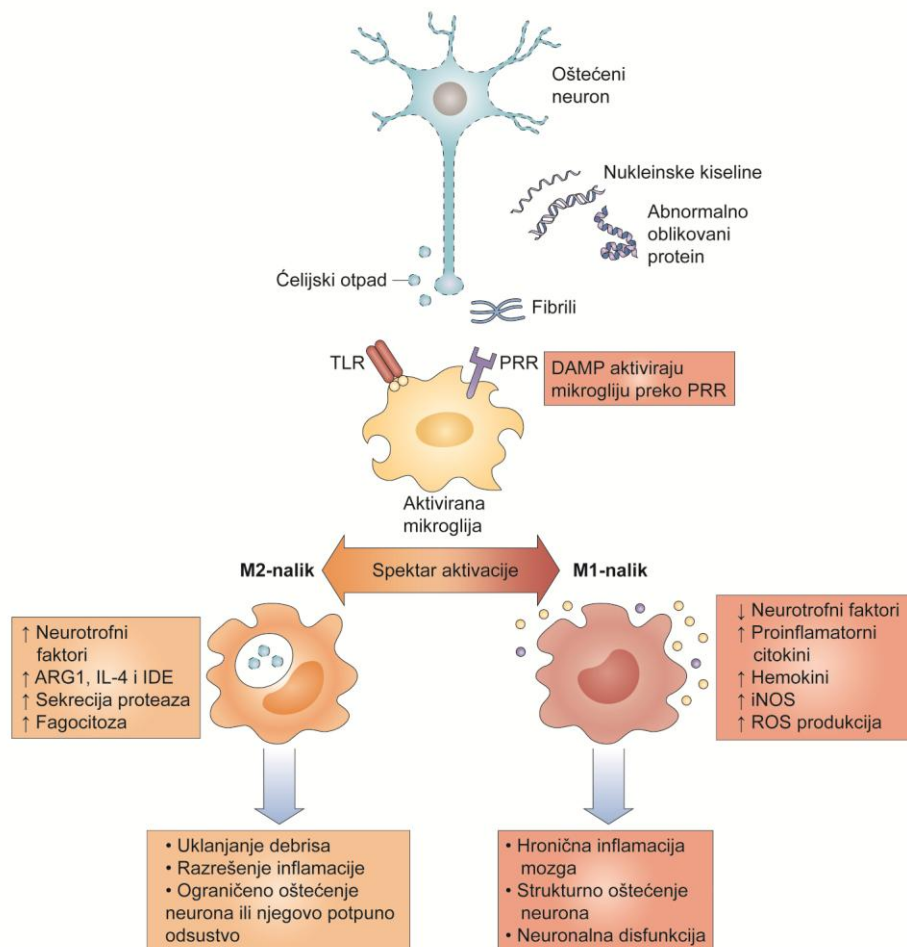
Poznato je da aktivirani makrofagi pokazuju dva fenotipa sa različitim ulogama u inflamatornom odgovoru. U klasičan odgovor makrofaga uključeni su citokini povezani sa odgovorom  $T_H1$  ćelija, kao što su interferon gama ( $IFN-\gamma$ ) i faktor nekroze tumora alfa ( $TNF-\alpha$ ), kao i drugi proinflammatory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

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

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

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

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

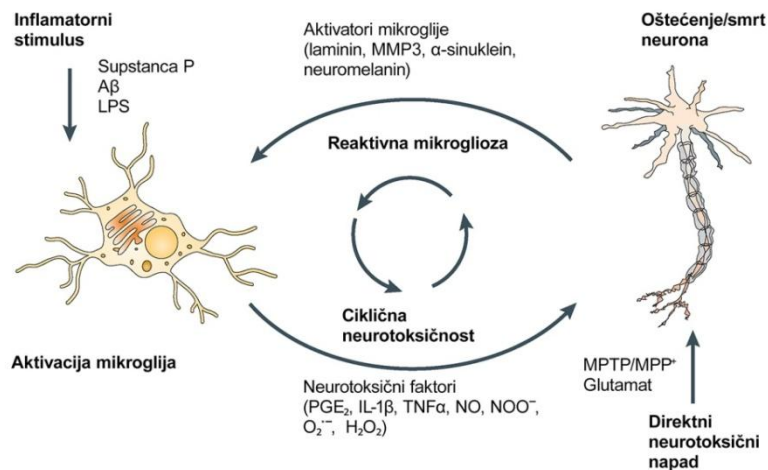


**Slika 2. Aktivacija mikroglije.** Različiti inflamatorni signalni molekuli se vezuju za receptore na mikrogliji (TLR, PRR) i dovode do aktivacije mikroglije. U zavisnosti od prirode i jačine stimulusa, mikroglija se transformiše u fenotip nalik na M1 ili M2. „M2-nalik“ fenotip se odlikuje povećanom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

#### **4. Uloga mikroglije u neurodegeneraciji**

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





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

#### 4.1. Citokini

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.1.2. Interleukin-6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 4.3. Ciklooksigenaza 2

COX je enzim koji katalizuje konverziju arahidonske kiseline u prostanoide, familiju lipidnih metabolita koja uključuje prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Prostaglandini imaju važnu ulogu u inflamatornoj kaskadi i regulaciji citokina. Kada se oslobode u velikim koncentracijama doprinose razvoju moždanog edema, citotoksičnosti i oštećenju neurona. Jedan od glavnih prostaglandina koga proizvode mikroglijske ćelije je prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) koji stimuliše produkciju IL-6 u astrocitima. Osim prostaglandina, tokom aktivacije COX-a dolazi i do formiranja slobodnih radikala koji dalje pogoršavaju inflamaciju (Farooqui i sar., 2007).

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



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

#### 4.4. Oksidativni stres

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

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

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

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

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

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

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

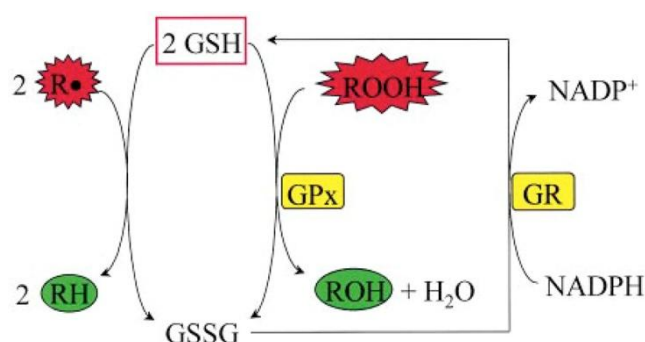
S obzirom na to da neutrališu  $\bullet\text{O}_2^-$ , porodica SOD enzima predstavlja prvu liniju odbrane ćelija protiv oksidativnog stresa. Različite izoforme ovog enzima su raspoređene u različitim odeljcima u ćeliji: SOD1 (Cu,ZnSOD) nalazi se u citoplazmi, SOD2 (MnSOD) u mitohondrijama, dok je SOD3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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

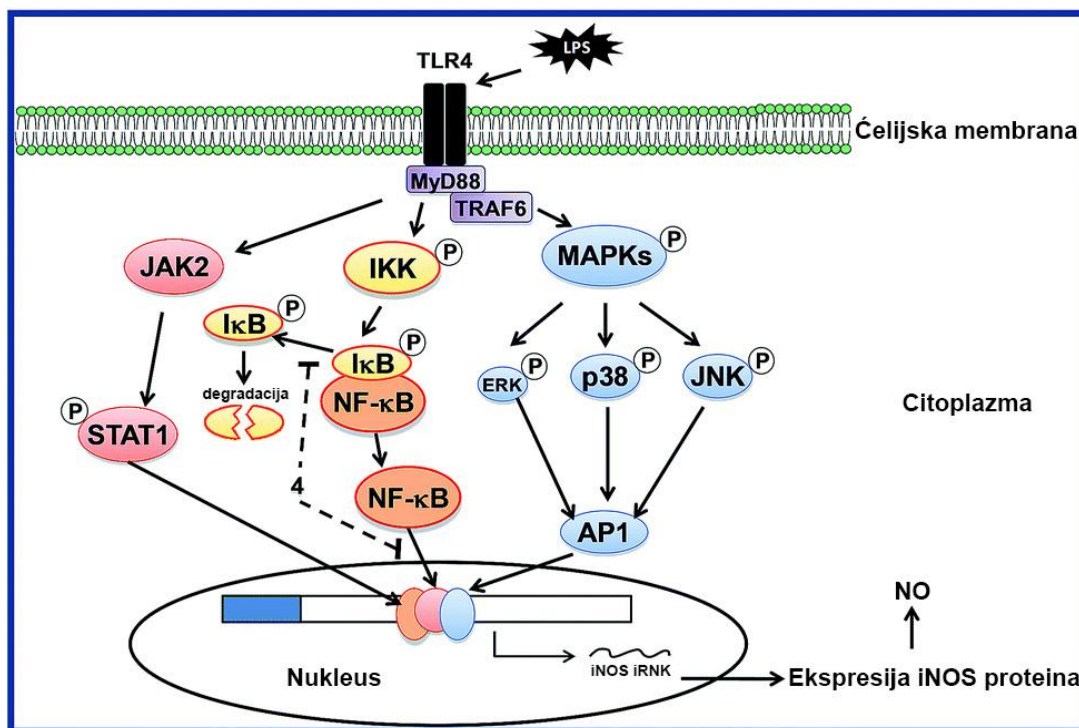
inflamatornih medijatora u glijskim ćelijama, prevashodno u mikrogliji. Značaj NF- $\kappa$ B aktivacije pokazan je u ishemiji (Schneider i sar., 1999), traumatskoj povredi mozga (Sullivan i sar., 1999), AB (Lukiw i sar., 1998), PB (Hunot i sar., 1997), MS (Bonetti i sar., 1999) i drugim patologijama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

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

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

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

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



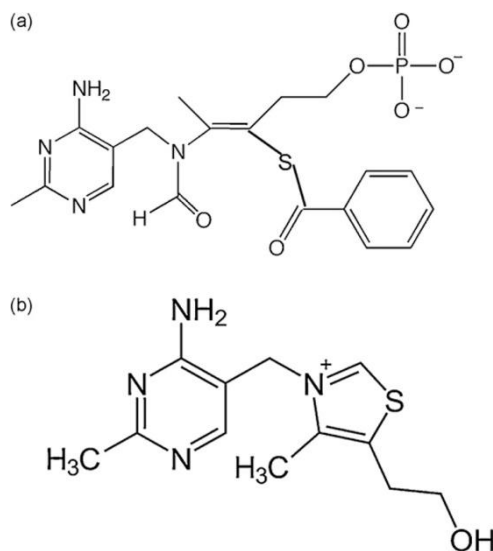
Slika 5. Signalni putevi aktivirani u mikrogliji posle stimulacije LPS-om. Pojedini učesnici u signalizaciji nisu predstavljani zbog jednostavnosti. Preuzeto iz Hegazy i sar., 2015.

## 7. Terapijski potencijal benfotiamina

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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



## **II CILJEVI**

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

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

# **III MATERIJA I METODE**

## 1. Materijal

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

**Tabela 1. Rastvori i puferi**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



**Tabela 7. Lista korišćenih prajmera**

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

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

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

## 2. Metode

### 2.1. Kultura mikrogljijskih ćelija

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

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

#### 2.1.1. Tripsinizacija i određivanje broja ćelija

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

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

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

### 2.1.2. Sejanje ćelija i tretmani

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

U zavisnosti od tretmana uspostavljene su sledeće grupe:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2.5. Protočna citofluorimetrija

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

### 2.5.1. Analiza ćelijske smrti

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2.7. Imunocitohemijsko obeležavanje**

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

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



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

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

## **2.8. Određivanje koncentracije nitrita**

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

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

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

## **2.9. Izolacija RNK**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2.12. Enzimski imunološki esej

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

### 2.18.3. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

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

### 2.18.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

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

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

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

### **2.18.6. Analiza aktivnosti glutacion peroksidaze**

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

### **2.18.7. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze**

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

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

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

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

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

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

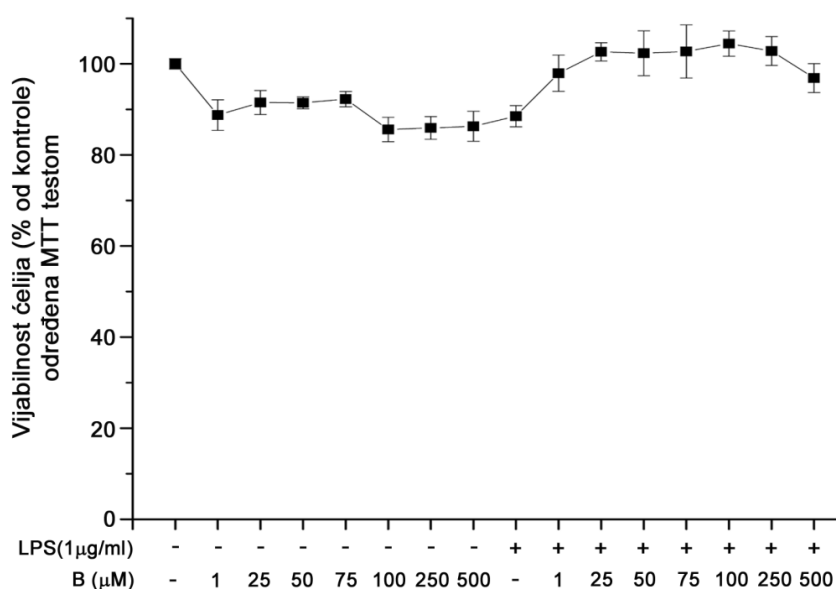
## **IV REZULTATI**

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

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

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

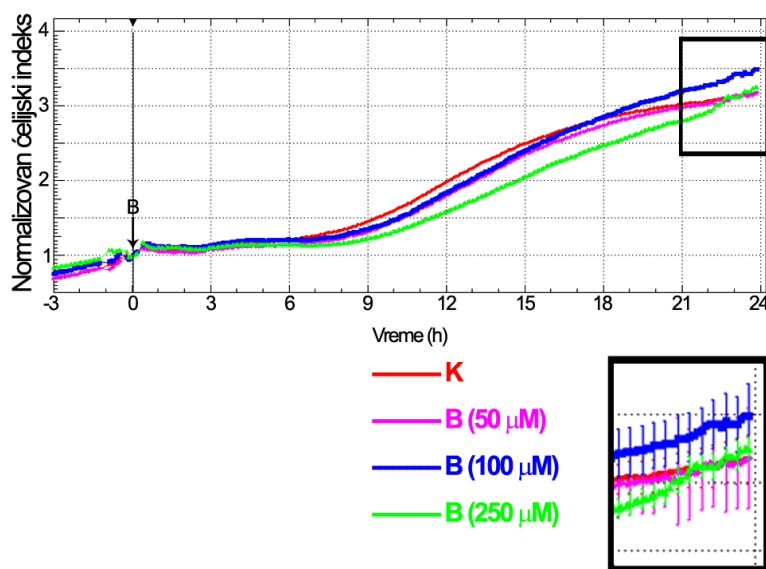
Uticaj benfotiamina na vijabilnost BV-2 ćelija ispitan je u opsegu koncentracija od 1 do 500  $\mu\text{M}$ . Vijabilnost je određena u BV-2 ćelijama tretiranim benfotiaminom u trajanju od 24 h ili pretretiranim benfotiaminom i stimulisanim LPS-om tokom 24 h. Benfotiamin nije uticao na vijabilnost nestimulisanih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



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

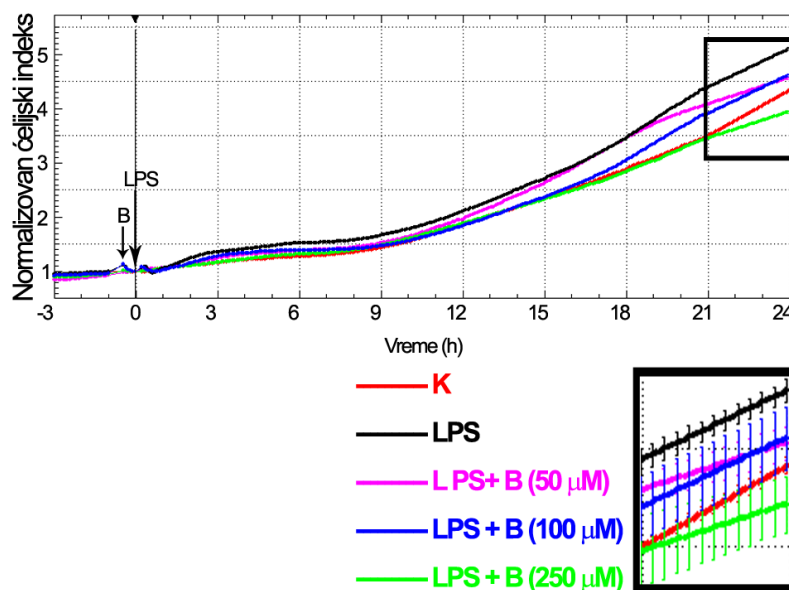
## 1.2. Benfotiamin menja morfologiju BV-2 mikroglijskih ćelija stimulisanih LPS-om

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



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

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



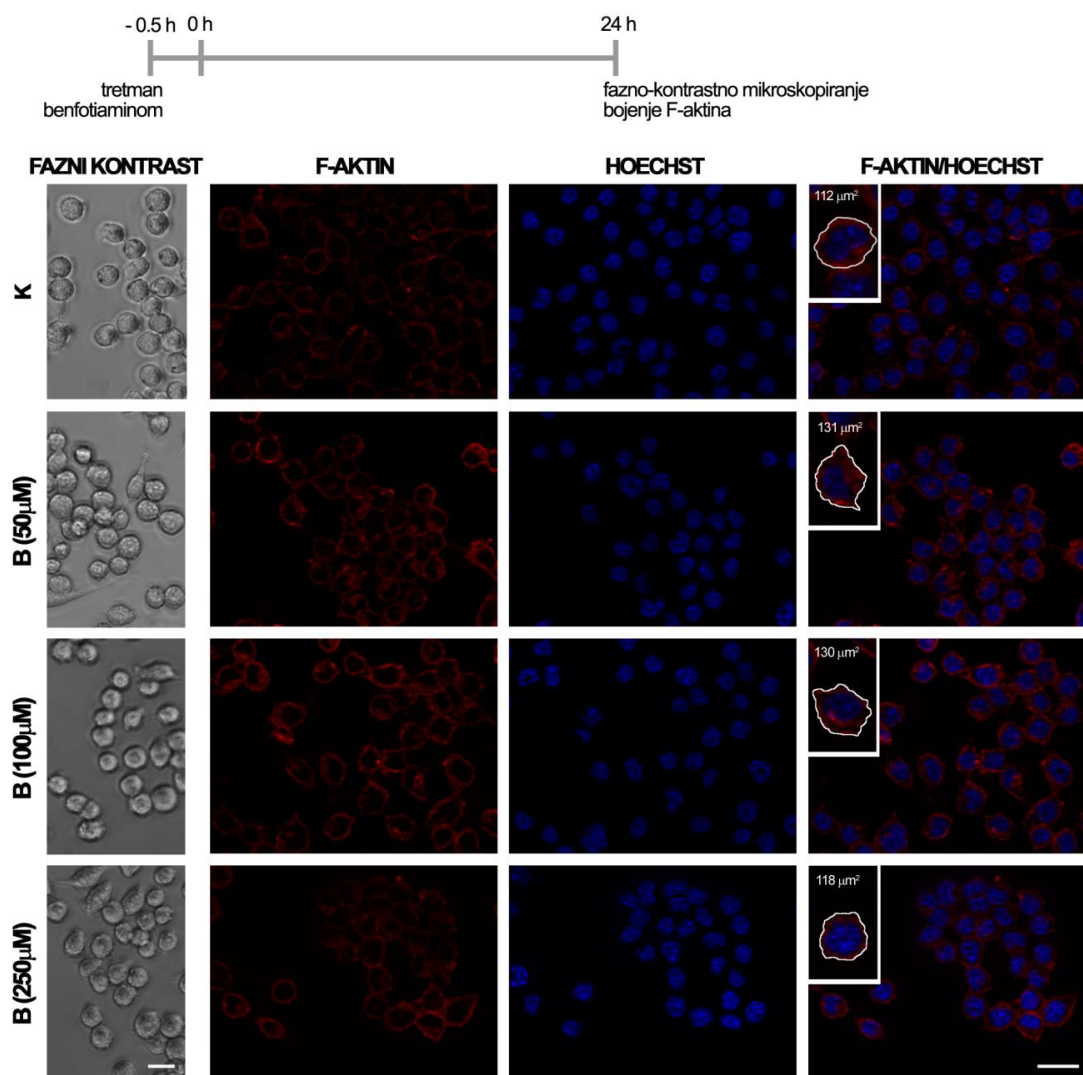
**Slika 9. Uticaj benfotiamina na status LPS-stimulisanih BV-2 ćelija u realnom vremenu.** Ćelijski indeks BV-2 ćelija je praćen RTCA aparatom. Na grafiku su prikazane normalizovane vrednosti ćelijskog indeksa u kontrolnoj grupi ćelija (K, crvena linija), grupi stimulisanoj LPS-om (LPS, crna linija)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

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

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

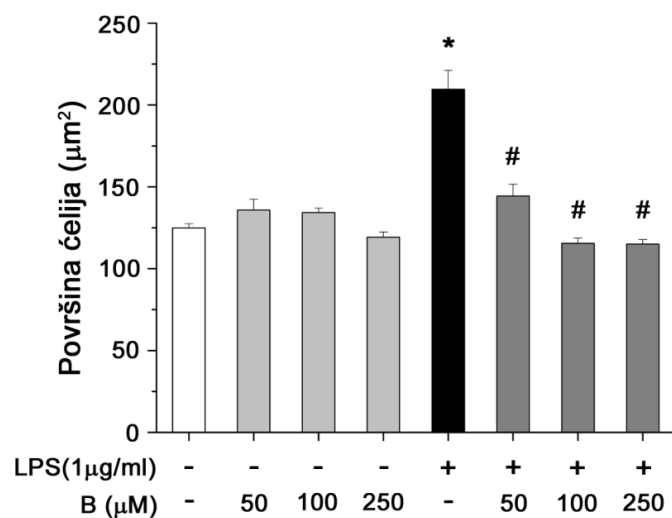


ćelija. Stoga je zaključeno da su zabeležene promene ćelijskog indeksa posledica promena morfologije BV-2 ćelija izazvanih reorganizacijom mikrofilamenata. S obzirom na to da promene morfologije prethode aktivaciji mikroglije ovi rezultati ukazuju da benfotiamin može imati potencijalnu antiinflamatornu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

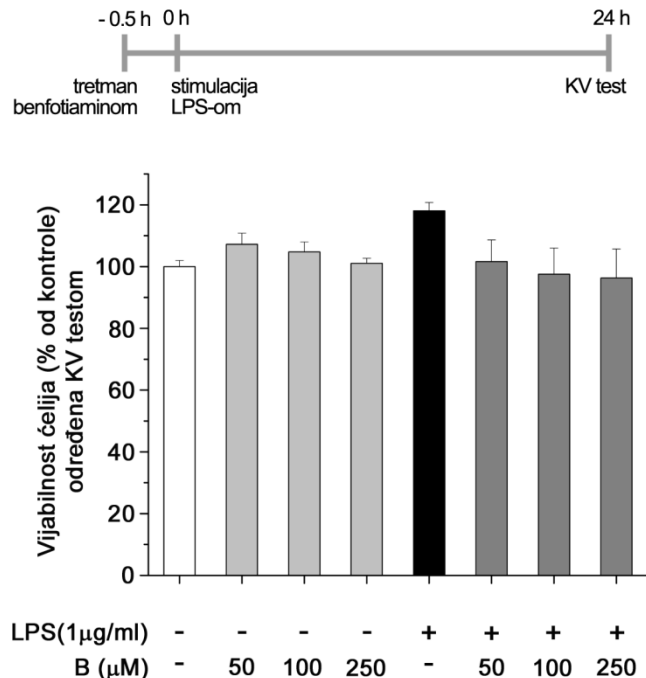


**Slika 10. Morfologija BV-2 ćelija tretiranih benfotiaminom.** BV-2 ćelije posmatrane su pod faznim kontrastom i bojene faloidinom (crveno) i Hoechst-om (plavo) u kontrolnim uslovima (K) i posle tretmana različitim koncentracijama benfotiamina (B; 50, 100 i 250 μM). Uveličani umetak na slikama pokazuje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





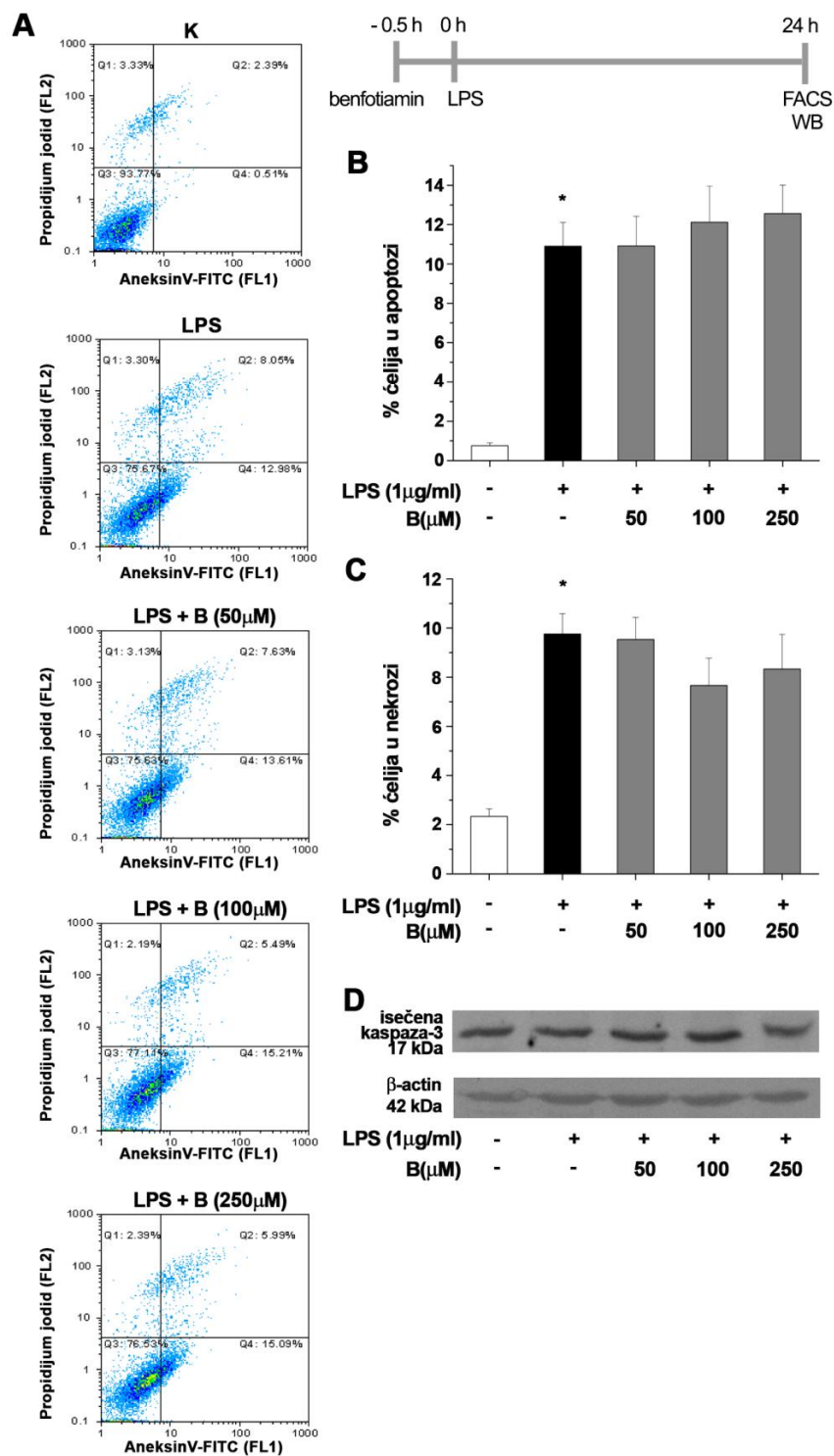
**Slika 12. Uticaj benfotiamina na veličinu BV-2 mikroglijskih ćelija stimuliranih LPS-om.** Površina BV-2 ćelija je određena posle bojenja faloidinom, analizom u AxioVisionRel 4.6 programu. Merenja su rađena u pet regiona (138 μm × 104 μm) svakog od tri stakalca po grupi, u tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost površine ćelija ± SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na grupu stimuliranu LPS-om.



**Slika 13. Uticaj tretmana benfotiaminom na vijabilnost BV-2 ćelija stimuliranih LPS-om.** BV-2 ćelije su tretirane benfotiaminom i stimulirane LPS-om i relativan broj živih ćelija je određen KV testom. Vijabilnost tretiranih ćelija je prikazana kao procenat broja živih ćelija u netretiranim kulturama, (100%). Stubići na grafiku predstavljaju srednje vrednosti tri nezavisno izvedena eksperimenta (± SE).

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

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



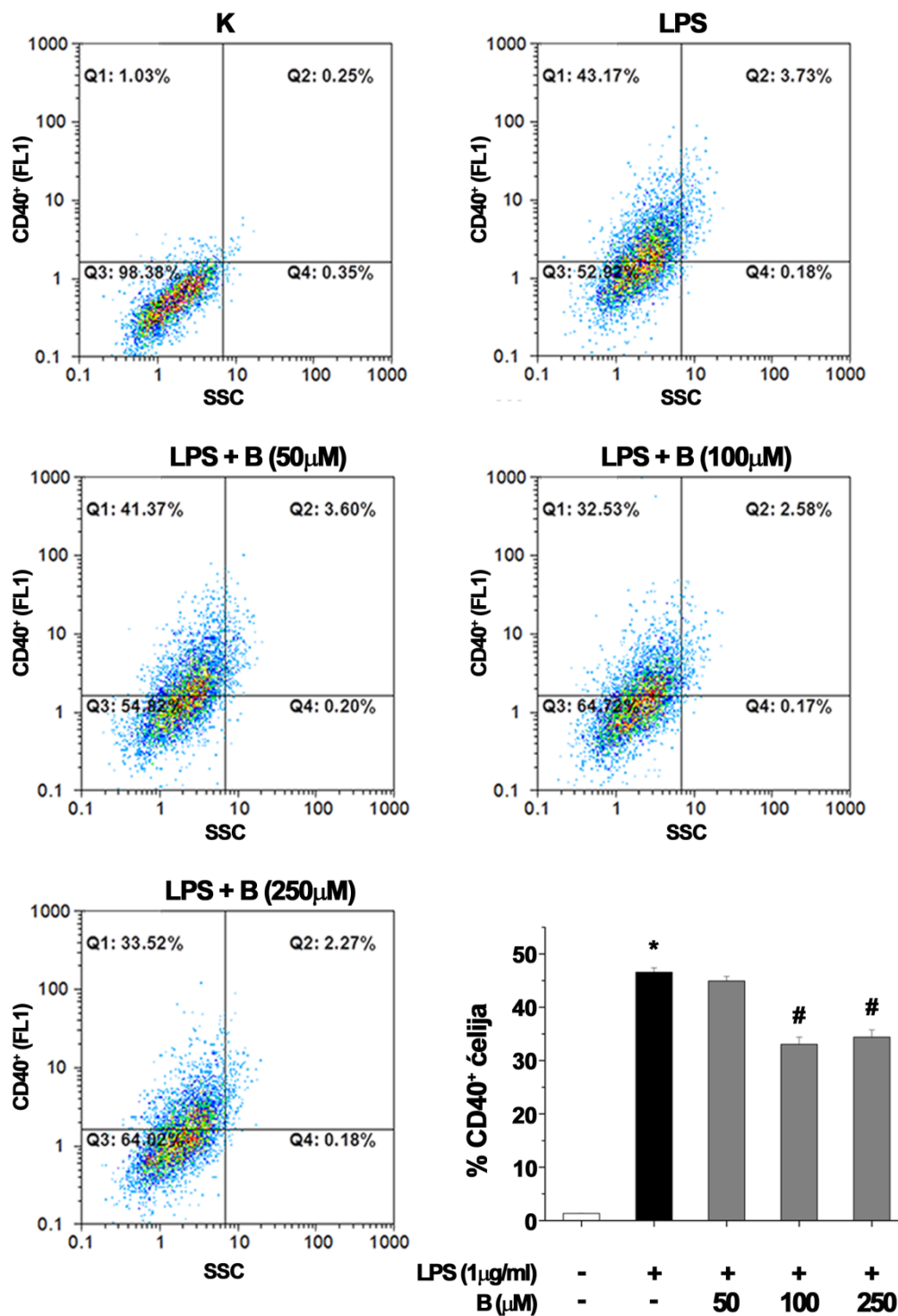
**Slika 14. Efekat pretretmana benfotiaminom na apoptozu i nekrozu u LPS-om stimulisanjoj kulturi BV-2 ćelija.** BV-2 ćelije su obojene aneksinom V i propidijum jodidom, a zatim analizirane protočnom citofluorimetrijom. Ćelije obeležene samo aneksinom V su analizirane kao apoptotične, dok su nekrotične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

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

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

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

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



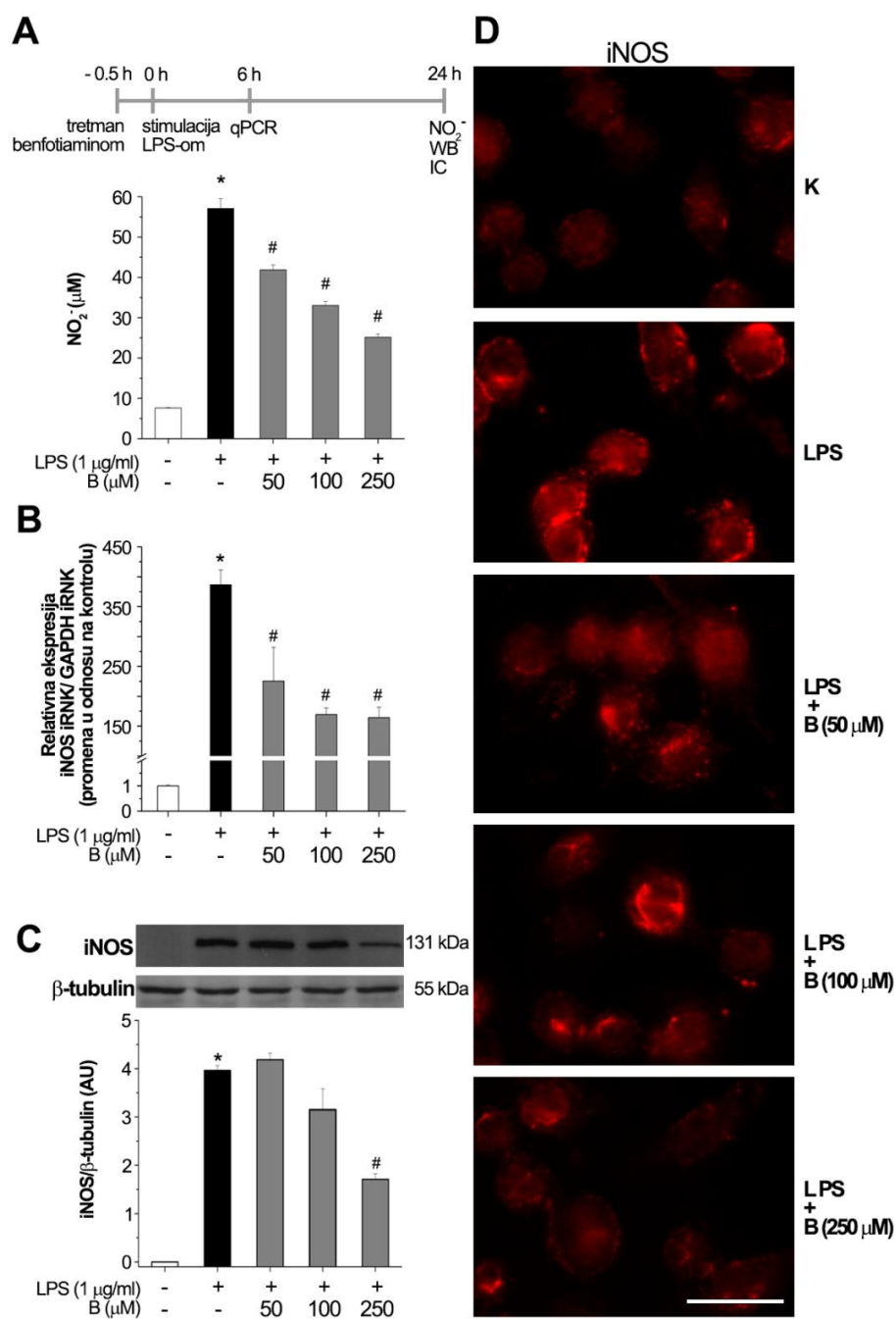
**Slika 15. Efekat benfotiamina na ekspresiju CD40 receptora kod LPS-om stimulisanih BV-2 ćelija.** Ekspresija CD40 analizirana je protočnom citofluorimetrijom u kontrolnoj grupi (K), grupi stimulisanoj LPS-om (LPS) i grupama pretretiranim različitim koncentracijama benfotiamina i potom stimulisanim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

## 2.2. Benfotiamin smanjuje produkciju NO

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

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

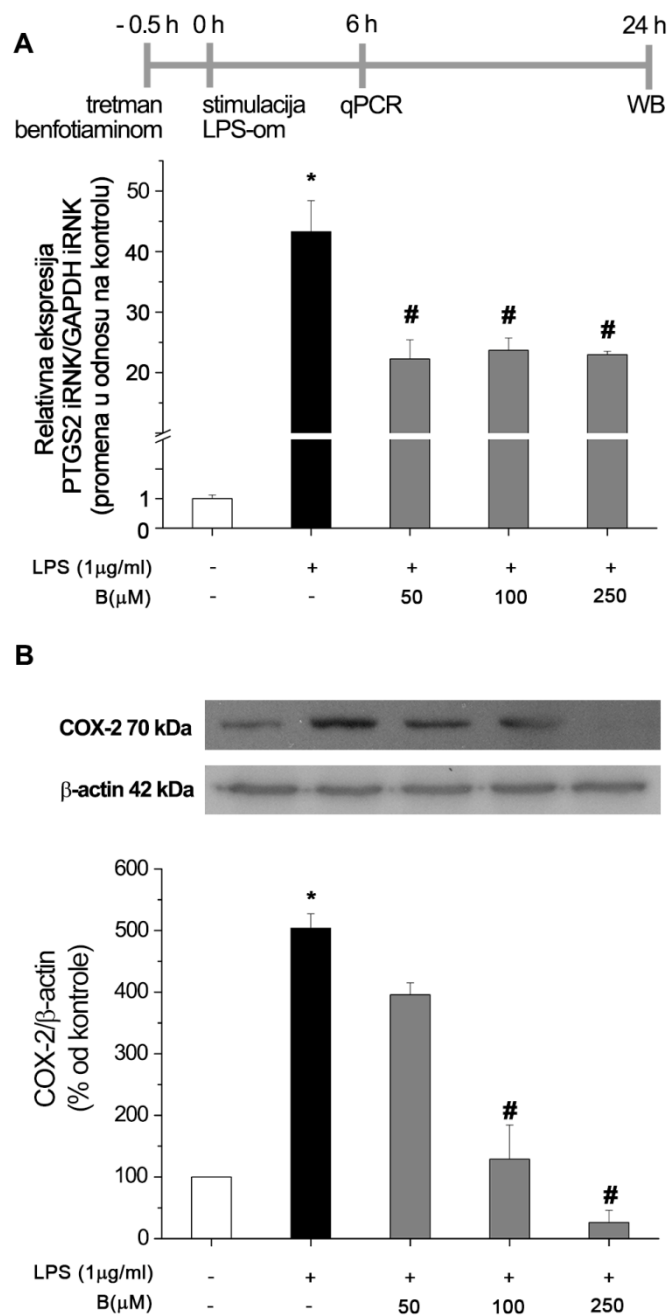




**Slika 16. Uticaj benfotiamina na produkciju NO i ekspresiju iNOS-a na genskom i proteinskom nivou kod LPS-om stimulisanih ćelija.** NO produkcija je određena modifikovanom Grisovom metodom (A). Ekspresija iNOS iRNK je određena qPCR metodom. Rezultati su analizirani pomoću  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode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

### 2.3. Benfotiamin inhibira ekspresiju COX-2

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

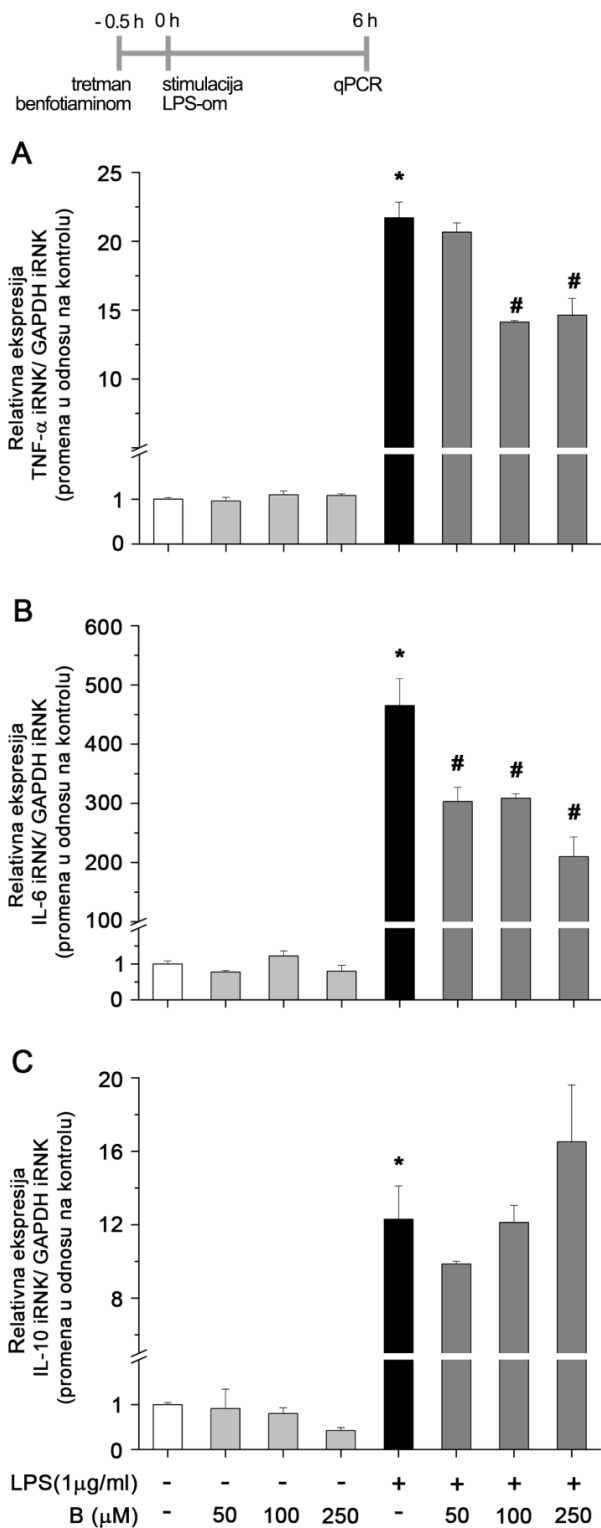


**Slika 17. Ekspresija *PTGS2* gena i *COX-2* proteina.** Ekspresija iRNA za *PTGS2* određena je qPCR metodom i analizirana pomoću  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metode. Nivo ekspresije *PTGS2* iRNA izražen je u odnosu na nivo *GAPDH* iRNA u istom uzorku. Nivo ekspresije u svakom uzorku normalizovan je u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

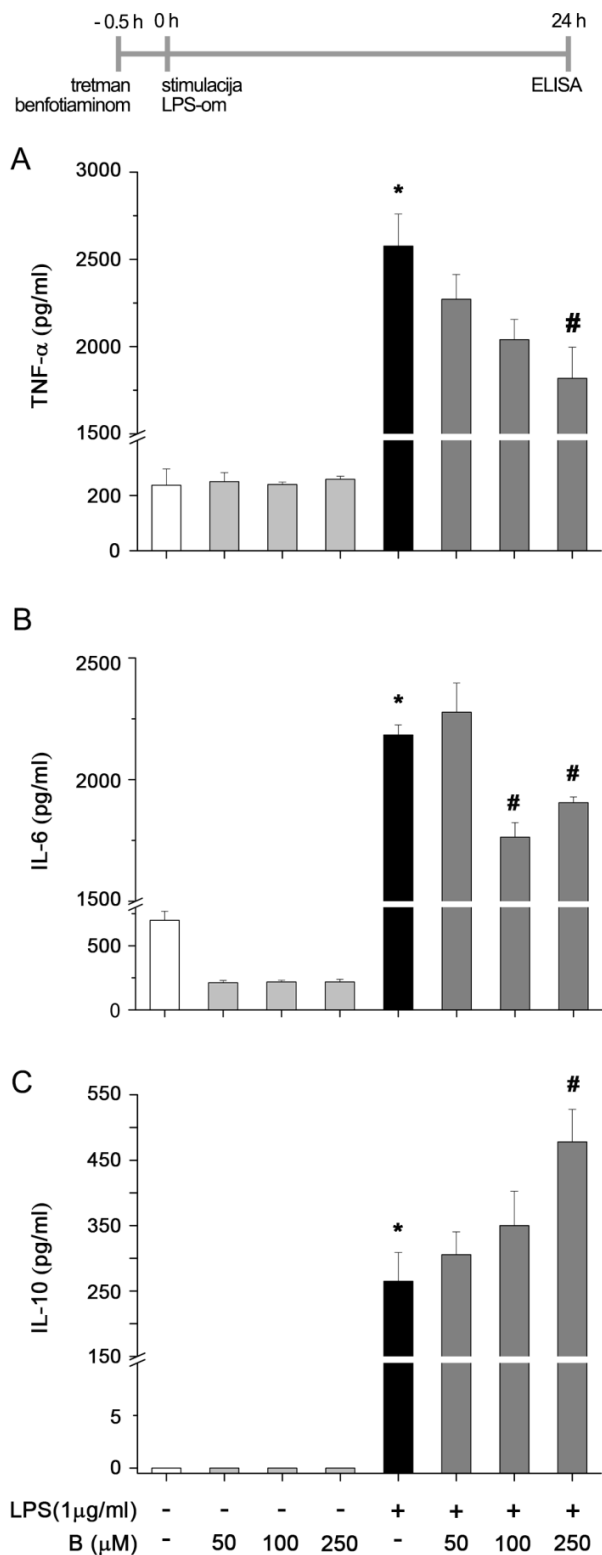
## 2.4. Benfotiamin moduliše sintezu i oslobađanje citokina

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

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



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



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

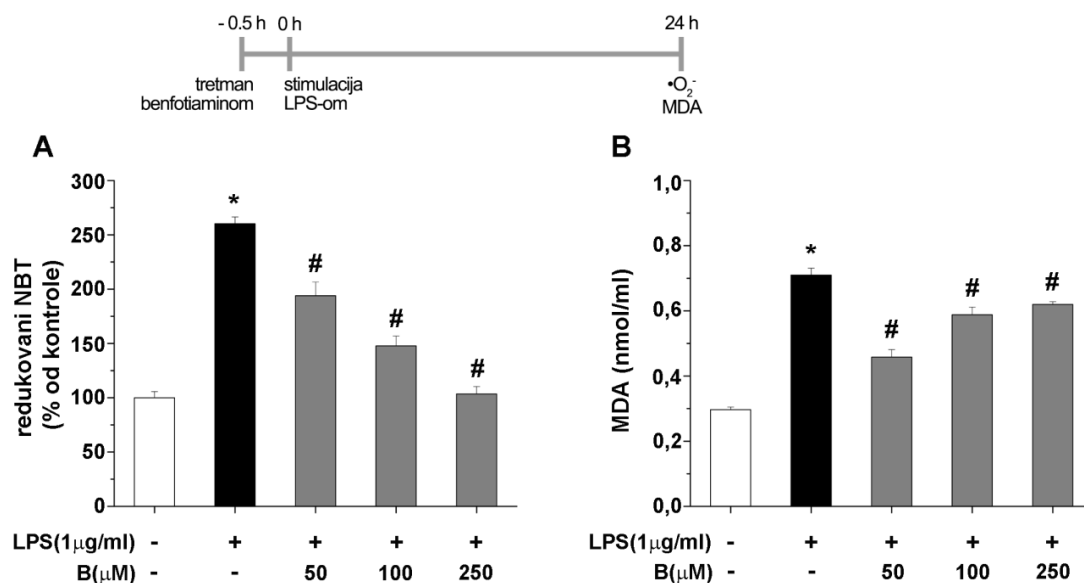
Kada se razmotre navedeni rezultati, može da se zaključi da benfotiamin ostvaruje antiinflamatorni uticaj u ćelijama stimulisanim LPS-om, smanjući sintezu i produkciju proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, dok istovremeno povećava produkciju antiinflamatornog citokina IL-10.

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

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

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

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



**Slika 20. Efekat benfotiamina na nivo  $\bullet\text{O}_2^-$  i MDA u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om.** (A) Koncentracija  $\bullet\text{O}_2^-$  određena je praćenjem NBT redukcije. Rezultati su izraženi kao procenat redukovano NBT u odnosu na kontrolu (100%). (B) Nivo MDA (nmol/ml) određen je pomoću tiobarbituratnog eseja. . Stubići predstavljaju srednje vrednosti iz tri različita eksperimenta  $\pm$  SE. Nivo statističke značajnosti između grupa: \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$  u odnosu na LPS grupu.

### 3.2. Benfotiamin moduliše ekspresiju enzima antioksidativne zaštite

U daljoj analizi antioksidativnih svojstava benfotiamina ispitivan je njegov uticaj na gensku ekspresiju enzima neophodnih u odbrani protiv oksidativnog stresa, MnSOD, CAT i GPx. MnSOD učestvuje u prvoj liniji antioksidativne odbrane i uklanja  $\bullet\text{O}_2^-$ , pri čemu nastaje  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji se dalje detoksifikuje u vodu pod dejstvom CAT i GPx. Transkripti za ove enzime praćeni su qPCR metodom, 4 h posle stimulacije LPS-om.

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



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

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

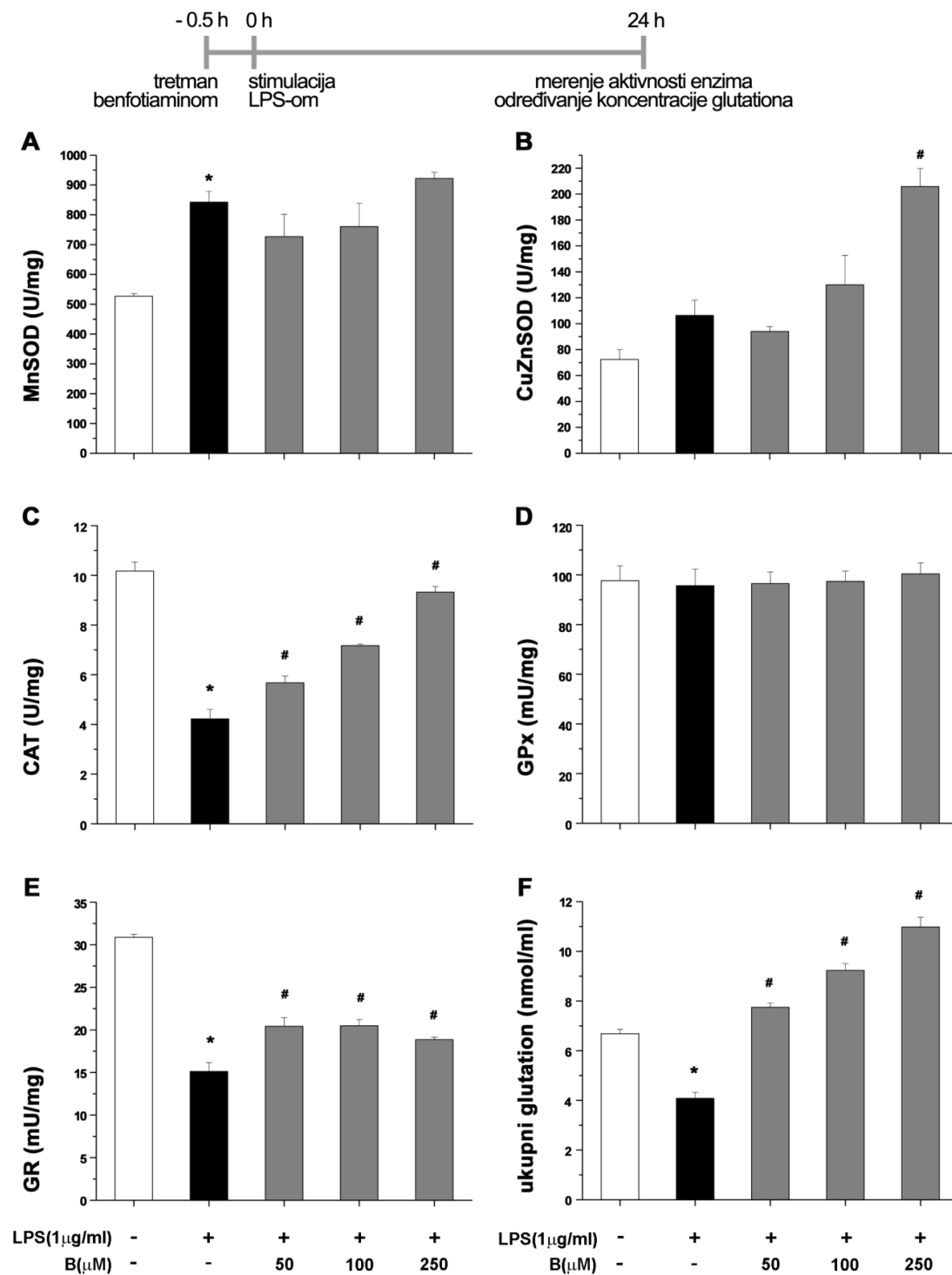




### **3.3. Benfotiamin povećava aktivnost antioksidativnih enzima i sadržaj glutationa**

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

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

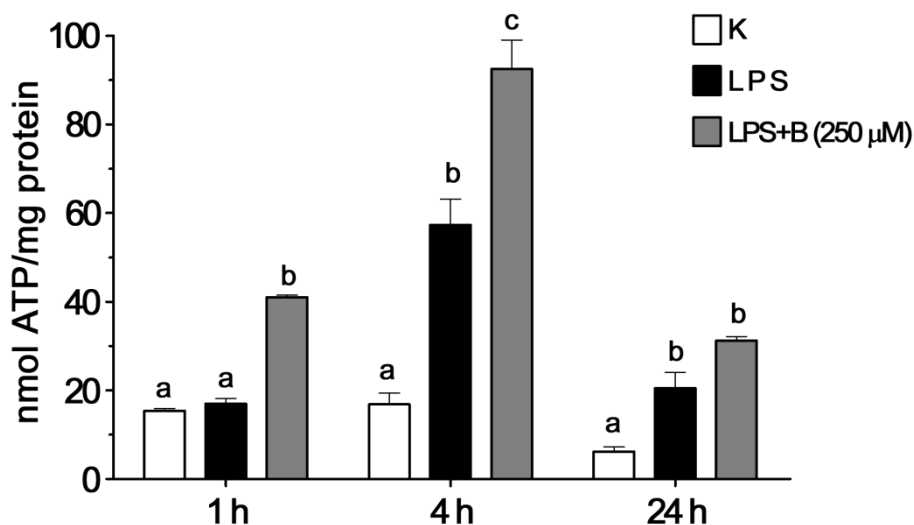


**Slika 23. Efekat benfotiamina na aktivnost antioksidativnih enzima i sadržaj ukupnog glutaciona u BV-2 ćelijama stimulisanim LPS-om.** Aktivnosti MnSOD (A), Cu,ZnSOD (B), CAT (C), GPx (D), GR (E) određene su u BV-2 ćelijama, a rezultati su izraženi u specifičnim jedinicama aktivnosti enzima (U/mg proteina).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

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

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

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



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

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

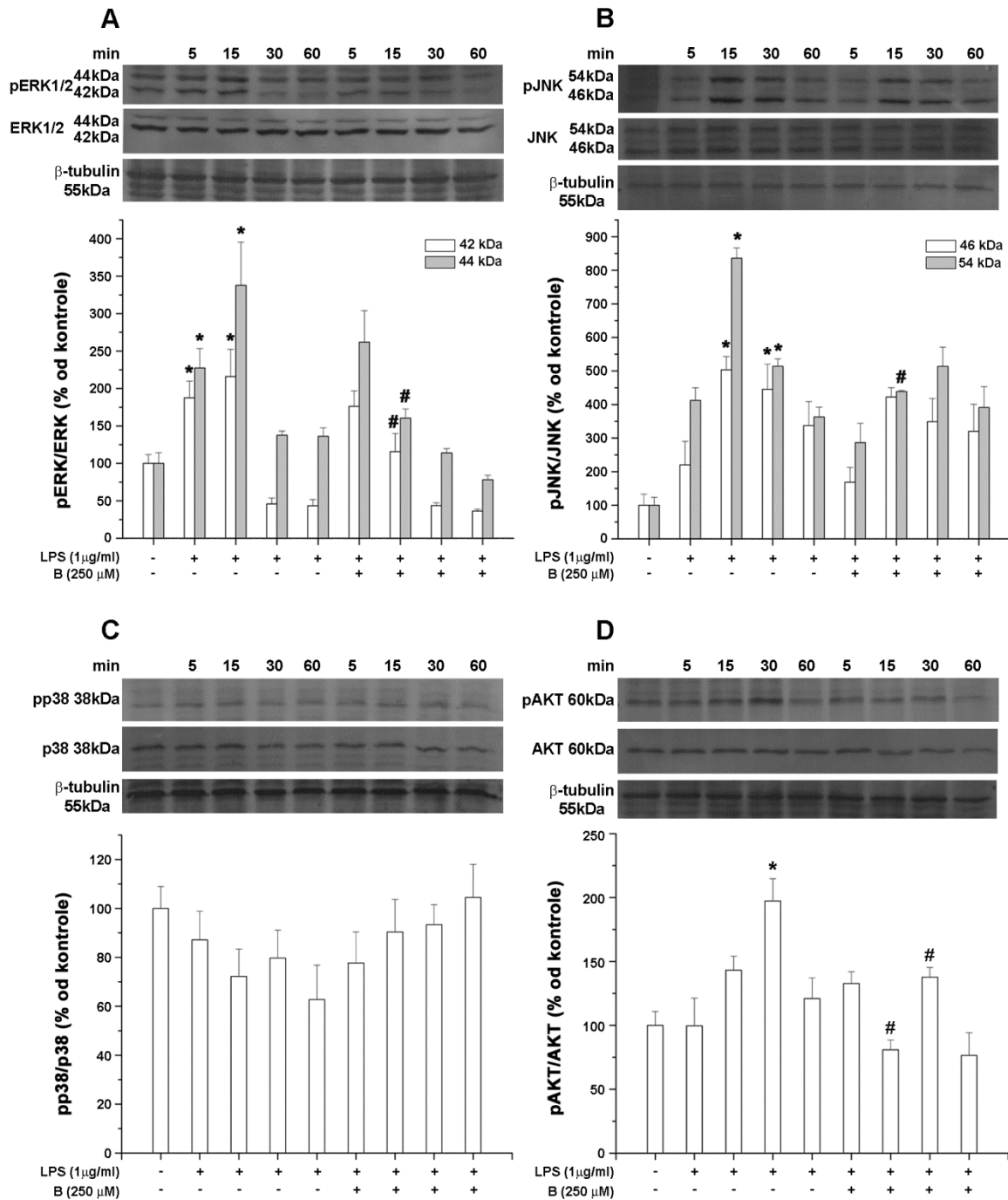
Naredni eksperimenti imali su za cilj ispitivanje signalnih puteva u ispoljavanju antiinflamatornog i antioksidativnog efekta benfotiamina. Analiziran je uticaj benfotiamina na fosforilaciju MAPK i Akt kinaze, budući da je poznato da se ove signalne kaskade aktiviraju u mikroglijskim ćelijama u odgovoru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

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

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

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





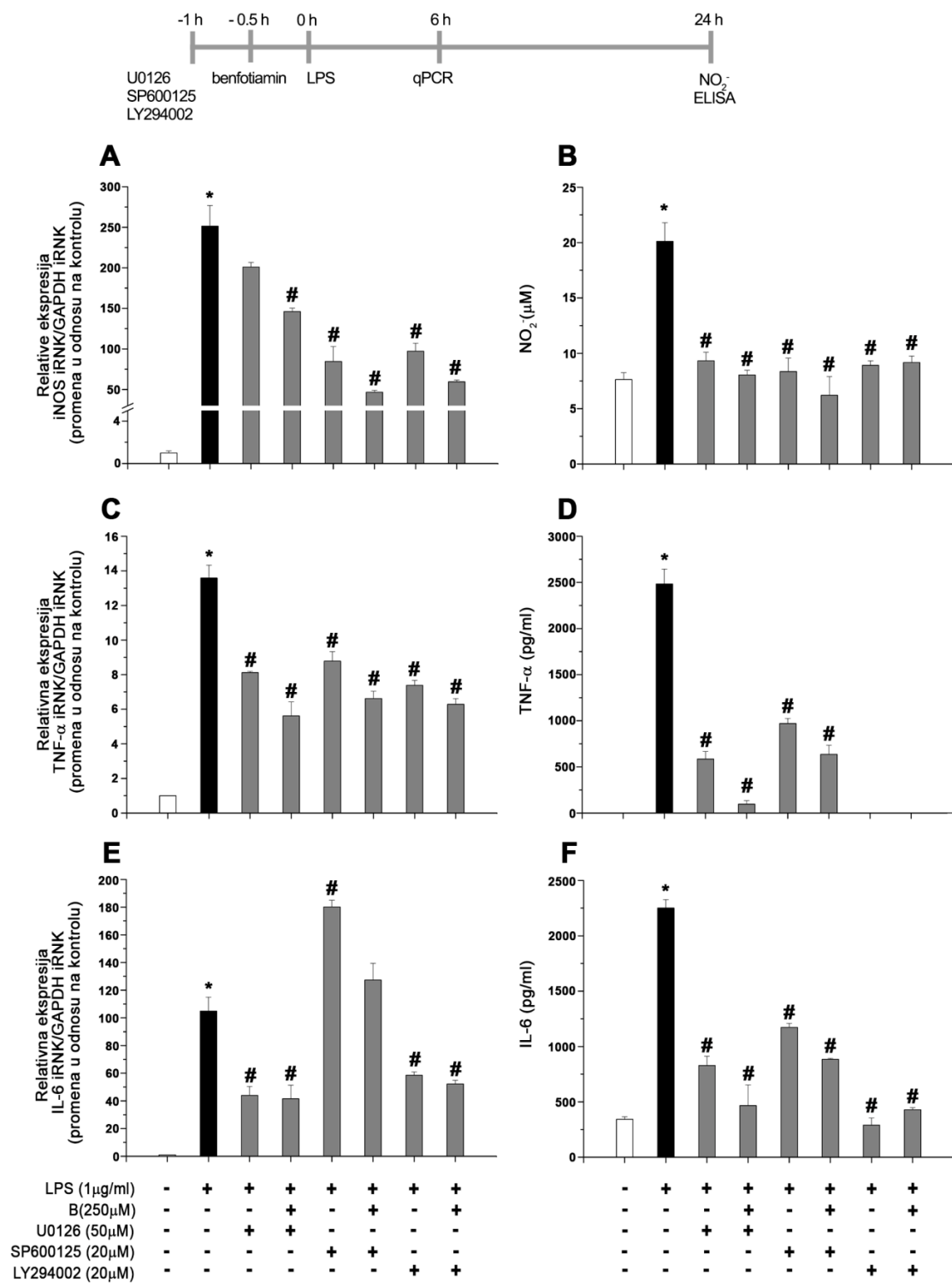
**Slika 25. Efekat benfotiamina na MAPK i Akt signalne puteve aktivirane stimulacijom LPS-om.** Aktivacija ERK (A), JNK (B), p38 (C) i Akt (D) kinaza analizirana je imunoblot metodom, 5-60 min posle stimulacije LPS-om. Nivo fosforilacije prikazan je u odnosu na ekspresiju nefosforilisane forme i sveden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

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

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

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

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



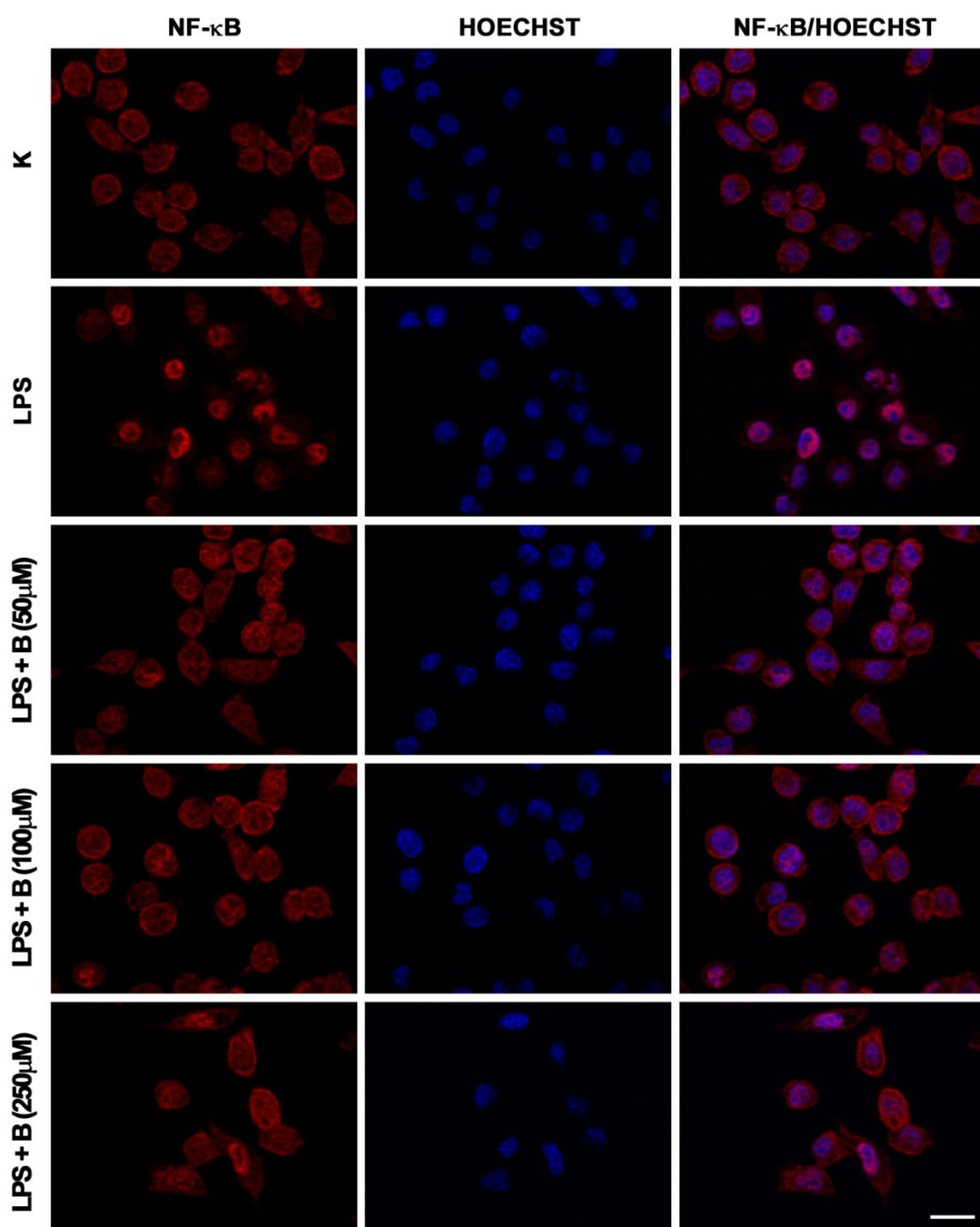
**Slika 26. Uticaj farmakoloških inhibitora aktivacije ERK, JNK i Akt kinaza.** Ekspresija iRNAK za iNOS (A), TNF-α (C) i IL-6 (E) je analizirana qPCR metodom. Rezultati su analizirani pomoću 2<sup>-ΔΔCt</sup> metode i ekspresija iRNAK za enzime je izražena u odnosu na ekspresiju iRNAK GAPDH u istom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

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

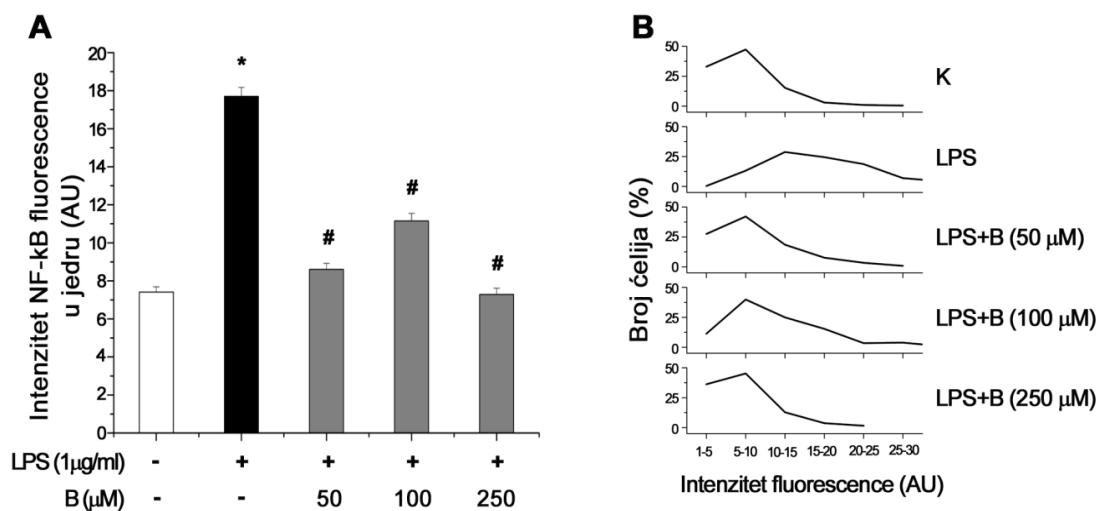
Budući da NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor ima važnu ulogu u inflamatornom odgovoru mikroglije, u narednim eksperimentima praćena je njegova aktivacija, odnosno translokacija p65 subjedinice u jedro. Translokacija je posmatrana 30 minuta posle stimulacije LPS-om. Analizirane su mikrografije BV-2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

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

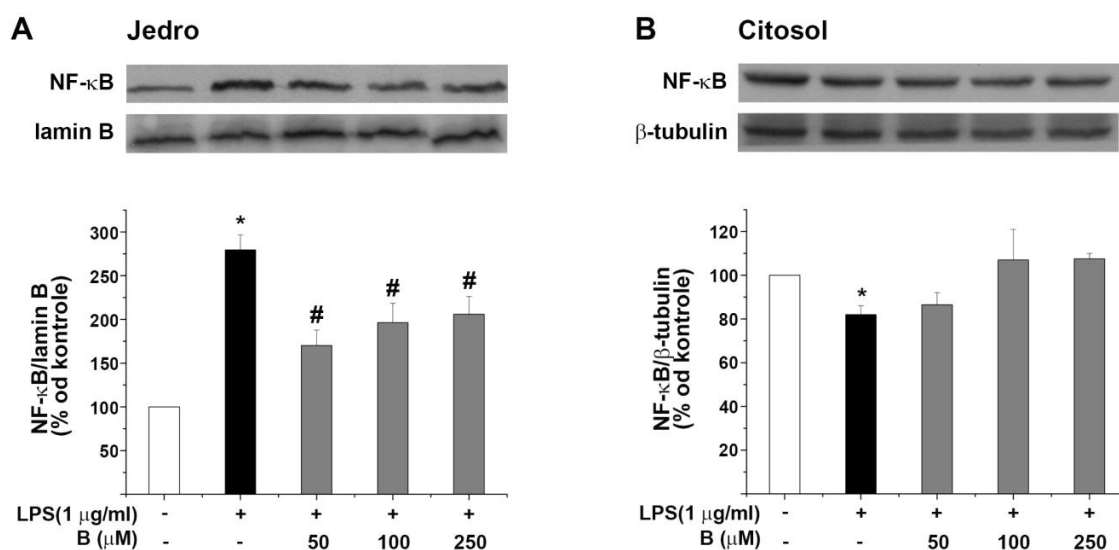
U celini, ovi rezultati navode na zaključak da su antioksidativna i antiinflamatorna svojstva benfotiamina posredovana direktnim efektom koji ostvaruje na NF- $\kappa$ B transkripcioni faktor.



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



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



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

**V DISKUSIJA**

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# **VI ZAKLJUČCI**



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

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

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

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

# **VII LITERATURA**

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

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

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

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

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



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

- Ding Z, Mathur V, Ho PP, James ML, Lucin KM, Hoehne A, Alabsi H, Gambhir SS, Steinman L, Luo J, Wyss-Coray T. Antiviral drug ganciclovir is a potent inhibitor of microglial proliferation and neuroinflammation. *J Exp Med*. 2014, 211(2):189-98.
- Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, Kraus D, Hlawatsch J, Walczak Y, Moehle C, Fuchshofer R, Langmann T. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation*. 2010, 7:3.
- Doherty GH. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. *Neurosci Bull*. 2011, 27(6):366–82.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 2000, 267:4912–4916.
- Dringen R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005, 7(9-10):1223-33.
- Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW. Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013, 8(4):807-23.
- Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*. 1997, 381(2):119–129.
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012, 8(9):1254-66.
- Eskes C, Honegger P, Juillerat-Jeanneret L, Monnet-Tschudi F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia*. 2002, 37(1):43–52.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 2007, 101(3):577-99.
- Ferreira B, Mendes F, Osório N, Caseiro A, Gabriel A, Valado A. Glutathione in multiple sclerosis. *Br J Biomed Sci*. 2013, 70(2):75-9.
- Figueroa S, Oset-Gasque MJ, Arce C, Martinez-Honduvilla CJ, González MP. Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J Neurosci Res*. 2006, 83(3):441-9.
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1991, 129(2):318-20.

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

- Gan L, Johnson JA. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1842(8):1208–1218.
- Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundörfer B, Daniel WG. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke*. 2003, 34(6):1412-8.
- Gelderblom M, Eminel S, Herdegen T, Waetzig V. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton--functions beyond neurodegeneration. *Int J Dev Neurosci*. 2004, 22(7):559-64.
- Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93(6):2499-504.
- Gertig U, Hanisch UK. Microglial diversity by responses and responders. *Front Cell Neurosci*. 2014, 8:101.
- Giulian D, Baker TJ. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 1986, 6(8):2163-78.
- Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010, 9(2):149-55.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010, 140(6):918-34.
- Gobbel GT, Chan TY, Chan PH. Nitric oxide- and superoxide-mediated toxicity in cerebral endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997, 282(3):1600-7.
- Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia*. 2013, 61(1):112-20.
- González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. 2014, 274(1-2):1-13.
- Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991, 196(2-3):143-51.
- Greter M, Lelios I, Croxford AL. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol*. 2015, 6:249.
- Günzl P, Bauer K, Hainzl E, Matt U, Dillinger B, Mahr B, Knapp S, Binder BR, Schabbauer G. Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation. *J Leukoc Biol*. 2010, 88(6):1259-69.
- Hailer NP. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol*. 2008, 84(3):211-33.

- Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003, 9(3):294-9.
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007, 10(11):1387-94.
- Hanisch UK. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci*. 2013, 7:65.
- Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002, 40(2):140-55.
- Harisa GI. Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013, 27(8):398-405.
- Haupt E, Ledermann H, Köpcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy--a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2005, 43(2):71-7.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012, 26(3):203-34.
- Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, 3(1):30-40.
- Hegazy MEF, Hamed AR, Mohamed TA, Debbab A, Nakamura S, Matsudac H, Paré PW. Anti-inflammatory sesquiterpenes from the medicinal herb *Tanacetum sinaicum*. *RSC Adv*. 2015, 5:44895-44901.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005, 115(1):1-20.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*. 2014, 14(7):463-77.
- Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*. 2009;26(2):83-94.
- Heyen JR, Ye S, Finck BN, Johnson RW. Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000, 77(1):138-47.
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem*. 2000, 75(3):965-972.

- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 2000, 19(21):2548–2556.
- Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1985, 82(16):5490–4.
- Hirohata S, Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum*. 1990, 33(5):644-9.
- Hirrlinger J, Gutterer JM, Kussmaul L, Hamprecht B, Dringen R. Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev Neurosci*. 2000, 22 (5–6):384–92.
- Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*. 2004, 279(31):32804-12.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*. 2001, 21(6):1975-82.
- Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem*. 2008, 107(2):557-69.
- Houle F, Rousseau S, Morrice N, Luc M, Mongrain S, Turner CE, Tanaka S, Moreau P, Huot J. Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress: impact on membrane blebbing. *Mol Biol Cell*. 2003, 14(4):1418-32.
- Huang BR, Chang PC, Yeh WL, Lee CH, Tsai CF, Lin C, Lin HY, Liu YS, Wu CY, Ko PY, Huang SS, Hsu HC, Lu DY. Anti-neuroinflammatory effects of the calcium channel blocker nifedipine on microglial cells: implications for neuroprotection. *PLoS One*. 2014, 9(3):e91167.
- Hüll M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J. The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 1996, 78(1):37-41.
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(14):7531-6.
- Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*. 1998, 10(2):205-19.

- Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI, Höjeberg B, Müssener A, Olsson T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol.* 1996, 69(1–2):103–15.
- Jana M, Dasgupta S, Liu X, Pahan K. Regulation of tumor necrosis factor-alpha expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J Neurochem.* 2002, 80(1):197-206.
- Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K. Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J Biol Chem.* 2001, 276(48):44527-33.
- Jang S, Kelley KW, Johnson RW. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105(21):7534-9.
- Jayasooriya RG, Lee KT, Lee HJ, Choi YH, Jeong JW, Kim GY. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin in BV2 microglia are mediated through suppression of the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway and activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014, 65:82-9.
- Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007, 83:507-20.
- Jha SK, Jha NK, Kar R, Ambasta RK, Kumar P. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. *Int J Mol Cell Med.* 2015, 4(2):67-86.
- Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem Int.* 2011, 58(3):248-60.
- Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005, 26(4-5):340-52.
- Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb J.* 2001, 15(1):43–58.
- Kacimi R, Giffard RG, Yenari MA. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- $\kappa$ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm.* 2011, 8:7.
- Kallapura G, Pumford NR, Hernandez-Velasco X, Hargis BM, Tellez G. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *Journal of Microbiology Research and Reviews.* 2014, 2(1):6-11.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1(3):a001271.

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



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

- Kumar A, Chen SH, Kadiiska MB, Hong JS, Zielonka J, Kalyanaraman B, Mason RP. Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic Biol Med*. 2014, 73:51-9.
- Kunwar A, Sandur SK, Krishna M, Priyadarsini KI. Curcumin mediates time and concentration dependent regulation of redox homeostasis leading to cytotoxicity in macrophage cells. *Eur J Pharmacol*. 2009, 611(1-3):8-16.
- Kwilasz AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*. 2014, 2:55–69.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. 2012, 92(2):689-737.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001, 81(2):807-69.
- Lassmann H. Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. *Exp Neurol*. 2013, 262:2–7.
- Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V. Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem Res*. 2001, 26(11):1209-16.
- Laurenzi MA, Sidén A, Persson MA, Norkrans G, Hagberg L, Chiodi F. Cerebrospinal fluid interleukin-6 activity in HIV infection and inflammatory and noninflammatory diseases of the nervous system. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990, 57(2):233-41.
- Lavrnja I, Parabucki A, Brkic P, Jovanovic T, Dacic S, Savic D, Pantic I, Stojiljkovic M, Pekovic S. Repetitive hyperbaric oxygenation attenuates reactive astrogliosis and suppresses expression of inflammatory mediators in the rat model of brain injury. *Mediators Inflamm*. 2015, 2015:498405.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990, 39(1):151-70.
- Ledeboer A, Brevé JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci*. 2002, 16(7):1175-85.
- Lee J, Hur J, Lee P, Kim JY, Cho N, Kim SY, Kim H, Lee MS, Suk K. Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *J Biol Chem*. 2001b, 276(35):32956-65.
- Lee JA, Song HY, Ju SM, Lee SJ, Seo WY, Sin DH, Goh AR, Choi SY, Park J. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by cell-permeable

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1991, 32(1):67-74.
- Malmeström C, Andersson BA, Haghighi S, Lycke J. IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles. *J Neuroimmunol.* 2006, 175(1-2):176-82.
- Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2005, 2:20.
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol.* 2006, 176(2):1046-52.
- Manivannan J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST. Dihydropyrimidinase-like 3 regulates the inflammatory response of activated microglia. *Neuroscience.* 2013, 253:40-54.
- Manzardo AM, He J, Poje A, Penick EC, Campbell J, Butler MG. Double-blind, randomized placebo-controlled clinical trial of benfotiamine for severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2013, 133(2):562-70.
- Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Lauro D, Fukamizu A, Lauro R, Federici M. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes.* 2006, 55(8):2231-7.
- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* 1999, 274(33):22903-6.
- Marnett LJ, Wright TL, Crews BC, Tannenbaum SR, Morrow JD. Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000, 275(18):13427-30.
- Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E Jr, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci.* 1998, 18(1):104-11.
- Masuda K, Shima H, Watanabe M, Kikuchi K. MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J Biol Chem.* 2001, 276(42):39002-11.
- Matsui T, Svensson CI, Hirata Y, Mizobata K, Hua XY, Yaksh TL. Release of prostaglandin E2 and nitric oxide from spinal microglia is dependent on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Anesth Analg.* 2010, 111(2):554-560.
- Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest.* 2001, 107(3):247-54.

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

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

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



- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic Biol Med.* 1998, 24(1):39-48.
- Palumbo S, Bosetti F. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013, 89(5):273-8.
- Pan X, Gong N, Zhao J, Yu Z, Gu F, Chen J, Sun X, Zhao L, Yu M, Xu Z, Dong W, Qin Y, Fei G, Zhong C, Xu TL. Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. *Brain.* 2010, 133(Pt 5):1342-51.
- Park J, Choi H, Min JS, Park SJ, Kim JH, Park HJ, Kim B, Chae JI, Yim M, Lee DS. Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *J Neurochem.* 2013, 127(2):221-32.
- Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal.* 2010, 22(7):977-83.
- Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med.* 1997, 75(3):174-86.
- Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience.* 1998, 87(2):319-24.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010, 23(2):75-93.
- Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology.* 2006, 66(11):1638-43.
- Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *J Neurosci Res.* 2004, 77(4):540-51.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001, 22(2):153-83.
- Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE<sub>2</sub> biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol.* 1999, 65(6):792-799.
- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(1):49-62.
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev.* 2006, 52(2):201-243.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Watters JJ, Sommer JA, Pfeiffer ZA, Prabhu U, Guerra AN, Bertics PJ. A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. *J Biol Chem.* 2002, 277(11):9077-87.
- Weitz TM, Town T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis.* 2012, 2012:314185.
- Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science.* 2002, 296(5577):2345-7.
- Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2006, 3:30.
- Winkler G, Pál B, Nagybéganyi E, Ory I, Porochnavec M, Kempler P. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung.* 1999, 49(3):220-4.
- Wu DC, Ré DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(32):12132-7.
- Wu S, Ren J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci Lett.* 2006, 394(2):158-62.
- Wüllner U1, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 1999, 826(1):53-62.
- Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron.* 2002, 35(3):419-32.
- Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV. Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2010, 48(10):1423-34.
- Yadav UC, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, 50(5):2276-82.
- Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor- interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem.* 1995, 270(52):31315-31320.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature.* 1997, 389(6653):865-70.



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

# **VIII DODATAK**

RESEARCH ARTICLE

# Benfotiamine Attenuates Inflammatory Response in LPS Stimulated BV-2 Microglia

Iva Bozic<sup>1</sup>, Danijela Savic<sup>1</sup>, Danijela Laketa<sup>2</sup>, Ivana Bjelobaba<sup>1</sup>, Ivan Milenkovic<sup>3</sup>, Sanja Pekovic<sup>1</sup>, Nadezda Nedeljkovic<sup>2</sup>, Irena Lavrnja<sup>1\*</sup>

**1** Department of Neurobiology, Institute for Biological Research "Sinisa Stankovic", University of Belgrade, Belgrade, Serbia, **2** Institute for Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, **3** Carl Ludwig Institute for Physiology, Faculty of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

\* [irenam@ibiss.bg.ac.rs](mailto:irenam@ibiss.bg.ac.rs)



## Abstract

Microglial cells are resident immune cells of the central nervous system (CNS), recognized as key elements in the regulation of neural homeostasis and the response to injury and repair. As excessive activation of microglia may lead to neurodegeneration, therapeutic strategies targeting its inhibition were shown to improve treatment of most neurodegenerative diseases. Benfotiamine is a synthetic vitamin B1 (thiamine) derivate exerting potentially anti-inflammatory effects. Despite the encouraging results regarding benfotiamine potential to alleviate diabetic microangiopathy, neuropathy and other oxidative stress-induced pathological conditions, its activities and cellular mechanisms during microglial activation have yet to be elucidated. In the present study, the anti-inflammatory effects of benfotiamine were investigated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine BV-2 microglia. We determined that benfotiamine remodels activated microglia to acquire the shape that is characteristic of non-stimulated BV-2 cells. In addition, benfotiamine significantly decreased production of pro-inflammatory mediators such as inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) and NO; cyclooxygenase-2 (COX-2), heat-shock protein 70 (Hsp70), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), whereas it increased anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10) production in LPS stimulated BV-2 microglia. Moreover, benfotiamine suppressed the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK) and protein kinase B Akt/PKB. Treatment with specific inhibitors revealed that benfotiamine-mediated suppression of NO production was via JNK1/2 and Akt pathway, while the cytokine suppression includes ERK1/2, JNK1/2 and Akt pathways. Finally, the potentially protective effect is mediated by the suppression of translocation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) in the nucleus. Therefore, benfotiamine may have therapeutic potential for neurodegenerative diseases by inhibiting inflammatory mediators and enhancing anti-inflammatory factor production in activated microglia.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Bozic I, Savic D, Laketa D, Bjelobaba I, Milenkovic I, Pekovic S, et al. (2015) Benfotiamine Attenuates Inflammatory Response in LPS Stimulated BV-2 Microglia. PLoS ONE 10(2): e0118372. doi:10.1371/journal.pone.0118372

**Academic Editor:** Anirban Basu, National Brain Research Center, INDIA

**Received:** October 22, 2014

**Accepted:** January 14, 2015

**Published:** February 19, 2015

**Copyright:** © 2015 Bozic et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia Grant III 41014. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Microglia are resident immune cells in the central nervous system (CNS), involved in its immune surveillance and continuous scanning for signs of danger [1,2]. These cells play a pivotal role in the CNS innate immunity and serve as the first line of defense against invading pathogens [3]. In a pathological context, activation of microglia involves proliferation, migration to the site of injury, increased expression of immunomodulators and transformation into phagocytes capable of clearing damaged cells and debris [4]. However, excessive inflammation involving microglia activation may lead to a vicious cycle of neuroinflammation that contributes to neurodegeneration [1]. Upon activation, microglia also undergoes dramatic morphologic changes, from resting ramified shape into activated amoeboid morphology [5,6,7]. These changes are concomitant with up-regulation of several transcription factors (e.g. NF- $\kappa$ B) and release of soluble factors, such as proinflammatory cytokines, chemokines [8] and reactive oxygen species [9]. Together, these processes play a critical role in the neuronal damage in various neurodegenerative diseases [10]. Therefore, the activation of counter-regulatory mechanisms is essential in preventing escalation of inflammatory processes [11], thus pointing to the importance of scrutinizing the molecular mechanisms underlying the microglia activation and deactivation. Consequently, it is important to investigate the negative regulators of microglial activation and their underlying molecular mechanisms.

The significance of vitamin B1 (thiamine) in glucose metabolism, neurotransmission and neurological function in CNS is well known [12,13]. The largest amount of this vitamin in CNS is found in cell membrane, where it has a role in regeneration of damaged cells [12]. Although all cell types utilize thiamine, the nervous system is particularly sensitive to thiamine deficiency pertaining to impaired oxidative metabolism, altered neuron function, blood–brain barrier disruption, astrocyte dysfunction, excitotoxicity, amyloid deposition and inflammation [14,15]. Thiamine deficiency is associated with Wernicke-Korsakoff syndrome, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, multiple sclerosis and diabetes [16,17], which are treated with effectiveness with thiamine or its derivatives. Furthermore, the relationship between thiamine deficiency and microglial activation has been established in animal studies [18,19]. Benfotiamine (S-benzoylthiamine O-monophosphate) is a synthetic S-acyl derivative of vitamin B1 with a much higher bioavailability than genuine thiamine [20,21,22,23,24]. Due to the open thiazole ring, benfotiamine has a high lipid solubility enabling it to reach, to a much higher degree than the water-soluble salts, several organs in animals and humans [25,26]. Originally, benfotiamine was developed in Japan to treat alcoholic neuropathy and other painful neurological complications [27]. Nowadays benfotiamine is largely used for treatment of diabetic neuropathy, nephropathy, retinopathy and cardiac angiopathy [23,28,29]. During the last few years, there was considerable interest in the therapeutic potential of benfotiamine and its protective effect was elucidated in diabetic complications, such as diabetic neuropathy [29] and alcoholic neuropathy [30]. Also, its beneficial effect was shown in the animal model of Alzheimer's disease. Benfotiamine significantly reduced the formation of amyloid plaques in APP/PS1 mice [31] and was able to attenuate the glucose-induced increase in  $\beta$ -amyloid protein synthesis in isolated HEK293 cells [32].

Although the protective role of benfotiamine has been documented, the involvement of benfotiamine potential effects on activated microglia remained elusive. Given the anti-inflammatory and anti-oxidative potency of benfotiamine [33,34,35], we determined in the present study the molecular mechanism underlying its protective role in LPS activated BV-2 microglia. Our data demonstrate that benfotiamine inhibited microglial activation through attenuated production of NO and expression of iNOS, Cox-2, Hsp 70 and decreased expression

and release of TNF- $\alpha$  and IL-6 by blocking ERK1/2, JNK and Akt/PKB signaling pathway and NF- $\kappa$ B activation induced by LPS in BV-2 cells. Our results indicate a potential role of benfotiamine in neuroprotection via its anti-neuroinflammatory effect. This hypothesis needs to be validated in an in vivo model in future studies.

## Materials and Methods

BV-2 microglial cell line was developed by immortalizing primary mouse microglial cells with v-raf/v-myc recombinant retrovirus, in the laboratory of Dr Blasi [36] and was a generous gift from Dr Alba Minelli (University of Perugia, Perugia, Italy). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a humidified incubator under a 95% air/5% CO<sub>2</sub>. When cells reached approximately 80% confluence, they were detached with 0.1% trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), seeded into appropriate dishes and incubated overnight. Then BV-2 cells were pre-treated for 30 min with different concentrations of benfotiamine (Sigma-Aldrich, Munich, Germany; 50, 100 or 250  $\mu$ M) before stimulation with LPS from *Escherichia coli* serotype 026:B6 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany; 1 $\mu$ g/ml). Incubation time with LPS varied depending on the purpose of the experiment.

## Cell viability and cell morphology

Cell viability and morphology was evaluated using xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Single Plate instrument (RTCA SP, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). This system enables analysis of the cell status in real-time by impedance measurement through gold microelectrodes on the bottom of each well of an E-plate 96 (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). The interaction of cells with microelectrodes generates a impedance that is expressed as a Cell Index value correlating with the number, viability, morphology and adhesion of the cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^4$  per well, incubated overnight and thereafter pretreated with benfotiamine for 30 min prior to stimulation with LPS for 24 hours. Cell Index was recorded every 5 min during the whole experiment. The same medium without a cell culture served as the background. Results were expressed as Normalized Cell Index calculated as the Cell Index at a given time point divided by the Cell Index at the time point of LPS administration.

In order to examine whether the differences in Cell Index values between the groups measured after 24 h of LPS stimulation were caused by the changes in cell viability, we performed crystal violet assay. BV-2 cells were seeded in 96 well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well), pre-treated with benfotiamine and stimulated with LPS for 24h. Cells were briefly washed with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, at 4°C. Subsequently, cells were stained with 1% crystal violet solution (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 15 min, washed with water and then dried overnight. The next day, the dye bound to the cells was dissolved with 33% acetic acid and absorbance was measured at 540 nm with the reference wavelength at 640 nm, using a microplate reader (LKB 5060–006, Vienna, Austria).

At the same time point, cell morphology was analyzed with phase contrast and fluorescence imaging of cytoskeleton. BV-2 cells were plated at  $8 \times 10^4$  on glass cover-slips ( $\varnothing$ 25 mm) in 35 mm dishes (Sarstedt, Newton, NC, USA). After 24h treatment cells were washed with PBS and phase contrast images were immediately acquired. For immunofluorescence cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, washed with PBS and then permeabilized with Triton X-100 (0.25%, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 15 min. Filamentous F-actin was stained with Alexa Fluor 555 phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 1:50 dilution in

PBS, for 30 min). After washing with PBS, nuclear counterstain with Hoechst 33342 (5 µg/ml, Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was performed. Cells were cover-slipped with Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and images were acquired using Zeiss Axiovert fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Images of cells stained with phalloidin were used to quantify the average cell surface in each group, using the AxioVisionRel 4.6 software (Zeiss, Jena, Germany). Cells were analyzed in five areas (138 x 104 µm<sup>2</sup>) per cover-slip, with three cover-slips for each group, in three independent sets of experiments.

### Immunofluorescent labeling and quantification of fluorescence intensity

For immunofluorescence, cells were pre-treated with various concentrations of benfotiamine and stimulated with LPS for 30 min (for detection of NF-κB/p65 translocation) and 24h (for detection of iNOS). Afterwards, cells were fixed, washed, permeabilized as stated previously and blocked with 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Primary antibodies against NF-κB/p65 or iNOS were applied overnight at 4°C (dilutions and specifications are given in Table 1). The next day cells were incubated with appropriate fluorophore—labeled secondary antibody (Table 1) for 1 h at room temperature. Cells were rinsed with PBS; nuclei were counterstained with Hoechst 33342 and after washing cover-slips were mounted with Mowiol. Negative controls underwent the same procedure without incubation with primary antibodies.

NF-κB/p65 fluorescence intensity in the nucleus was quantified with Image J software as previously described [37]. Fluorescence intensity of nuclear NF-κB/p65 was measured in at least 200 hundred cells per each experimental group and the results were presented in arbitrary units. The data were binned (5 AU steps) according to fluorescence intensity and represented as cumulative percentage.

**Table 1. List of primary and secondary antibodies used for immunofluorescence (IF) and western blot (WB).**

Antigen	Source	Dilution	Company
iNOS	rabbit	1:100 IF; 1:500 WB	abcam, ab15323
NFKB/p65	rabbit	1:200 IF; 1:2000 WB	Santa Cruz, sc-372
phospho-p44/42 MAPK	rabbit	1:2000 WB	cell signalling, 4370
p44/42 MAPK	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 4695
phospho-SAPK/JNK	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 4668
SAPK/JNK	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 9258
phospho-p38	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 9215
p38	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 9212
phospho-Akt	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 9275
Akt	rabbit	1:1000 WB	cell signalling, 9272
Cox-2	rabbit	1:1000 WB	Santa Cruz, sc-7951
Hsp 70	goat	1:1000 WB	Santa Cruz, sc-1060
lamin B	goat	1:1000 WB	Santa Cruz, sc-6217
β-tubulin	goat	1:2000 WB	Santa Cruz, sc-9935
β-actin	mouse	1:5000 WB	Sigma-Aldrich, A2228
anti-goat IgG-HRP	donkey	1:5000 WB	Santa Cruz, sc-2020
anti-rabbit IgG-HRP	donkey	1:5000 WB	Santa Cruz, sc-2305

doi:10.1371/journal.pone.0118372.t001

## Measurement of nitric oxide production

Production of NO was determined by measuring nitrite levels as a stable NO product, using the Griess reagent (1% sulphanilamide, Sigma-Aldrich, Munich, Germany, and 0.1% N-(naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride, Fluka, Buchs, Switzerland in 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). BV-2 microglial cells were seeded in 24-well plates (5 x 10<sup>4</sup> cells/well) and treated with benfotiamine for 30 minutes before application of LPS for 24 hours. Then, the cell culture medium was collected and mixed in equal volume with Griess reagent. Following 10 min incubation in the dark the absorbance at 570 nm was measured. Increasing concentrations of sodium nitrite were used to generate a standard curve from which the nitrite concentration in the medium was calculated.

## Quantitative real-time PCR

BV-2 cells were seeded in 6-well plates at a density of 3 x 10<sup>5</sup> cells/well, treated with benfotiamine and/or LPS and harvested after 6 hours. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Concentration of RNA was determined by measuring absorbance at 260 nm and 1 µg of RNA was used for cDNA synthesis (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time PCR amplifications were performed in triplicate, using a mixture of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), cDNA samples and designate primers (sequences given in Table 2, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reactions were conducted in the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative gene expression was calculated by comparing C<sub>T</sub> value of the gene of interest to the C<sub>T</sub> value of GAPDH, internal control (the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method). The PCR products were run on 2% agarose gels and visualized under the UV light (data not shown).

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

For assessment of cytokine production BV-2 cells were seeded in 6 well plates (3 x 10<sup>5</sup> cells/well), pre-treated with benfotiamine, and stimulated with LPS for 24 h. Thereafter, the cell culture medium was collected and concentrations of TNF-α, IL-6 and IL-10 were determined with ELISA. The production of TNF-α was measured using a pair of capture and detection antibodies (eBioscience, Frankfurt, Germany) according to the manufacturer's protocol. After incubation with biotinylated detection antibody, avidin-HRP conjugate and subsequently chromogenic substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, eBioscience, Frankfurt, Germany) were added. Color formation was stopped with 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and absorbance was measured at 450 nm. The concentration of TNF-α in cell culture medium was determined from the

**Table 2. List of primers used for Real Time-PCR.**

Gene	Forward primer	Reverse primer	bp	Annealing T(°C)
TNF-α	GCCCACGTCGTAGCAAACCAC	GGCTGGCACCACACTAGTTGGTTGT	117	64
IL-6	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	76	60
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	105	60
iNOS	GGTGTTCCTTTGCTTCCATGCTAAT	GTCCCTGGCTAGTGCTTCAGA	106	60
PTGS2	TTCAACACACTCTATCACTGGC	AGAAGCGTTTGCGGTACTCAT	271	64
GAPDH	GTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	182	60

doi:10.1371/journal.pone.0118372.t002

standard curve obtained with recombinant murine TNF- $\alpha$ . The production of IL-6 and IL-10 was assessed using Mini ELISA Development Kits (Peprotech, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's protocol. The protocol was the same as for determination of TNF- $\alpha$ , except for using the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), as a chromogenic substrate. Accordingly, absorbance was measured at 405 nm with correction set at 650 nm. Appropriate standard curves were constructed with recombinant murine cytokines to estimate concentration in the samples.

### Western blot analysis

BV-2 cells were seeded in 6 well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well), pre-treated with benfotiamine and stimulated with LPS for 30 min for detection of NF- $\kappa$ B/p65. For detection of proteins in MAPK signaling pathway, LPS incubation lasted for 5, 15, 30 and 60 min. For detection of COX-2 cells were stimulated for 24h. Cytosolic and nuclear extracts were prepared for detection of p65/NF- $\kappa$ B, using Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (NE-PER, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Proteins in MAPK signaling pathway, as for the COX-2 were detected after lysing the cells with ice-cold lysis Triton X-100 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecylsulphate (SDS)) containing protease (Roche, Penzberg, Germany) and phosphatase inhibitors (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Cell lysates were centrifuged at 17900g for 20 min at 4°C, and supernatants were collected. Protein content was determined using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Equal protein amounts (20  $\mu$ g) were loaded into the wells of 7.5% polyacrylamide gels. Following electrophoresis at 100–120 V, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Roche, Penzberg, Germany) for 1 h at 100 V with cooling. The membranes were blocked with 5% BSA dissolved in Tris-buffered saline Tween-20 (TBST) (20mMTris, pH 7.6, 136mMNaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature and incubated overnight with primary antibodies (Table 1). After washing step with TBST, membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Protein bands were visualized using chemiluminescence and developed onto the film (KODAK, Rochester, NY, USA). The relative expression levels of proteins were determined by densitometry and were normalized by comparing to  $\beta$ -tubulin or  $\beta$ -actin of the same lane. Data presented in graphs are mean values  $\pm$  standard error of the mean obtained from four independent immunoblots.

### Treatment with inhibitors of ERK1/2, JNK and Akt signaling pathways

BV-2 cells were seeded in 6 well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well), treated with specific inhibitors for ERK1/2 (U0126, Cell signaling, Danvers, MA, USA, #9910, final concentration 50  $\mu$ M), JNK (SP600125, Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Germany, final concentration 20  $\mu$ M) and Akt (LY294002 Cell signaling, USA, #9901, final concentration 20  $\mu$ M) for 30 min with subsequent incubation with benfotiamine (250  $\mu$ M) for 30 minutes and stimulated with LPS. Total RNA was extracted 6h after LPS treatment of the cells. For assessment of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production cell culture medium was collected after 24h of LPS treatment.

### Data analysis

Except where stated otherwise, results are expressed as mean values  $\pm$  standard error from three independent experiments each run in triplicate. The statistical significance of the differences was evaluated by analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test. Values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant.



## Results

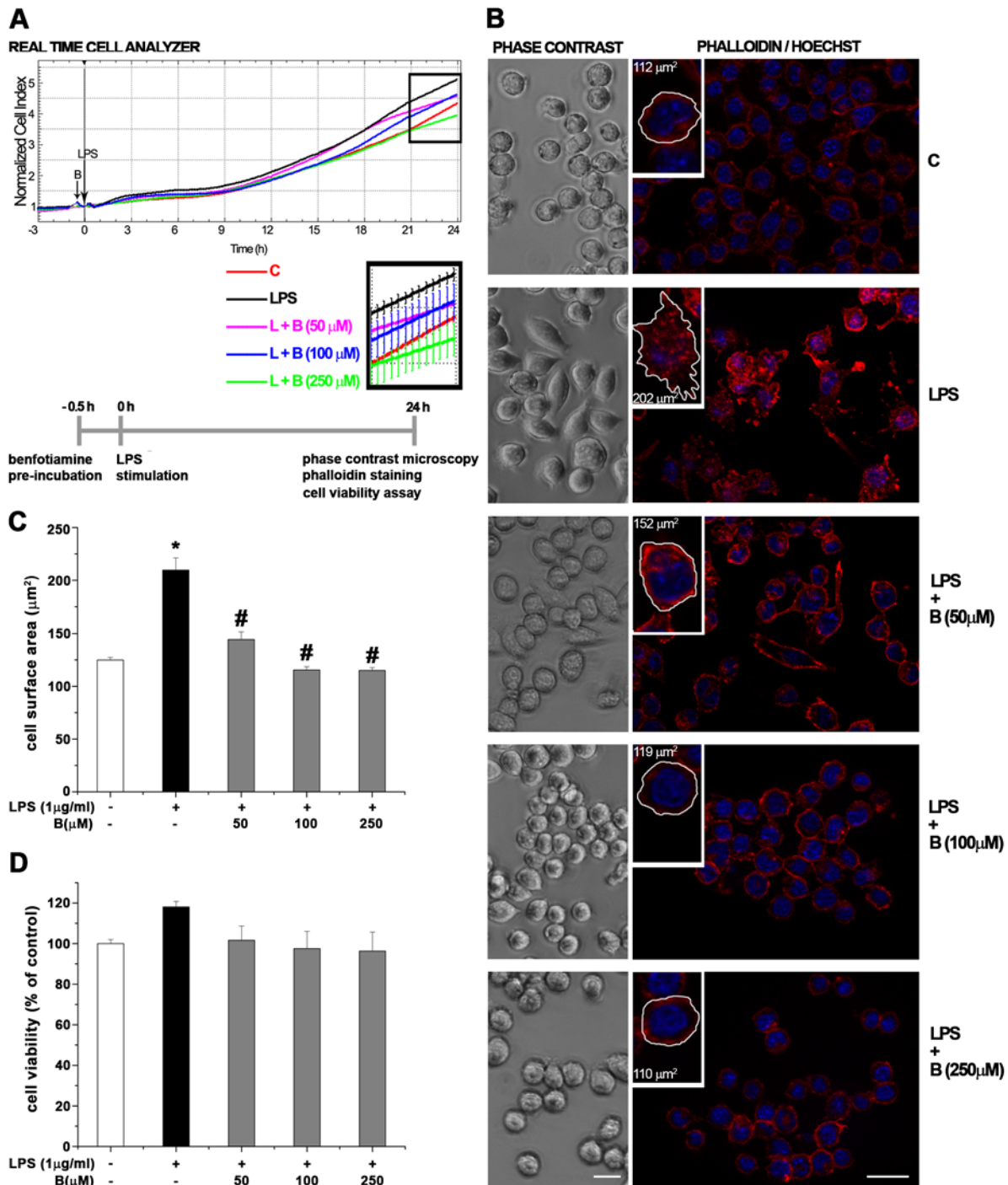
### Benfotiamine alters cell morphology in LPS-stimulated BV-2 cells by inducing reorganization of F-actin cytoskeleton

The influence of benfotiamine on cell viability and morphology of control and LPS-treated BV-2 cells was determined using RTCA, which monitors real-time changes in cell impedance (Fig. 1A; S1A Fig.), reflecting the changes in cell number/viability and morphology. The measurements revealed a time-dependent cell index increase, which was most pronounced in LPS-stimulated microglia. Benfotiamine in the absence of LPS revealed no significant changes in cell index of BV-2 cells (S1A Fig.). Pretreatment with benfotiamine alleviated the LPS-induced cell index increase in all dosages, with 250  $\mu$ M benfotiamine inducing the cell state comparable to one in control culture. Since alteration in cell index reflects either significant morphological changes or decrease in cell viability, phalloidin/Hoechst 33342 double fluorescent staining of F-actin and the viability assay were performed. BV-2 microglial cells display amoeboid, round morphology with uniform, punctuated distribution of F-actin in control cells. Benfotiamine pretreatment had no influence on cell morphology (S1B Fig.). However, benfotiamine induced striking alterations in cell morphology, from large cells with multiple processes, terminating with prominent microvilli, as evidenced in LPS group (Fig. 1B), to round or amoeboid, smooth-surface cells, evidenced in the control (Fig. 1B). Closer examination revealed that benfotiamine reduced dense fasciation of F-actin fibers underneath plasmalemma and stimulated their discrete relocalization throughout the cytoplasm (Fig. 1B). Since F-actin fibers critically determine cellular morphology, postulated benfotiamine-induced morphological changes can be quantitatively expressed as alternations in the cell surface area (Fig. 1C). Indeed, benfotiamine induced a decrease in mean cell surface area compared to LPS-treated BV-2 cells. Crystal violet and trypan blue exclusion viability assay revealed that cell viability of BV-2 cells exposed with or without LPS was not affected in the presence of benfotiamine, in neither one of the concentrations tested (Fig. 1D; S1D and S2 Figs.). Taken together, these data provide evidence that benfotiamine alleviated LPS-induced morphological changes in LPS-stimulated BV-2 cells by inducing reorganization of F-actin cytoskeleton.

### Benfotiamine decreases LPS-induced production of NO by suppressing iNOS-mRNA and protein level

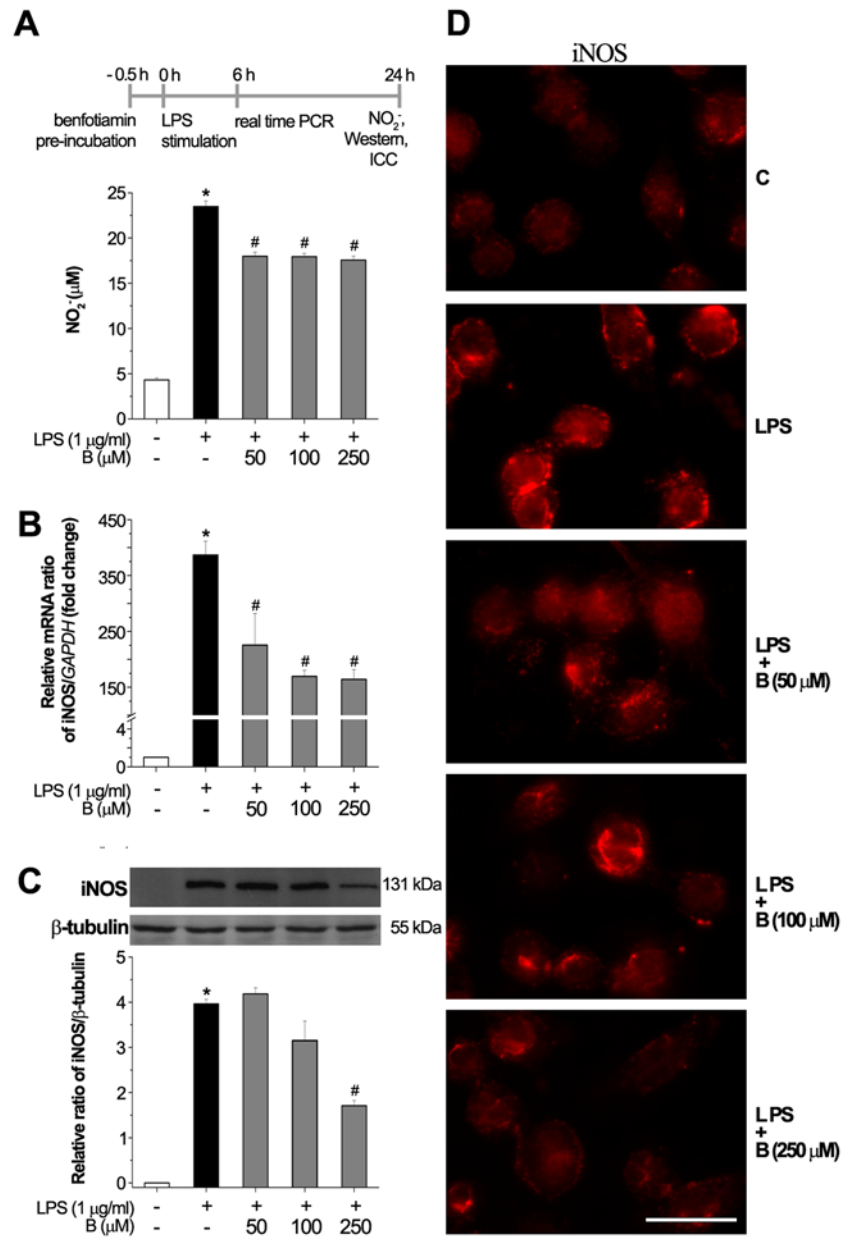
To evaluate the effect of benfotiamine on extracellular NO production in BV-2 cells in presence or absence of LPS, the culture medium was collected and concentration of nitrite was determined by the Griess method. BV-2 cells were pre-treated with benfotiamine (50, 100 and 250  $\mu$ M) for 30 min in presence or absence of LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 h. Such prolonged treatment with LPS was chosen to allow for changes at the NO level which are determined by the gene and the protein-expression of iNOS. As shown in S4A Fig., benfotiamine alone did not lead to any change in NO production, whereas LPS significantly induced the generation of NO in BV2 cells. The results indicated that extracellular NO increased in LPS-treated BV-2 cells compared to the control group ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2A), whereas, pre-treatment with benfotiamine before exposure to LPS suppressed the production of nitrite (by 25%,  $P < 0.001$ ), irrespective of the concentration of benfotiamine applied.

NO is generated by catalytic action of iNOS, wherein the expression of iNOS is increased by inflammatory factors, such as LPS. To explore whether benfotiamine affects NO production by interfering with expression of iNOS, we determined the mRNA level of iNOS by RT-PCR. Moreover, the protein level of iNOS was assessed by Western blot analysis and immunofluorescent labeling. The cells were pre-treated with benfotiamine (50, 100, 250  $\mu$ M) for 30 min and



**Fig 1. Functional characterization of benfotiamine effects in LPS-stimulated BV-2 microglia.** (A) Real-time monitoring of BV-2 cell viability using xCELLigence RTCA analyzer. Representative graph showing the rate of proliferation in cells incubated in control medium (red line), medium with 1  $\mu$ g/ml LPS (black line), or cells pretreated with benfotiamine, 50  $\mu$ M (pink line), 100  $\mu$ M (blue line) or 250  $\mu$ M (green line) and then treated with LPS for 24 h. (B) Benfotiamine-induced alterations in cell morphology were analyzed using phase-contrast microscopy (left panels), whereas cell surface area was quantified by Phalloidin/Hoechst fluorescent staining (red/blue) microscopy (right panels), using AxioVisionRel 4.6 software. Insets: cell surface area was measured in five areas ( $138 \times 104 \mu\text{m}^2$ ) per each cover-slip ( $n = 3$ ) per experimental group in three independent experiments. (C) Bars present mean surface areas ( $\pm$  SEM) obtained from data presented in Fig. 1B. (D) Cell viability was assessed by crystal violet staining and results are displayed as percentage of control  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells, # LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells. Scale bar: 20  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g001



**Fig 2. Effect of benfotiamine on LPS-induced production of NO.** (A) Benfotiamine suppressed LPS-induced release of NO. (B) Expression of iNOS-mRNA in LPS-stimulated BV-2 cells (black bar) and cells pretreated with benfotiamine (gray bars). The levels of iNOS-mRNA are expressed relative to the expression of GAPDH-mRNA as an internal control. (C) Expression of iNOS at the protein level, as determined by Western blot. Graph shows mean iNOS protein abundance ( $\pm$  SEM), from  $n = 3$  separate determinations, expressed relative to the abundance of  $\beta$ -tubulin in each lane. Representative Western blot of iNOS expression. (D) Immunofluorescence labeling of BV-2 cells against iNOS. Significance inside the graphs: \* $p < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells, # LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells. Scale bar: 20  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g002

then exposed to LPS (1  $\mu$ g/ml) for 6 h. The expression of *iNOS*-mRNA induced by LPS was significantly reduced (approximately by 42% for 50  $\mu$ M dose,  $P < 0.05$  and 57% for 100 and 250  $\mu$ M doses,  $P < 0.01$ ) at all applied concentrations of benfotiamine (Fig 2B). The level of iNOS protein was determined in cells pre-treated with benfotiamine for 30 min and treated with LPS

for 24 h. The increased levels of the iNOS protein induced by LPS were reduced by benfotiamine pre-treatment only in the presence of 250  $\mu$ M benfotiamine (Fig. 2C, 2D). Together, these results are consistent with the hypothesis that benfotiamine down regulates NO production by reducing expression of iNOS.

### Benfotiamine suppresses LPS-induced PTGS mRNA expression and COX-2 protein expression in BV2 microglial cells

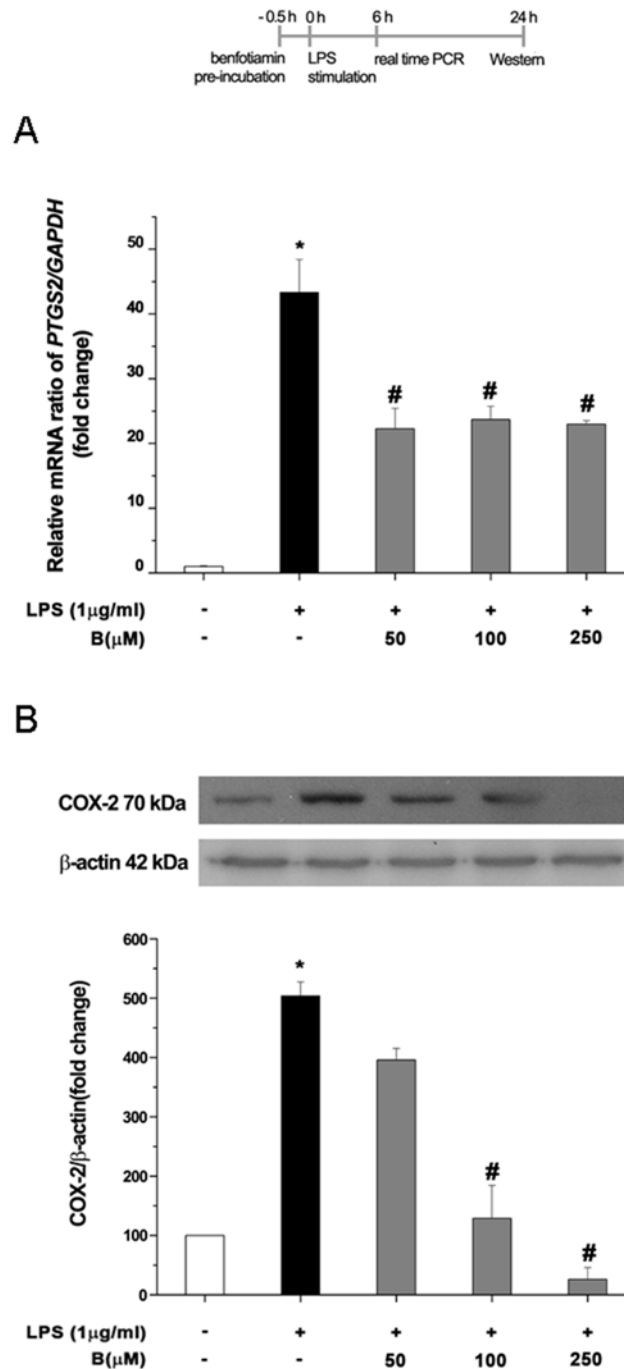
Since high levels of NO modulate the expression of COX-2, which is another effector molecule implicated in inflammatory neuropathology, we assessed the influence of benfotiamine on LPS induced prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) mRNA and COX-2 expression (Fig. 3). The cells were pre-treated with benfotiamine (50, 100, 250  $\mu$ M) for 30 min and then exposed to LPS (1  $\mu$ g/ml) for 6 h. The expression levels of the PTGS mRNA were significantly increased following LPS treatment. Benfotiamine substantially reversed the LPS-induced up-regulation of PTGS mRNA in all examined dosages by 47% (Fig. 3A). The level of COX-2 and Hsp70 protein was determined in cells pre-treated with benfotiamine for 30 min and incubated with LPS for 24 h. The increased levels of the COX-2 and Hsp70 protein induced by LPS were reduced by benfotiamine in the presence of 100 and/or 250  $\mu$ M doses, respectively (Fig. 3B; S6A, B Fig.).

### Benfotiamine modulates LPS-induced production and release of cytokines

Production and release of cytokines plays a central role in the microglia-mediated inflammatory action. Hence, the anti-inflammatory potential of benfotiamine was evaluated by assessing its effect on the expression of several master microglia cytokines. The expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 was analyzed using quantitative real-time PCR and ELISA. Prior studying the impact of benfotiamine on LPS-induced production of proinflammatory cytokines, we examined its effect on non-stimulated cells in regard to TNF- $\alpha$  and IL-6 gene and protein levels. The results presented on S3 and S4 Figs. show that benfotiamine alone had no effects on TNF- $\alpha$ - and IL-6 mRNA (S3A, B Fig.) or TNF- $\alpha$  and IL-6 release (S4B,C Fig.). As shown in Fig. 4, benfotiamine decreased LPS-induced TNF- $\alpha$ -mRNA (Fig. 4A) and TNF- $\alpha$  release (Fig. 4B). The same holds for IL-6, which was down-regulated at both mRNA (Fig. 4C) and protein levels (Fig. 4D). Although benfotiamine showed tendency to up regulate mRNA expression of anti-inflammatory cytokine IL-10, when compared to LPS group (Fig. 4E), no statistically significant difference was observed. However, benfotiamine at 250  $\mu$ M concentration induced significant stimulation of IL-10 release (Fig. 4F). Taken together, these data indicate that benfotiamine exerts anti-inflammatory properties by suppressing LPS-induced production of proinflammatory TNF- $\alpha$  and IL-6 and by stimulating the release of anti-inflammatory IL-10.

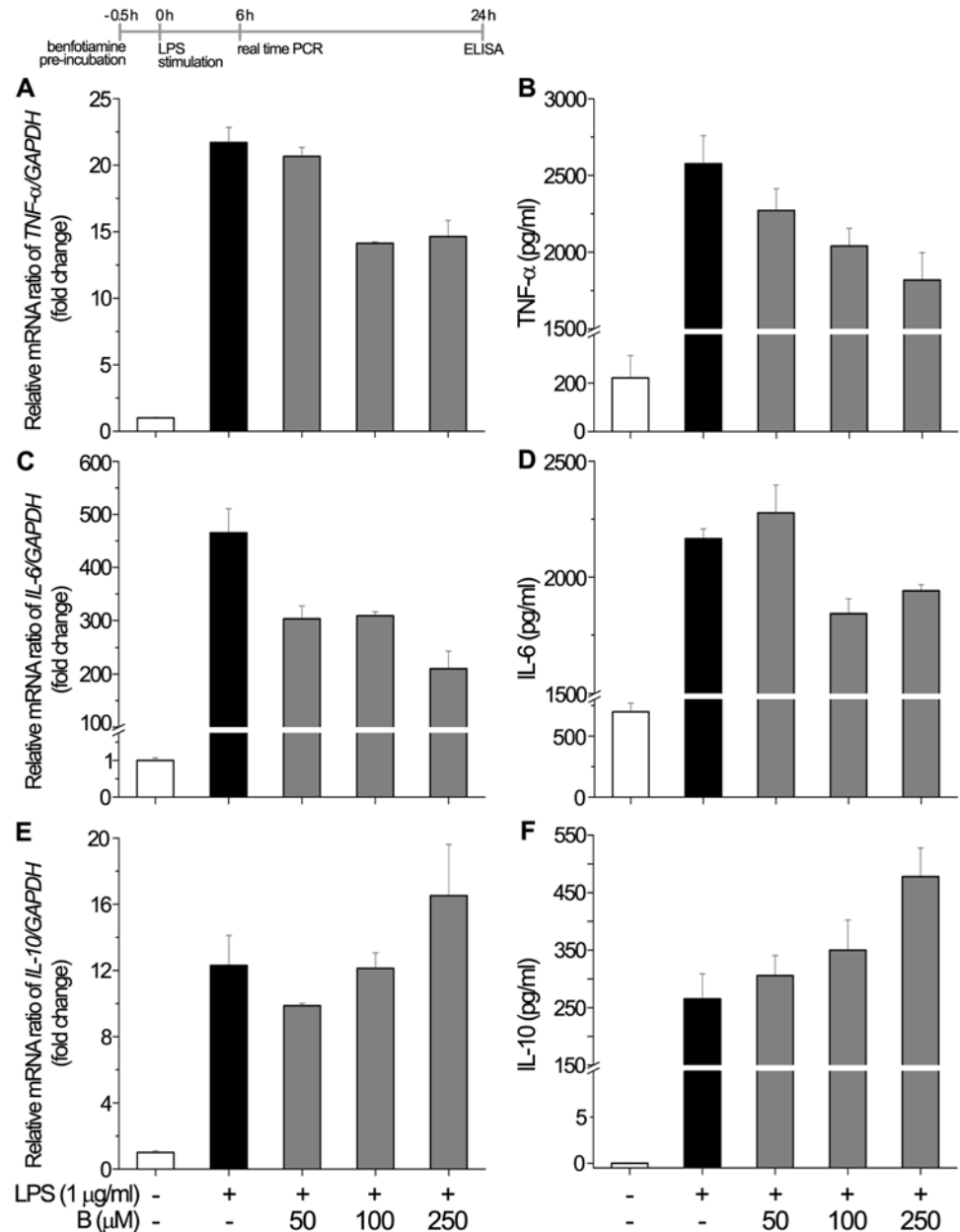
### Benfotiamine alters LPS-induced activation of MAPK and Akt signaling pathways

A number of studies have demonstrated that MAPKs have important roles in modulating the expression of pro-inflammatory cytokines and iNOS in LPS-stimulated microglia. To analyze the molecular mechanism underlying the observed effects of benfotiamine, we further examined their inhibitory effect on phosphorylation of MAPK and Akt signaling pathways (Fig. 5), which are upstream signaling molecules in inflammatory responses. The cells were pre-treated with 250  $\mu$ M benfotiamine for 30 min and then incubated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 5–60 min. Treatment of the cells with LPS for different time periods was conducted to assess the capacity



**Fig 3. The effect of benfotiamine on LPS—induced expression of proinflammatory effector molecules.** (A) Expression of prostaglandin—endoperoxidase synthase 2 (PTGS2) at mRNA level in BV-2 cells. Expression of PTGS2-mRNA was assessed by RT-PCR, in control culture (white bar), LPS-treated culture (black bar) and cultures pre-treated with benfotiamine, 6 h following addition of LPS. PTGS2-mRNA abundance was expressed relative to the abundance of GAPDH-mRNA, as an internal control. (B) Expression of COX-2 at the protein level, determined by Western blot analysis. Bars show Cox-2/β-actin expression ratio relative to control (100%) ± SEM, from  $n = 3$  separate determinations. Significance levels shown inside the graphs: \* $p < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells, # LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells.

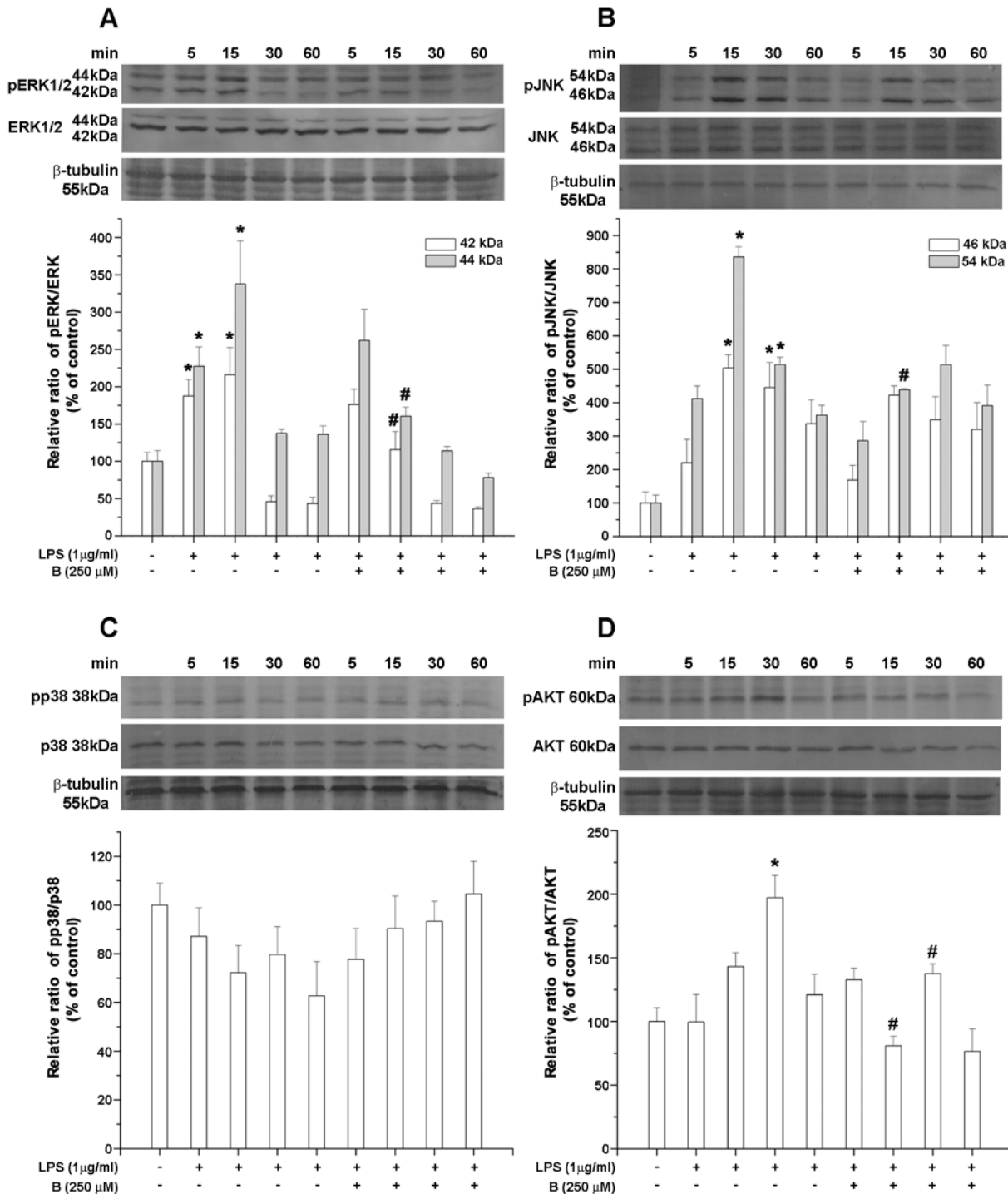
doi:10.1371/journal.pone.0118372.g003



**Fig 4. Effect of benfotiamine on cytokines expression and the release by BV-2 cells.** Expression of TNF- $\alpha$  (A, B), IL-6 (C, D) and IL-10 (E, F) was analyzed at mRNA (A, C, E) and protein (B, D, F) level. Abundance of each mRNA transcript was expressed relative to GAPDH as internal control. Release of the cytokines was determined in the culture supernatants by ELISA. Bars represent mean  $\pm$  SEM from  $n = 3$  separate determinations. Significance levels shown inside the graphs: \* -  $p < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells; # — LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g004

of benfotiamine to prevent different degrees of microglial activation. Treatment with LPS induced rapid phosphorylation of both 42-kDa and 44-kDa subunits of ERK/MAPK signaling pathway following a 5 and 15 min stimulation with LPS (Fig. 5A). While the peak ERK/MAPK expression was reached after 15 min LPS stimulation, the values leveled off to a control like amount after 30 and 60 min activation times. Notably, pretreatment with benfotiamine



**Fig 5. Quantitative Western blot analysis showing the effects of benfotiamine on MAP kinase signaling pathway.** Expression levels of (A) pERK/ERK, (B) pJNK/JNK, (C) p38 and (D) pAKT/AKT were assessed 5–60 min following LPS stimulation relative to  $\beta$ -tubulin  $\pm$  SEM from  $n = 4$  separate determinations. Significance levels shown inside the graphs: \* -  $p < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells; # - LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g005

significantly reduced the level of phosphorylation of both ERK subunits for the 15 minutes LPS stimulation.

Treatment with LPS transiently activated JNK signaling pathway by inducing the phosphorylation of 46-kDa and 54-kDa subunits that peaked for the 15 min and remained elevated for the 30 min stimulation (Fig. 5B). In cells pre-treated with benfotiamine, on the other hand, phosphorylation of 54-kDa was effectively inhibited for the 15 min LPS stimulation. The p38 signaling pathway was not affected by LPS (Fig. 5C). Hence, additional preincubation with benfotiamine also had no influence on the pp38/p38 level. Treatment with LPS elevated the pAkt/Akt level after 30 min stimulation. This effect was effectively counteracted through preincubation with benfotiamine (Fig. 5D). Together, these data suggest that benfotiamine potently inhibits the peak changes in the protein levels of pERK, pJNK and pAkt caused by the LPS activation.

### Benfotiamine alleviates LPS-induced NF- $\kappa$ B translocation to nucleus

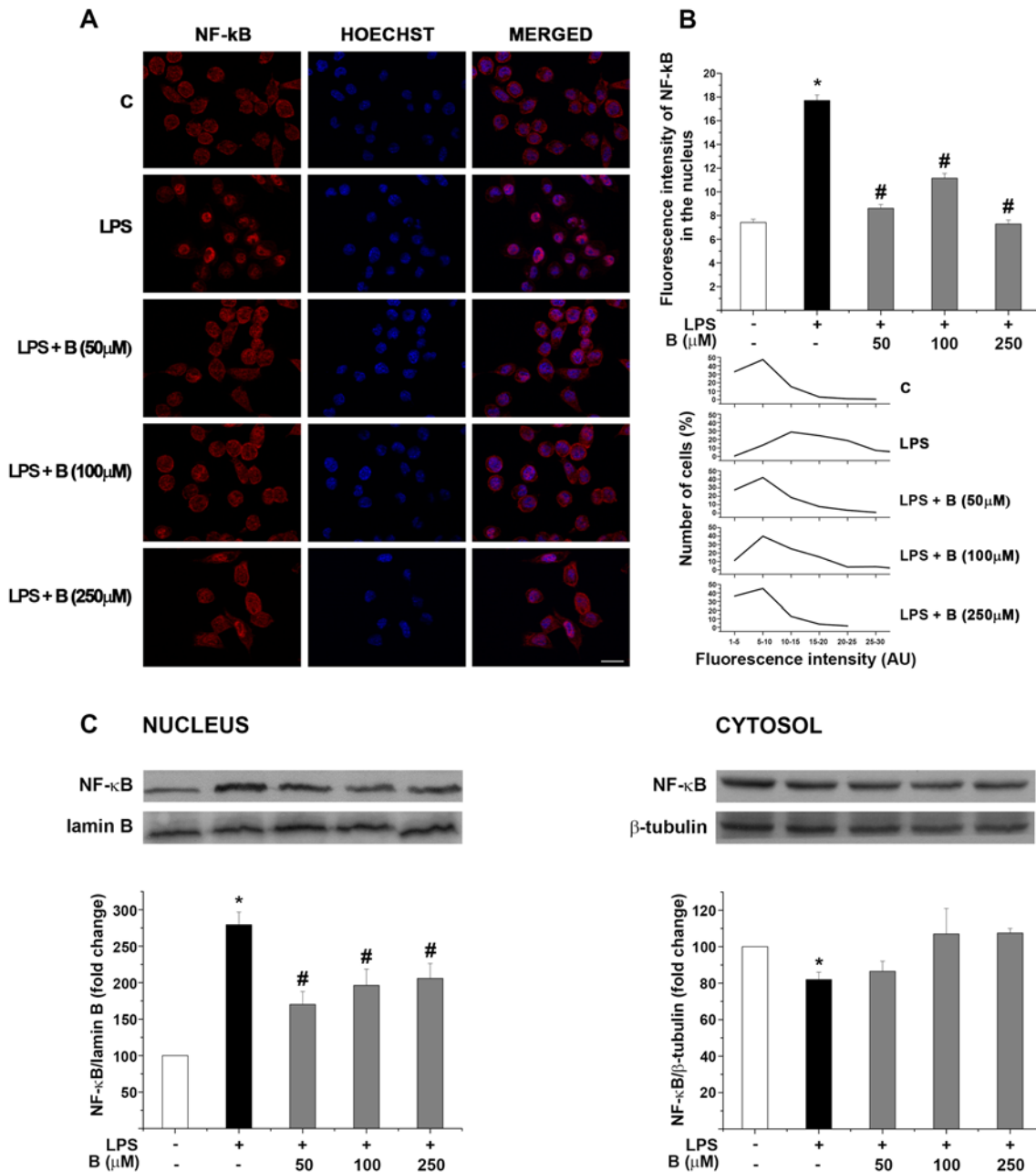
To determine whether the effects of benfotiamine in BV-2 cells were mediated *via* NF- $\kappa$ B signaling pathway, we analyzed nuclear translocation of NF- $\kappa$ B/p65 subunit, which is a critical step for the activation of this signaling pathway. BV-2 cells were pre-treated with benfotiamine (50, 100 and 250  $\mu$ M) for 30 min and then treated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 30 minutes. Treatment with benfotiamine alone did not alter nuclear p65 fluorescence intensity in all investigated dosages (S5A, B Fig.). By contrast, treatment with LPS induced a remarkable increase in nuclear the NF- $\kappa$ B/p65, as evidenced by a significant increase in nuclear p65 fluorescence intensity (Fig. 6A). Notably, the nuclear NF- $\kappa$ B/p65 protein level decreased significantly upon pre-treatment with benfotiamine in all concentrations tested. Mean nuclear NF- $\kappa$ B/p65 fluorescence intensities, collected from whole images are summarized in Fig. 6B. In BV-2 cells treated with benfotiamine, nuclear NF- $\kappa$ B/p65 intensities were comparable with the intensity in control cells, indicating that benfotiamine induced nuclear-to-cytoplasmic distribution of NF- $\kappa$ B/p65 similar to that in control cells. Distribution of relative nuclear NF- $\kappa$ B/p65 fluorescence intensity (arbitrary scale 1–30) in culture populations is presented in Fig. 6B (down). In control BV-2 cells, majority of cells (over 80%) showed nuclear NF- $\kappa$ B/p65 fluorescence intensity in the range of 1–10 AU, indicating poor nuclear p65 distribution. In cells treated with LPS over 90% exhibited the fluorescence intensity greater than 1–10 AU, with more than 30% of cell population exhibiting relative nuclear NF- $\kappa$ B/p65 intensity in the range of 20–30 AU. In cells pre-treated with benfotiamine at all tested concentrations, the distribution of relative nuclear NF- $\kappa$ B/p65 fluorescence was similar to control. Inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear translocation by benfotiamine was additionally confirmed by p65 western blotting in nuclear extracts of BV-2 cells (Fig. 6C). These results together strongly suggest that benfotiamine alleviates LPS-induced NF- $\kappa$ B activation by preventing nuclear translocation of NF- $\kappa$ B/p65 subunit.

Scale bar: 20  $\mu$ m.

### Benfotiamine inhibits LPS-induced microglial activation through ERK, JNK and AKT pathways

To confirm the involvement of the ERK1/2, JNK and Akt signaling pathways in the anti-inflammatory effects of benfotiamine, we examined the effect of their pharmacological inhibitors on microglial activation. Using specific inhibitors for ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) and Akt (LY294002), we investigated LPS-induced mRNA levels of iNOS, TNF- $\alpha$  and IL-6, as well as NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production in BV-2 cells. BV-2 cells were pretreated with U0126, SP600125 and LY294002 for 30 minutes with subsequent incubation with benfotiamine (250  $\mu$ M) for 30 minutes and stimulated with LPS. As shown in Fig. 7A, SP600125 and LY294002,

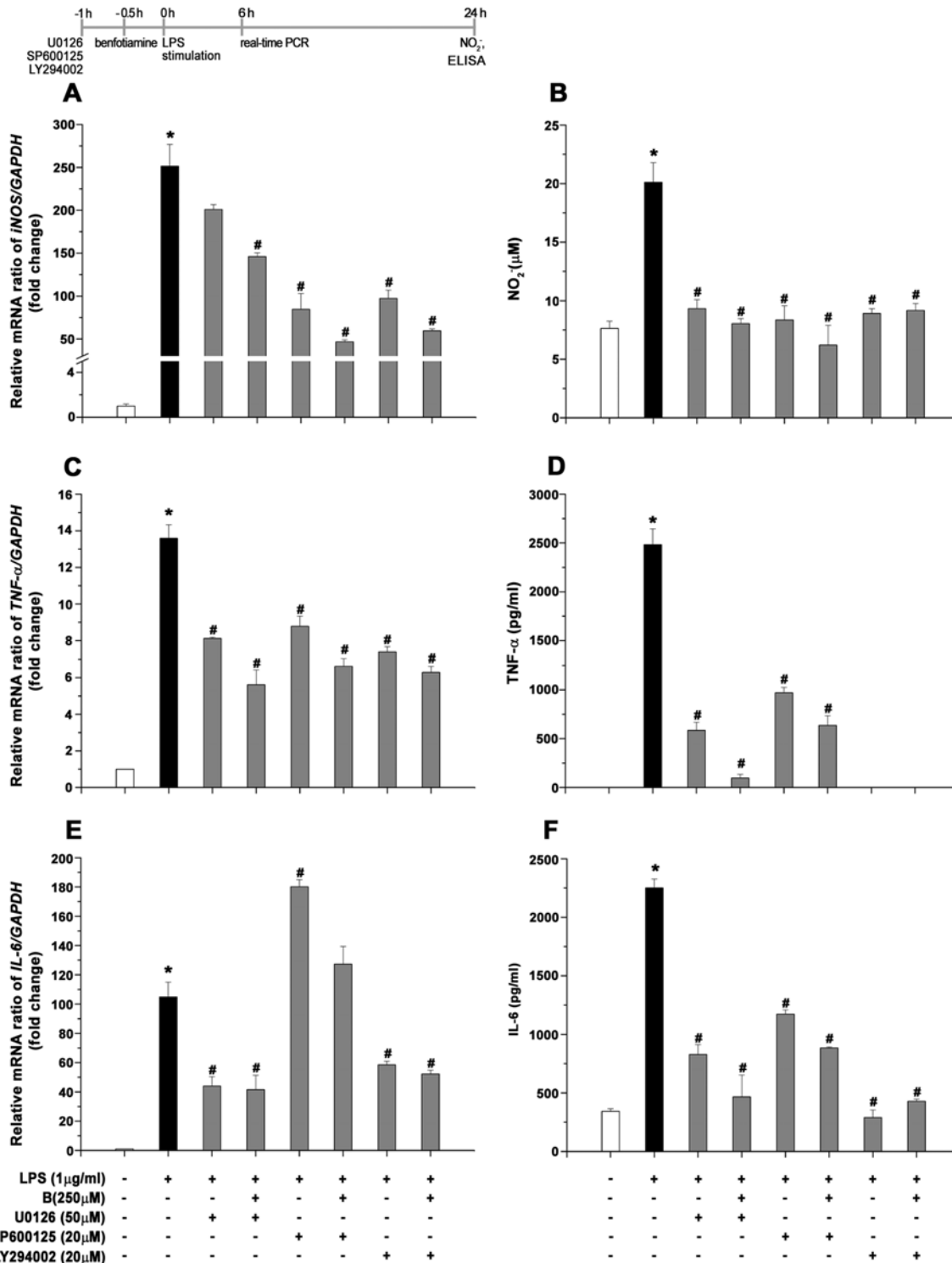




**Fig 6. Effect of benfotiamine on LPS—induced nuclear translocation of NF-κB/p65.** (A) Nuclear translocation of p65/NF-κB subunit was assessed by immunofluorescence labeling against p65 (red) and Hoechst nuclear fluorescence labeling (blue). (B) Nuclear fluorescence intensity of p65 was measured in > 200 hundred cells per experimental group, using ImageJ software and the results were presented in arbitrary units (lower graph). Data were binned (5 AU steps) according to fluorescence intensity and were represented as mean cumulative percentage ± SEM (upper graph). (C) Effect of benfotiamine on LPS—induced translocation of p65 from cytosolic to nuclear compartment was confirmed by Western blotting. Relative p65/β-tubulin abundance is expressed relative to the same abundance in control culture (100%) ± SEM from *n* = 4 separate determinations. Significance levels shown inside the graphs: \* - *p* < 0.05 control vs. LPS-induced BV-2 cells; # - LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells. Scale bar: 20 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g006

like benfotiamine, significantly suppressed LPS-induced iNOS gene expression by 66 and 61%, respectively. In contrast, U0126 had no effect on mRNA iNOS expression while benfotiamine decreased iNOS gene expression. In addition, pretreatment with U0126, SP600125 and LY294002 significantly suppressed LPS-induced NO production by 54, 58 and 56%,



**Fig 7. Effect of pharmacological inhibitors on iNOS, TNF and IL6 gene expression followed by NO, IL-6 and TNF-α production. (A, C, E)** Expression of iNOS, TNF and IL6 at mRNA level in BV-2 cells. Expression of iNOS, TNF and IL6-mRNA was assessed by RT-PCR, in control culture (white bar), LPS-treated culture (black bar), cultures pre-treated with U0126 (50 μM), SP600125 (20 μM) or LY294002 (20 μM) in presence or absence of benfotiamine (gray bars), 6 h following addition of LPS. iNOS, TNF and IL6-mRNA abundance was expressed relative to the abundance of GAPDH-mRNA, as an internal control. **(B, D, F)** The cultured supernatants were collected and analyzed for NO using Griess method, or TNF-α and IL6 production with ELISA. The data represent the mean ± SEM (n = 3), \*P<0.05 control vs. LPS-induced BV-2 cells, # LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0118372.g007

respectively (Fig. 7B). Benfotiamine failed to show some additive effect. On the other hand, U0126, SP600125 and LY294002 reduced LPS-induced cytokine up-regulation. U0126 and LY294002 pretreatment resulted in a significant reduction of LPS-induced TNF- $\alpha$  (by 40 and 45%) and IL-6 (by 58 and 56%) mRNA expression ( $P < 0.05$ ). In addition, subsequent incubation with benfotiamine also displayed significant reduction of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression (Fig. 7C, E). SP600125 reduced the elevation of TNF- $\alpha$  gene expression by 35.3% ( $P < 0.05$ ), but resulted in increase in IL-6 gene expression. However, all three inhibitors in presence or absence of benfotiamine resulted in significant decrease of LPS-induced NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production (Fig. 7B, D, F). Thus, these data collectively suggest that ERK1/2, JNK and AKT play a key role in the anti-inflammatory effects of benfotiamine.

## Discussion

Chronic and progressive neurodegeneration is generally associated with neuroinflammatory reaction mediated by resident glial cells in the brain — microglia and astrocytes. Hence, the control over the extent and duration of neuroinflammation through the modulation of glial response arose as a promising approach for treatment of neurodegenerative diseases. This was the rationale to explore the potency of benfotiamine to prevent inflammatory response in LPS activated BV2 microglial cells. The results of our study demonstrated that pretreatment with benfotiamine prevents the morphological changes evoked by LPS activation, decreases the production of NO, expression iNOS, COX-2, Hsp70 and modulates the release of master cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 by interfering with ERK1/2, JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways.

Reactive phenotypes in cultured microglia can be evoked by diverse inflammatory challenges, such as LPS-induced toxicity [38,39,40]. Once activated in an inflammatory environment, microglia acquires the macrophage-like capabilities, including amoeboid cell shape, migration, production of inflammatory cytokines and phagocytosis. One of the important markers of microglial morphology is the organization of F-actin fibers [41,42,7]. Our data showed that benfotiamine induced prominent alterations in the morphology of LPS-activated BV-2 cells, by a mechanism engaging: (i) the reorganization of the actin cytoskeleton, (ii) reduction of dense fasciation of membrane-bound stress fibers and (iii) promoting the stress fibers relocalization throughout the cell. The LPS-activated BV-2 cells exhibited dense network of F-actin fibers forming numerous membrane ruffling's at the cell border, whereas pretreatment with benfotiamine transformed the cells to be small and ovoid in shape, with smooth cell edges. Benfotiamine putatively exerts its protective effects against microglial activation by suppressing the formation of membrane ruffling's which are found at the front edge of activated microglia and represent the driving force in chemotaxis [43]. In fact, benfotiamine treated LPS-induced BV-2 cells retained the shape that is characteristic of non-stimulated microglia. Concomitant with morphological changes, biochemical alternation occurred as well.

Another hallmark of activated microglia is the production of pro-inflammatory mediators and cytokines, which trigger an inflammatory cascade and perpetuate inflammatory processes associated with several neurodegenerative diseases. Our data is consistent with benfotiamine-induced decrease of NO production and expression of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 by LPS-activated BV-2 cells.

NO is an important signaling molecule with diverse regulatory roles in the nervous system [44,45]. It is generated endogenously by catalytic action of iNOS. High levels of NO induce COX-2 expression, additional effector molecule implicated in inflammatory neuropathology. COX-2 is an enzyme encoded by the PTGS2 gene and its activation is associated with various inflammatory diseases [46]. Therefore, a compound capable of downregulating COX-2 could

potentially possess anti-inflammatory activities. It has been shown that benfotiamine reduces production of NO and inhibits iNOS protein expression in LPS-stimulated macrophages [34]. Consistent with previous study, we reported that pretreatment with benfotiamine inhibited NO secretion and suppressed iNOS and COX-2 at both the gene and protein levels in LPS-stimulated BV-2 cells. In addition, benfotiamine reduced expression and release of TNF- $\alpha$  and IL-6, which are the cytotoxic mediators linked with the development of chronic inflammatory and autoimmune diseases [47]. Specifically, TNF- $\alpha$  signaling recruits different signaling mediators including caspases, NF- $\kappa$ B and MAPK, eventually leading to transcriptional activation of inflammatory genes [48,49]. The IL-6 modulates phagocytic activity and induces morphological alterations in microglia [50]. On the other hand, IL-10 inhibits the LPS-induced increase in IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [51] and modulates PI3K pathway [52,53,54]. Taken together, we conclude that benfotiamine shifts BV-2 microglial cells from inflammatory toward more quiescent cell state, as it reduces iNOS, TNF- $\alpha$  and IL-6 gene and protein expression and slightly increases IL-10 production in response to LPS.

In microglial cells, NF- $\kappa$ B regulates a number of proinflammatory genes, including iNOS, PTGS [55], TNF- $\alpha$  and IL-6 [56,57,58]. We found that benfotiamine significantly downregulates the proinflammatory mediators and cytokines in LPS-activated BV-2 cells, through modulation of multiple signaling pathways. Namely, the importance of ERK1/2 in iNOS and COX-2 expression [59,45] or microglia activation, migration and production of cytokines, such as IL-6 is well established [60,61,62]. On the other hand, JNK signaling pathway is involved in morphological modification, cytokine transcription [63,64,65] and it was proposed to act as a co-mediator in activation of microglia [66,67,68]. Furthermore, the Akt/PKB signaling pathway seems to be required for the activation of inflammatory responses in microglial cells [69]. In this study, we were able to demonstrate that benfotiamine significantly reduced the LPS-induced increase in phosphorylated levels of ERK1/2, JNK and Akt/PKB. Further studies with pharmacological MAPK inhibitors revealed that JNK and Akt specific inhibitor SP600125 and LY294002 led to significant reduction of LPS-induced iNOS mRNA expression and NO production, whereas inhibition of ERK1/2 signaling by U0126 displayed no effect on iNOS mRNA, suggesting iNOS expression is induced mainly through JNK1/2 and Akt signaling. Indeed, suppression of iNOS induction and NO production in reactive microglia by JNK1/2 inhibitors has been consistently reported [67, 70]. Moreover, inhibition of Akt phosphorylation is found to be involved in inhibition of iNOS in microglia [71], while the role of ERK seems controversial, as both, inhibition or no effect by ERK1/2 inhibitors have been reported [67,72]. Benfotiamine in these experiments failed to show some additive effect. In regard to expression of proinflammatory cytokines, inhibition of ERK1/2, JNK and Akt resulted in a reduction of the LPS-stimulated TNF- $\alpha$  and IL-6 release, demonstrating that benfotiamine suppresses LPS-induced cytokine production collectively via these signaling pathways without exerting any additional effect on activated microglia. Several studies have demonstrated that the PI3K/Akt pathway is the prerequisite for the activation of NF- $\kappa$ B leading to elevation of proinflammatory mediators in BV2 cells [73, 69]. It is known that activation of NF- $\kappa$ B signaling cascade requires translocation of NF- $\kappa$ B/p65. Benfotiamine potency to inhibit NF- $\kappa$ B activation was previously shown in an in vivo model of diabetes [22], as well as in vitro, in LPS-activated macrophages [34]. Our data demonstrated that benfotiamine reduced the LPS-stimulated intranuclear accumulation of NF- $\kappa$ B/p65 and decreased a fraction of cells with activated NF- $\kappa$ B signaling cascade. Thus, based on these results, we suggest that benfotiamine inhibits translocation of NF- $\kappa$ B/p65 into the nucleus and consequently alleviate the transcription of proinflammatory genes.

In conclusion, the present observations identify a potential anti-inflammatory role of benfotiamine in LPS-activated microglia, mainly through the inhibition of ERK1/2, JNK and Akt

activation, by interference with NF $\kappa$ B activity. Moreover, our results opens the possibility that benfotiamine might be useful in treatment of pathologies that involve chronic inflammation, observed in some neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's disease or multiple sclerosis. Although, the neuroprotective actions of benfotiamine need to be explored further, these findings suggest that additional in vivo studies will provide a feasible strategy to modulate an inflammatory response in the CNS.

## Supporting Information

**S1 Fig. Functional characterization of benfotiamine effects in BV-2.** (A) Dynamic monitoring of BV-2 cell activation was analyzed using xCELLigence RTCA analyzer. Real-time impedance measurement demonstrated slow, gradual increase in cell impedance in all examined groups. (B) The effect of benfotiamine on morphological changes. The cell morphology was observed with phase-contrast microscopy, followed by Phalloidin /Hoechst staining (red/blue). (C) The quantification of cell size was performed using Axiovision 4.6 software (n = 3). (D) Cell viability was evaluated by crystal violet assay. Each value indicates the mean  $\pm$  SEM (n = 3). Scale bar: 20  $\mu$ m.

(TIF)

**S2 Fig. Benfotiamine does not affect cell viability of BV2 microglial cells assessed by trypan blue exclusion test.** The cells were pretreated with benfotiamine at indicated dosages for 30 minutes in presence or absence of LPS for additional 24h. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of five independent experiments performed in triplicate.

(TIF)

**S3 Fig. The cells were pretreated with benfotiamine at indicated dosages for 30 minutes and incubated for additional 6h to analyze mRNA levels by means of real-time PCR.** The gene expression was normalized to the endogenous control GAPDH. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

(TIF)

**S4 Fig. Effect of benfotiamine on NO, TNF- $\alpha$  and IL6 production in control BV2 cells.** BV2 cells were pretreated with benfotiamine for 30 minutes and incubated for additional 24h in absence of LPS. NO production was assessed by Griess assay. The amounts of TNF- $\alpha$  and IL6 in cell culture supernatants were obtained using ELISA. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

(TIF)

**S5 Fig. Effect of benfotiamine on NF- $\kappa$ B/p65 activity.** (A) Immunofluorescence images of cells stained with antibody against p65 subunit of NF- $\kappa$ B (red) and Hoechst (blue). (B) Quantification of fluorescence intensity of NF- $\kappa$ B/p65 in the nucleus, evaluated with ImageJ software (B, top). Mean values of fluorescence intensity  $\pm$  SEM, expressed in arbitrary units (B, down). Distribution of fluorescence intensity in groups treated with benfotiamine is similar to control group. The data represent the mean  $\pm$  SEM (n = 4). Scale bar: 20  $\mu$ m.

(TIF)

**S6 Fig. Benfotiamine suppressed LPS-induced expression of Hsp70 in BV2 cells.** The cells were pre-treated with the indicated concentration of benfotiamine for 30 minutes, followed by treatment of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. A shows representative image of the western blot B show the optical densities of Hsp70 normalized to the loading control  $\beta$ -actin (n = 4). Stimulation of BV-2 cells with LPS leads to a strong increase in the production of Hsp70, while

benfotiamine (250  $\mu$ M) treatment decrease the expression of Hsp70. \* $P < 0.05$  control vs. LPS-induced BV-2 cells, # LPS vs. benfotiamine pretreated LPS activated BV-2 cells. (TIF)

## Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr Mirjana Stojiljkovic for valuable discussion of the results.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IL I. Bozic NN. Performed the experiments: I. Bozic DS DL. Analyzed the data: IL I. Bozic DS NN. Contributed reagents/materials/analysis tools: IM I. Bjelobaba. Wrote the paper: IL I. Bozic NN SP I. Bjelobaba IM.

## References

1. Gertig U, Hanisch UK (2014) Microglial diversity by responses and responders. *Front Cell Neurosci* 8:101. doi: [10.3389/fncel.2014.00101](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00101) PMID: [24744702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24744702/)
2. Prinz M, Mildner A (2011) Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59:177–87. doi: [10.1002/glia.21104](https://doi.org/10.1002/glia.21104) PMID: [21125659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21125659/)
3. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–8. PMID: [8843599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8843599/)
4. Luo XG, Chen SD (2012) The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener* 24; 1:9. doi: [10.1186/2047-9158-1-9](https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-9)
5. Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57–69. PMID: [17180163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17180163/)
6. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553. doi: [10.1152/physrev.00011.2010](https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010) PMID: [21527731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21527731/)
7. Savic D, Stojiljkovic M, Lavrnja I, Parabucki A, Bjelobaba I, Nedeljkovic N, et al. (2014) Ribavirin shows immunomodulatory effects on activated microglia. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 36:433–441. doi: [10.3109/08923973.2014.971962](https://doi.org/10.3109/08923973.2014.971962) PMID: [25393884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25393884/)
8. Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89–105. doi: [10.1007/s00401-009-0622-0](https://doi.org/10.1007/s00401-009-0622-0) PMID: [20012873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20012873/)
9. Bordt EA, Polster BM (2014) NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radic Biol Med* 76C:34–46. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.033](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.033)
10. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193–201. doi: [10.1038/nrneurol.2010.17](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17) PMID: [20234358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20234358/)
11. McCarty MF (2006) Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 67:251–69. PMID: [16513287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16513287/)
12. Enomoto KI, Edwards C (1985) Thiamine blockade of neuromuscular transmission. *Brain Research* 358: 316–323. doi: [10.1016/0006-8993\(85\)90976-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90976-x) PMID: [2416387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2416387/)
13. Ba A (2008) Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. *Cellular and Molecular Neurobiology* 28: 923–931. doi: [10.1007/s10571-008-9297-7](https://doi.org/10.1007/s10571-008-9297-7) PMID: [18642074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18642074/)
14. Pácal L, Kuricová K, Ka ková K (2014) Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? *World J Diabetes* 15; 5: 288–295.
15. Ke ZJ, DeGiorgio LA, Volpe BT, Gibson GE (2003) Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:195–207. PMID: [12578229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12578229/)
16. Jhala SS, Hazell AS (2011) Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem Int* 58:248–60. doi: [10.1016/j.neuint.2010.11.019](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.019) PMID: [21130821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130821/)
17. Becker JT, Furman MMR, Panisset M, Smith C (1990). Characteristics of the memory loss of a patient with Wernicke-Korsakoff's syndrome without alcoholism. *Neuropsychologia*, 28:171–179.
18. Wang D, Hazell AS (2010) Microglial activation is a major contributor to neurologic dysfunction in thiamine deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 402:123–8. doi: [10.1016/j.bbrc.2010.09.128](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.128) PMID: [20932820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20932820/)

19. Ji Z, Fan Z, Zhang Y, Yu R, Yang H, Zhou C et al. (2014) Thiamine deficiency promotes T cell infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis: the involvement of CCL2. *J Immunol.* 193:2157–67. doi: [10.4049/jimmunol.1302702](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302702) PMID: [25063874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25063874/)
20. Fujiwara M, Sasakawa S, Itokawa Y, Ikeda K (1964) Affinity of thiamine propyl disulphide-S35 to organs. *J Viaminol (Kyoto)*, 10:79–87.
21. Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth L, Grünekle D (1991) Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann Nutr Metab*, 35:292–296. PMID: [1776825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1776825/)
22. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. (2003) Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 9: 294–299. doi: [10.1038/nm834](https://doi.org/10.1038/nm834) PMID: [12592403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12592403/)
23. Wu S, Ren J (2006) Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF- $\alpha$ . *Neurosci Lett* 394:158–162. doi: [10.1016/j.neulet.2005.10.022](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.022) PMID: [16260089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16260089/)
24. Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W (1998) Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study). *Alcohol Alcohol.* 33:631–638. PMID: [9872352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9872352/)
25. Volvert ML, Seyen S, Piette M, Evrard B, Gangolf M, Plumier RC, et al. (2008) Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol* 8:10. doi: [10.1186/1471-2210-8-10](https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-10) PMID: [18549472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18549472/)
26. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M (2006) Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem* 281: 9307–9313. doi: [10.1074/jbc.M600418200](https://doi.org/10.1074/jbc.M600418200) PMID: [16452468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16452468/)
27. Fujiwara M (1954) Allithiamine: a newly found derivative of vitamin B. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 2, 273–285.
28. Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J (2006) High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 1: 150–156. doi: [10.1152/jappphysiol.00988.2005](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00988.2005)
29. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A (2010) The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res* 61: 482–488. doi: [10.1016/j.phrs.2010.02.008](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.02.008) PMID: [20188835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188835/)
30. Manzardo AM, He J, Poje A, Penick EC, Campbell J, Butler MG (2013) Double-blind, randomized placebo-controlled clinical trial of benfotiamine for severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 133:562–70. doi: [10.1016/j.drugalcdep.2013.07.035](https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.07.035) PMID: [23992649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23992649/)
31. Pan X, Gong N, Zhao J, Yu Z, Gu F, Chen J, et al. (2010) Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. *Brain* 133:1342–51. doi: [10.1093/brain/awq069](https://doi.org/10.1093/brain/awq069) PMID: [20385653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20385653/)
32. Sun XJ, Zhao L, Zhao N, Pan XL, Fei GQ, Jin LR, et al. (2012) Benfotiamine prevents increased  $\beta$ -amyloid production in HEK cells induced by high glucose. *Neurosci Bull.* 28:561–6. doi: [10.1007/s12264-012-1264-0](https://doi.org/10.1007/s12264-012-1264-0) PMID: [22961478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22961478/)
33. Yadav UC, Subramanyam S, Ramana KV (2009) Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2276–82. doi: [10.1167/iovs.08-2816](https://doi.org/10.1167/iovs.08-2816) PMID: [19136698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136698/)
34. Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV (2010) Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med* 48:1423–34. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.031](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.031) PMID: [20219672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20219672/)
35. Shueb M, Ramana KV (2012) Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages. *Free Radic Biol Med* 52:182–190. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.444](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.444) PMID: [22067901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22067901/)
36. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27: 229–37. PMID: [2110186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2110186/)
37. Bajić A, Spasić M, Andjus PR, Savić D, Parabucki A, Nikolić-Kokić A, et al. (2013) Fluctuating vs. continuous exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: the effects on mitochondrial membrane potential, intracellular calcium, and NF- $\kappa$ B in astroglia. *PLoS One* 8:e76383. doi: [10.1371/journal.pone.0076383](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076383) PMID: [24124554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124554/)
38. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387–94. doi: [10.1038/nn1997](https://doi.org/10.1038/nn1997) PMID: [17965659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965659/)
39. Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW (2013) Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmunopharmacol* 8:807–23. doi: [10.1007/s11481-013-9490-4](https://doi.org/10.1007/s11481-013-9490-4) PMID: [23881706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23881706/)

40. Hanisch UK (2013) Functional diversity of microglia—how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci* 7:65. doi: [10.3389/fncel.2013.00065](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00065) PMID: [23717262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23717262/)
41. Abd-El-Basset EM (2000) Bacterial Endotoxin Induces Changes in the Organization and Expression of Actin and Modulation of the Cell Membrane of Microglia. *Med Principles Pract* 9:81–90.
42. Abd-El-Basset EM, Prashanth J, Ananth Lakshmi KVV (2004) Up-Regulation of Cytoskeletal Proteins in Activated Microglia. *Med Princ Pract* 13:325–333. doi: [10.1159/000080469](https://doi.org/10.1159/000080469) PMID: [15467307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15467307/)
43. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, et al. (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21:1975–82. PMID: [11245682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11245682/)
44. Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1–13. PMID: [10594918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10594918/)
45. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75–93. doi: [10.1016/j.niox.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007) PMID: [20438856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20438856/)
46. Minghetti L (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:901–10. PMID: [15453089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15453089/)
47. Patterson H, Nibbs R, McInnes I, Siebert S (2014) Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 176:1–10. doi: [10.1111/cei.12248](https://doi.org/10.1111/cei.12248) PMID: [24313320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24313320/)
48. Hehlgans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1–20. doi: [10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x) PMID: [15819693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15819693/)
49. Park KM, Bowers WJ (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* 22: 977–983. doi: [10.1016/j.cellsig.2010.01.010](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.010) PMID: [20096353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20096353/)
50. Shafer LL, McNulty JA, Young MR (2002) Brain activation of monocyte-lineage cells: involvement of interleukin-6. *Neuroimmunomodulation* 10:295–304. doi: [10.1159/000069973](https://doi.org/10.1159/000069973) PMID: [12759566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12759566/)
51. Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T (1999) Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem* 72: 1466–71. doi: [10.1046/j.1471-4159.1999.721466.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721466.x) PMID: [10098850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10098850/)
52. Seo DR, Kim KY, Lee YB (2004) Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. *Neuroreport* 15:1157–61. PMID: [15129165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15129165/)
53. Huang WC, Lin YS, Wang CY, Tsai CC, Tseng HC, Chen CL, et al. (2009) Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology* 128:e275–e286. doi: [10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x) PMID: [19175796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19175796/)
54. Günzl P, Bauer K, Hainzl E, Matt U, Dillinger B, Mahr B, et al. (2010) Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation. *J Leukoc Biol* 88:1259–69. doi: [10.1189/jlb.0110001](https://doi.org/10.1189/jlb.0110001) PMID: [20884649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20884649/)
55. Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M (2009) MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 292:1902–13. doi: [10.1002/ar.21047](https://doi.org/10.1002/ar.21047) PMID: [19943344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19943344/)
56. Giri S, Rattan R, Singh AK, Singh I (2004) The 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 inhibits the inflammatory response in primary rat astrocytes via down-regulating multiple steps in phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-NF-kappaB-p300 pathway independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 173:5196–5208. doi: [10.4049/jimmunol.173.8.5196](https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.5196) PMID: [15470065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15470065/)
57. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 49–62. PMID: [17183360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17183360/)
58. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87: 10–20. doi: [10.1016/j.brainresbull.2011.10.004](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004) PMID: [22024597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22024597/)
59. Fiebich BL, Lieb K, Engels S, Heinrich M (2002) Inhibition of LPS-induced p42/44 MAP kinase activation and iNOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells. *J Neuroimmunol* 132:18–24. PMID: [12417429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12417429/)
60. Watters J, Sommer J, Pfeiffer Z, Prabhu U, Guerra A, Bertics P (2002) A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 277: 9077–9087. PMID: [11786532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11786532/)
61. Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA (2008) Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* 107: 557–69. doi: [10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x) PMID: [18717813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18717813/)



62. Kim YH, Koh HK, Kim DS (2010) Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF- $\kappa$ B-mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol* 10: 1560–72. doi: [10.1016/j.intimp.2010.09.007](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.09.007) PMID: [20932499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20932499/)
63. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, et al. (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 50: 235–46. PMID: [15739188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15739188/)
64. Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, et al. (2007) Roles of NF-kappaB and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. *Neurosci. Lett* 414: 222–7. PMID: [17284350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17284350/)
65. Ohsawa K, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S (2012) Adenosine A3 receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration. *J Neurochem*. 121: 217–27. doi: [10.1111/j.1471-4159.2012.07693.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07693.x) PMID: [22335470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22335470/)
66. Waetzig V, Herdegen T (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci. Lett* 361:64–7. doi: [10.1016/j.neulet.2004.02.041](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.041) PMID: [15135894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15135894/)
67. Svensson C, Fernaeus SZ, Part K, Reis K, Land T (2010) LPS-induced iNOS expression in Bv-2 cells is suppressed by an oxidative mechanism acting on the JNK pathway—a potential role for neuroprotection. *Brain Res* 1322:1–7. doi: [10.1016/j.brainres.2010.01.082](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.082) PMID: [20138851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20138851/)
68. Zhao H, Cheng L, Liu Y, Zhang W, Maharjan S, Cui Z, et al. (2014) Mechanisms of anti-inflammatory property of conserved dopamine neurotrophic factor: inhibition of JNK signaling in lipopolysaccharide-induced microglia. *J Mol Neurosci* 52: 186–92. PMID: [24078520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24078520/)
69. Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, Dragone T, Iacobazzi F, Panaro AM (2012) The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 858–65. doi: [10.3109/08923973.2012.665461](https://doi.org/10.3109/08923973.2012.665461) PMID: [22397361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22397361/)
70. Kacimi R, Giffard RG, Yenari MA (2011) Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- $\kappa$ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm (Lond)* 8:7. doi: [10.1186/1476-9255-8-7](https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-7)
71. Nam KN, Son MS, Park JH, Lee EH (2008) Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kappaB: neuroprotective implications. *Neuropharmacology* 55:819–25. doi: [10.1016/j.neuropharm.2008.06.065](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.065) PMID: [18657551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657551/)
72. Wen J, Ribeiro R, Zhang Y (2011) Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. *J Neuroinflammation*. 8:38. doi: [10.1186/1742-2094-8-38](https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-38) PMID: [21510893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21510893/)
73. Lee JY, Jhun BS, Oh YT, Lee JH, Choe W, Baik HH, et al. (2006) Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF-kappaB activation in murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett*. 396:1–6. doi: [10.1016/j.neulet.2005.11.004](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.004) PMID: [16324785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16324785/)



# Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells

Iva Bozic<sup>1</sup>, Danijela Savic<sup>1</sup>, Ivana Stevanovic<sup>2</sup>, Sanja Pekovic<sup>1</sup>, Nadezda Nedeljkovic<sup>3</sup> and Irena Lavrnja<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Biological Research "Siniša Stanković," University of Belgrade, Belgrade, Serbia, <sup>2</sup> Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, <sup>3</sup> Faculty of Biology, Institute for Physiology and Biochemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fabio Blandini,  
National Institute of Neurology C.  
Mondino Foundation, Italy

### Reviewed by:

Elsa Fabbretti,  
University of Nova Gorica, Slovenia  
Lei Liu,  
University of Florida, USA

### \*Correspondence:

Irena Lavrnja,  
Institute for Biological Research  
"Siniša Stanković," University of  
Belgrade, Bulevar Despota Stefana  
142, 11060 Belgrade, Serbia  
irenam@ibiss.bg.ac.rs

**Received:** 23 June 2015

**Accepted:** 24 August 2015

**Published:** 04 September 2015

### Citation:

Bozic I, Savic D, Stevanovic I,  
Pekovic S, Nedeljkovic N and Lavrnja I  
(2015) Benfotiamine upregulates  
antioxidative system in activated BV-2  
microglia cells.  
*Front. Cell. Neurosci.* 9:351.  
doi: 10.3389/fncel.2015.00351

Chronic microglial activation and resulting sustained neuroinflammatory reaction are generally associated with neurodegeneration. Activated microglia acquires proinflammatory cellular profile that generates oxidative burst. Their persistent activation exacerbates inflammation, which damages healthy neurons via cytotoxic mediators, such as superoxide radical anion and nitric oxide. In our recent study, we have shown that benfotiamine (S-benzoylthiamine O-monophosphate) possesses anti-inflammatory effects. Here, the effects of benfotiamine on the pro-oxidative component of activity of LPS-stimulated BV-2 cells were investigated. The activation of microglia was accompanied by upregulation of intracellular antioxidative defense, which was further promoted in the presence of benfotiamine. Namely, activated microglia exposed to non-cytotoxic doses of benfotiamine showed increased levels and activities of hydrogen peroxide- and superoxide-removing enzymes—catalase and glutathione system, and superoxide dismutase. In addition, benfotiamine showed the capacity to directly scavenge superoxide radical anion. As a consequence, benfotiamine suppressed the activation of microglia and provoked a decrease in NO and  $\cdot\text{O}_2^-$  production and lipid peroxidation. In conclusion, benfotiamine might silence pro-oxidative activity of microglia to alleviate/prevent oxidative damage of neighboring CNS cells.

**Keywords:** benfotiamine, microglia, LPS, oxidative stress, catalase, glutathione

## Introduction

Neurons are very susceptible to oxidative stress, as a result of great metabolic rate, large oxygen consumption, relatively weak antioxidative defense, low regenerative capacity, and specific cellular geometry (Andersen, 2004; Barnham et al., 2004). Current knowledge of neurological disorders, from ischemia and brain injury to psychiatric disorders and neurodegenerative diseases, indicates that pathological mechanisms involve acute or chronic activation of microglia and resulting overproduction of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) by the cells (Uttara et al., 2009; Rojo et al., 2014). These immune cells of the brain are on the constant patrol for invading pathogens and metabolic, ischemic or traumatic brain damage (Aguzzi et al., 2013; Gertig and Hanisch, 2014). Upon receiving the pathogen- or danger-associated signals, microglia promptly activate, acquire amoeboid morphology, migrate toward the site of damage and release an array of noxious, proinflammatory mediators, such as cytokines, superoxide radical anions (superoxide;

$\cdot\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and nitric oxide (NO) (Block et al., 2007). Although microglial activation aims for removal of potential threats from the damaged tissue, it also harms surrounding healthy tissue via ROS production and lipid peroxidation, which affect structural proteins and enzymes, RNA and DNA, the integrity of membranes, and mitochondrial membrane potential (Li et al., 2013; González et al., 2014). Apart from this, as proliferation and pro-oxidative activity of microglia appear to be propagated by ROS (Jekabsone et al., 2006; Mander et al., 2006), these species potentiate microglial activity in feed-forward manner and exacerbate inflammation (Min et al., 2004; Barger et al., 2007; Rojo et al., 2014). Modulation and suppression of microglia activation has been shown to alleviate symptoms in various neurological conditions that have been related to hyper-reactive microglia, such as brain injury (Roth et al., 2014), multiple sclerosis (Giunti et al., 2014), Alzheimer's disease (Solito and Sastre, 2012), Parkinson's disease (Van der Perren et al., 2015), and amyotrophic lateral sclerosis (Frakes et al., 2014). In order to bring under control oxidative burst exerted by microglia on its surroundings in the CNS, two potential strategies might be applied: (i) direct scavenging/detoxification of ROS; (ii) up/down-regulation of endogenous systems for removal/formation of reactive oxygen species (Kumar et al., 2014; Miljkovic et al., 2015). It is noteworthy that both strategies already offered some promising results. For instance, intracranial application of glutathione (GSH) modulates microglia activity and improves clinical outcomes of brain injury (Roth et al., 2014). Similarly, a novel drug for treatment of multiple sclerosis—dimethyl fumarate, affects ROS and RNS production by microglia via upregulation of intracellular antioxidative system (Wilms et al., 2010; Lin et al., 2011).

Benfotiamine (*S*-benzoylthiamine O-monophosphate) is an *S*-acyl derivative of thiamine (vitamin  $\text{B}_1$ ) (Fujiwara, 1954) and is easily absorbed with good bioavailability and safety profile (Bitsch et al., 1991; Balakumar et al., 2010). Favorable effects of benfotiamine have been already documented in the treatment of diabetic and alcoholic neuropathies (Hammes et al., 2003; Balakumar et al., 2010; Manzardo et al., 2013). Mechanisms of benfotiamine action include antioxidative and anti-inflammatory effects as documented under both, *in vitro* and *in vivo* settings (Ceylan-Isik et al., 2006; Wu and Ren, 2006; Balakumar et al., 2008; Schmid et al., 2008; Schupp et al., 2008; Verma et al., 2010; Harisa, 2013), as well as in patients suffering from diabetes type II (Stirban et al., 2006). We have recently shown that benfotiamine attenuates microglial activation by altering cell morphology and suppressing the production of proinflammatory mediators. These effects were mediated via nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) and MAPK signaling, on which benfotiamine exerted direct effects (Bozic et al., 2015).

Therefore, benfotiamine represents an off-the-shelf agent, whose potential applications might expand to other conditions that are related to microglia "outrage". Here we examined the effects of benfotiamine on pro-oxidative activity of activated BV-2 microglia cells. The focus was on the main components of the endogenous antioxidative system: catalase (CAT), cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutases (SOD1 and SOD2, respectively), along with total glutathione and

enzymes involved in its metabolism, GSH peroxidase (GPx) and reductase (GR).

## Materials and Methods

### Cell Culture and Treatment

BV-2 cell line was derived from primary microglial cells of C57BL/6 newborn mice infected with v-raf/v-myc retrovirus (Blasi et al., 1990). These cells express functional NADPH oxidase (Henn et al., 2009). They were a kind gift from Dr. Alba Minelli from the University of Perugia, Italy. BV-2 microglia was cultured in RPMI 1640 medium (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a humidified incubator with 5%  $\text{CO}_2$ . Upon confluence, cells were collected with 0.1% trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), centrifuged ( $500 \times g$  for 5 min) and seeded in culture dishes, depending on the experiment. Cell were exposed to benfotiamine (50, 100, 250  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich Labware, Munich, Germany) 30 min prior to stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (*Escherichia coli* serotype 026:B6; Sigma-Aldrich Labware, Munich, Germany) for 24 h or as indicated. Treatment with inhibitor of inducible NO synthase (iNOS), *N* $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) was performed 1 h before BV-2 cells were incubated with LPS for 24 h.

### Cell Viability Assay

For MTT test, cells were grown in 96-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well), exposed to benfotiamine and LPS for 24 h, as previously described (Bozic et al., 2015). The test based on a reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan is an indicator of total mitochondrial status of viable cells. Cells were incubated with MTT solution (5 mg/ml) for 30 min at 37°C. Purple crystals of formazan were dissolved in DMSO and absorbance was measured at 492 nm with a microplate reader (LKB 5060-006, Vienna, Austria). The results are expressed as % of mean optical density (OD 492 nm) relative to control  $\pm$  SEM, from three independent determinations performed in triplicate.

### Flow Cytometric Analysis

Cells were seeded in 6-well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) and treated as described. They were detached with 0.1% trypsin-EDTA, centrifuged at  $750 \times g$  for 3 min and washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Subsequently, the cells were stained with FITC-conjugated anti-mouse CD40 antibody or isotype control (1:200, BD Pharmingen) for 1 h at 4°C. BV-2 microglia was spun down, rinsed twice with PBS and analyzed with CyFlow<sup>®</sup> Space Partec (Partec GmbH, Munster, Germany) using PartecFloMax<sup>®</sup> software (Partec GmbH, Munster, Germany). Minimum of 10,000 cells were analyzed and results are presented as % (dot plots) and number (graph) of cells expressing CD40.

For determination of apoptotic and necrotic cell death, cells were incubated with annexin V FITC and propidium iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) for 15 min in

the dark at room temperature (RT). Annexin V binds to phosphatidylserine that is exposed on the outer leaflet of plasma membrane of apoptotic (and at least in some cases necrotic) cells. Propidium iodide is a DNA intercalating agent that can enter only necrotic cells. Thus, cells positive only for annexin V were identified as apoptotic, whereas cells that were positive for propidium iodide and annexin V were recognized as necrotic. The reaction was stopped by centrifuging cells and resuspending them in Annexin Binding Buffer. Analysis was performed at CyFlow<sup>®</sup> Space Partec using PartecFloMax<sup>®</sup> software.

### Radical Generating Systems

Radical-generating systems were prepared as described previously (Miljkovic et al., 2015). The ability of benfotiamine to scavenge hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) was tested using the Fenton system ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ ). The Fenton reaction was performed in PBS (pH = 7.4) by combining 1 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Renal, Budapest, Hungary) and 0.2 mM of  $\text{FeSO}_4$  (Merck, Darmstadt, Germany). Spin trap DEPMPO (5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide; Enzo Life Sciences International, Plymouth Meeting, PA, USA; 10 mM final concentration) was added prior to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The time period between the initiation of reaction and EPR measurements was 2 min. Benfotiamine was supplemented before the initiation of reaction at the final concentration of 1 mM.

Superoxide was generated using  $\cdot\text{O}_2^-$  thermal source SOTS-1 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Immediately prior to the start of any experiment the SOTS-1 was dissolved in DMSO, and was further supplemented to PBS solution containing DEPMPO (10 mM) and DTPA (1 mM; chelating agent, which is added in order to suppress the redox activity of transition metals impurities in  $\cdot\text{OH}$ -generating Haber-Weiss reaction), to a final concentration of 0.2 mM. This system was incubated for 5 min at 37°C. The time period between the end of incubation and EPR measurements was 2 min.

### EPR Spectroscopy

EPR measurements were performed on X-band (9.57 GHz) Varian E104-A EPR spectrometer, using EW software (Scientific Software, Bloomington, IL, US). Settings were: 10 mW, microwave power; 2 G, modulation amplitude; 3410 G, field center; 200 G, scan range; 4 min, scanning time; 100 kHz, modulation frequency; 32 ms, time constant. Samples were drawn into gas-permeable Teflon tubes (internal diameter 0.6 mm; wall thickness 0.025 mm; Zeus industries, Raritan, NJ, USA) to maintain constant oxygen level in the sample, Teflon tubes were placed in quartz capillaries. DEPMPO reacts with  $\cdot\text{OH}$  and  $\cdot\text{O}_2^-$  producing DEPMPO/OH and DEPMPO/OOH adducts, respectively. Signal intensities were determined using spectral simulations, which were conducted using WINEPR SimFonia computer program (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Germany). Simulation parameters were: (i) DEPMPO/OH adduct:  $a\text{N} = 13.64$  G;  $a\text{H} = 12.78$  G;  $a\text{P} = 46.7$  G; (ii) DEPMPO/OOH adduct: isomer I (50%):  $a\text{N} = 13.4$  G,  $a\text{H}_\beta = 11.9$  G,  $a\text{H}_\gamma$  (1H) = 0.8 G,  $a\text{H}_\gamma$  (6H) = 0.43 G,  $a\text{P} = 52.5$  G; isomer II (50%):  $a\text{N} = 13.2$  G,  $a\text{H}_\beta = 10.3$  G,  $a\text{H}_\gamma$  (1H) = 0.9 G,  $a\text{H}_\gamma$  (6H) = 0.43 G,  $a\text{P} = 48.5$  G. Antioxidative activity

(AA) was calculated using the following formula:  $(I_0 - I_x)/I_0$ , where  $I_0$  and  $I_x$  are the intensities of EPR spectra obtained in control and samples with benfotiamine. Maximal AA value is 1.  $EC_{50}$ -value (mM) is the effective concentration at benfotiamine provoked 50% decrease in DEPMPO/OOH yield, obtained by interpolation from linear regression analysis. Each experiment was performed in triplicate. In addition, the rate constant for benfotiamine reaction with superoxide was calculated using previously described method and rate constant for the reaction between DEPMPO and superoxide (approximately  $4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

### Quantitative Real-time PCR

BV-2 microglia was plated (6-well plates,  $3 \times 10^5$  cells/well) and incubated with benfotiamine and LPS. Four hours after the onset of LPS stimulation, cells were collected for total RNA isolation in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA content was quantified spectrophotometrically and the purity was evaluated by running RNA samples on agarose gels. Reverse transcription was conducted with 1  $\mu\text{g}$  of RNA, with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for real-time PCR analysis, with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and specific primers for CAT, SOD2 and GPx (sequences and annealing temperatures given in **Table 1**, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Relative expression of target genes was evaluated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method, with  $\beta$ -actin as internal control.

### Western Blot

Western blot analysis was performed as previously described (Bozic et al., 2015). Briefly, after treatment cells were lysed, samples were centrifuged and protein content was determined. Equal amounts of total cellular proteins were loaded per lane of 10% (for analysis of SOD2 and GPx) and 7.5% (for analysis of CAT and GR) polyacrylamide gels. Proteins were resolved at constant voltage (100–120 V) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) support membrane (Roche, Penzberg, Germany). Support membranes were blocked with the blocking solution (5% BSA dissolved in TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at RT to eliminate unspecific binding. Membranes were incubated overnight with primary antibodies (**Table 2**), washed 3 times for 10 min with TBST and incubated with secondary antibodies for 1 h at RT. Chemiluminescence was used to visualize antibody binding. Protein bands were analyzed using ImageQuant 5.2 software, by determining optical density of the band and normalizing it to the optical density of  $\beta$ -actin from the same lane. Results are expressed as mean relative target protein/ $\beta$ -actin abundance  $\pm$  SEM, from three separate determinations.

### Determination of Parameters Involved in Cell Oxidative State

BV-2 cells were plated (6-well plates,  $3 \times 10^5$  cells/well) and stimulated for 24 h as described. Cells were rinsed with ice

**TABLE 1 | List of primers used for Real-time PCR.**

Target gene	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Annealing T (°C)
CAT	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	TCCGCTCTGTCAAAGTGTG	181	64
MnSOD	CAGACCTGCCTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGT	113	64
GPx	AGTCCACCGTGTATGCCTTCT	GAGACGGACATTCTCAATGA	105	64
Actin	GGGCTATGCTCTCCCTCAC	GATGTCACGCACGATTTC	136	63

**TABLE 2 | List of primary antibodies used for flow cytometry (FC) and western blot (WB).**

Antigen	Source	Dilution	Company
CD40	mouse	1:200 (FC)	BD Pharmingen
CAT	Rabbit	1:5000 (WB)	Abcam
GPx	Rabbit	1:5000 (WB)	Abcam
MnSOD	Rabbit	1:5000 (WB)	Abcam
GR	Rabbit	1:5000 (WB)	Abcam

cold PBS and collected with a cell scraper. Cells were lysed by sonication and centrifuged at  $15,000 \times g$  for 5 min, at 4°C. Supernatants were collected and used for determination of  $\cdot O_2^-$ , malondialdehyde (MDA) and total glutathione (reduced + oxidized) and activity of enzymes involved in antioxidative defense, SOD2, CAT, GPx, and GR. The protein content was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

### Measurement of NO Production

BV-2 microglia was seeded in 24-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well), and treated as described. Culture medium was collected, deproteinized and concentration of NO was evaluated by measuring nitrite and nitrate concentrations. Griess method was used to determine the nitrite content. Griess reagent was made of 1.5% sulfanilamide (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in 1 M HCl and 0.15% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Fluka, Buchs, Switzerland) in distilled water. Nitrates were first transformed into nitrites by cadmium reduction (Navarro-González et al., 1998). Concentration of nitrites released in the medium was determined from the standard curve generated with known concentrations of sodium nitrite (Mallinckrodt Chemical Works—St. Louis, MO, USA). Results are expressed as mean concentration of nitrites ( $\mu M$ )  $\pm$  SEM, from three separate determinations.

### Superoxide Anion Radical

Concentration of  $\cdot O_2^-$  was evaluated with the method based on the reduction of nitroblue-tetrazolium—NBT (Sigma-Aldrich—Sr. Louis, USA) to monoformazan by  $\cdot O_2^-$  in the alkaline nitrogen saturated medium. The product of this reaction is yellow and was measured spectrophotometrically at 550 nm (Auclair and Voisin, 1985). The results are expressed as mean reduced NBT (relative to control—100%)  $\pm$  SEM, from three separate determinations performed in duplicate.

### Malondialdehyde (MDA)

Spectrophotometric method of Villacara et al. (1989) was used for determination of MDA concentration. MDA gives a red product after incubation with thiobarbituric acid (TBA) reagent (15% trichloroacetic acid and 0.375% TBA, water solution, Merck—Darmstadt, Germany), at 95°C and pH 3.5. Absorbance was measured at 532 nm. The results were expressed as mean MDA concentration (nmol/ml)  $\pm$  SEM, from three separate determinations, performed in duplicate.

### Total Glutathione

DTNB-GSSG reductase recycling assay was used for determination of total glutathione content. The rate of formation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNBA), corresponding to total concentration of glutathione, was measured at 412 nm (Anderson, 1986). The results are expressed as mean concentration of glutathione (nmol/ml)  $\pm$  SEM, from three separate measurements performed in duplicate.

### Superoxide Dismutase Activity

Total SOD activity, which combines the activity of two SOD isoforms, cytoplasmic SOD1 (Cu,ZnSOD) and mitochondrial SOD2 (MnSOD), was evaluated by the epinephrine method. Activity of SOD (EC 1.15.1.1.) was assayed as inhibition of spontaneous autooxidation of epinephrine (Sigma-Aldrich—St. Louis, USA), by measuring absorbance at 480 nm. The kinetics of enzyme activity was followed in a carbonate buffer (50 mM, pH 10.2, containing 0.1 mM EDTA, Serva, Feinbiochemica—Heidelberg, New York), after the addition of 10 mM epinephrine and 5 mM KCN for MnSOD isoform (Sun and Zigman, 1978). The results were expressed as units per milligram of protein. One unit is defined as an amount of protein (enzyme) required for 50% of auto oxidation of epinephrine.

### Catalase Activity

CAT activity was determined by a method based on spectrophotometric determination (405 nm) of colored complex formed between ammonium molybdate and  $H_2O_2$  (Góth, 1991). Unit of CAT activity is defined as the amount of  $H_2O_2$  reduced per minute ( $\mu mol H_2O_2/min$ ). Data are expressed as mean CAT activity (units/mg protein)  $\pm$  SEM; from three separate determinations performed in duplicate.

### Glutathione Peroxidase Activity

Activity of GPx is measured by indirect spectrophotometric determination of the GPx-mediated NADPH consumption (340 nm), as previously described (Maral et al., 1977; Djukic et al.,

2012). The results are expressed as miliunits per milligram of protein.

### Glutathione Reductase Activity

Method for determining the activity of the GR is based on the ability of GR to catalyze the reduction of GSSG to GSH by the oxidation of the coenzyme NADPH to NADP<sup>+</sup> (Freifelder, 1976). In the reaction as standard we used 100 mmol NADP<sup>+</sup>. The unit of enzyme activity is defined as number of micromols of NADPH oxidized per minute ( $\mu\text{mol NADPH}$ ). The results were expressed as mean GR activity (mU/mg protein)  $\pm$  SEM, from *n* separate determinations performed in duplicate.

### Measurement of Intracellular ATP

Intracellular ATP was extracted from BV-2 cells with boiling water, as described previously (Yang et al., 2002). Medium was removed and boiling water was added to cells, which were quickly scraped to obtain cell suspensions. Cell suspensions were boiled for 10 min and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min, at 4°C. Supernatants were used for immediate determination of ATP by bioluminescent assay kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), according to the manufacturer's instruction. Samples were incubated with the assay mix containing luciferin and luciferase and the luminescence intensity proportional to ATP content was measured with luminometer (CHAMELEON<sup>TM</sup>V, Hidex, Turku,

Finland). ATP standard curve was constructed for determination of ATP concentration in samples. Results are expressed as nmols of ATP per mg of protein.

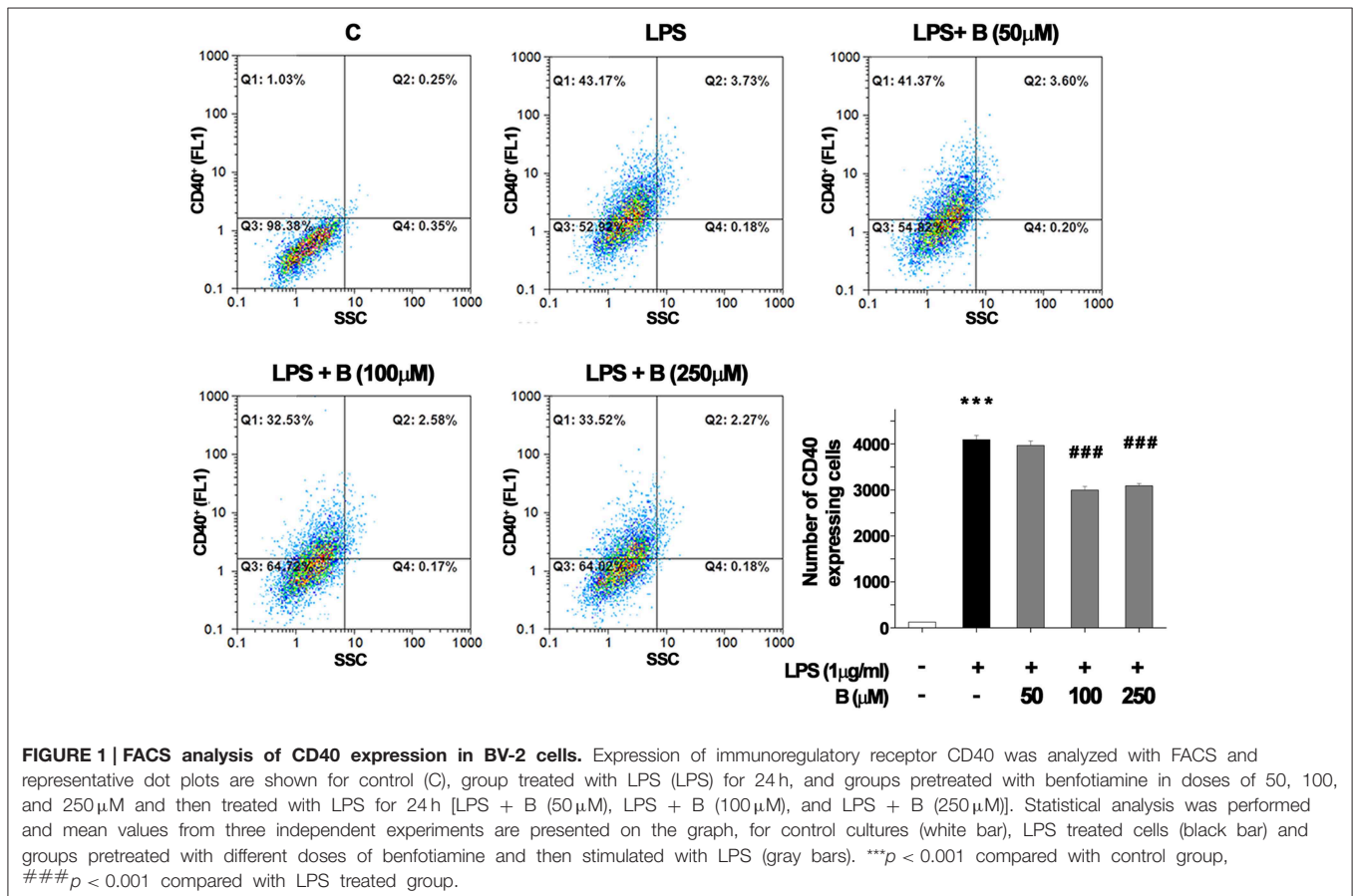
### Statistical Analysis

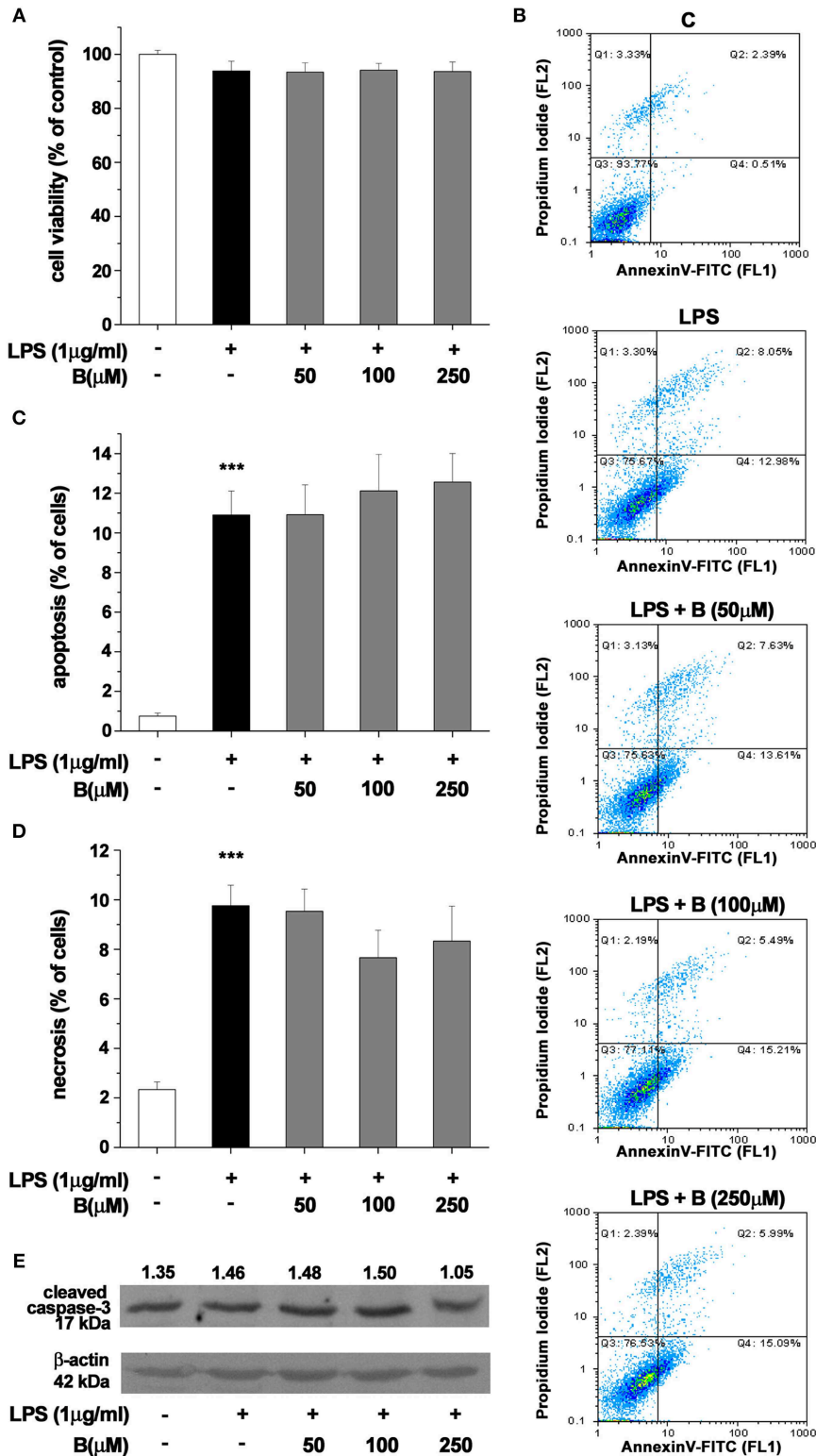
Results are expressed as mean values  $\pm$  SEM. To assess statistical significance in all experiments, experiments were performed in duplicate or triplicate determinations using three separate cell preparations. Statistical analysis was completed with GraphPad Prism software. Data were analyzed using One-Way ANOVA (except data for ATP, which were analyzed using Two-Way ANOVA) with Bonferroni *post-hoc* analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

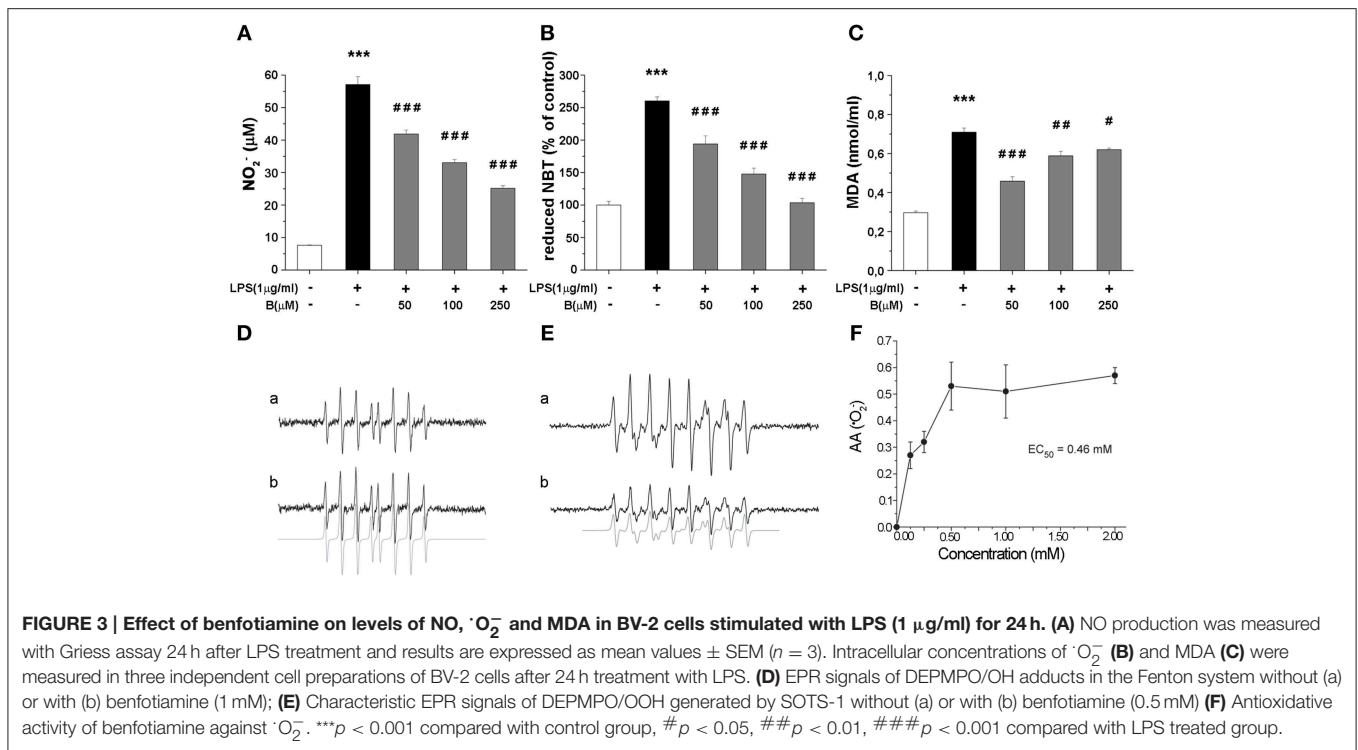
### Benfotiamine Suppresses LPS-induced CD40 Expression in BV-2 Cells

CD40 expression by BV-2 cells was used as an indicator of microglial activation (Qin et al., 2005). In control BV-2 cells constitutive expression of surface CD40 was low, and only about 100 per 10,000 cells analyzed by FACS expressed CD40 receptor (Figure 1). Treatment with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h upregulated the expression of CD40 by approximately 40% (4000 cells were positive for CD40). Pretreatment of BV-2 cells with 100 and





**FIGURE 2 | Effect of benfotiamine on viability and apoptotic and necrotic cell death of LPS (1 µg/ml) stimulated BV-2 cells.** Cell viability was evaluated with MTT assay, 24 h after treatment with LPS (A). FACS analysis of apoptotic and necrotic cell death was performed with FITC labeled annexin V and propidium iodide (B). Apoptotic cells were labeled with annexin V, whereas necrotic cells were positive for both annexin V and propidium iodide. Percentage of apoptotic (C) and necrotic (D) cells was determined from three independent cell preparations. \*\*\**p* < 0.001 compared with control group. Activation of caspase-3 was assessed with western blotting for active caspase-3 fragment (E). Representative blot from three independent experiments is shown. Band intensity was analyzed, compared to β-actin of the same lane and results are expressed in arbitrary units.



250  $\mu\text{M}$  benfotiamine significantly decreased the number of CD40 expressing cells to 3000 ( $p < 0.001$ ). The results indicate that benfotiamine influence on activated BV-2 cells involves expression of CD40.

### Benfotiamine Does Not Affect Viability of LPS-activated BV-2 Cells

Effect of benfotiamine pretreatment on BV-2 cells' state was determined using MTT assay and Annexin V/propidium iodide FACS analysis after 24 h treatment with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Benfotiamine did not change total mitochondrial activity of LPS-stimulated BV-2 cells, as deduced from stable MTT values (Figure 2A). Annexin V/PI FACS analysis (Figure 2B) demonstrated, however, that LPS caused modest increase in the proportion of apoptotic (about 11% of cells, Figures 2B,C) and necrotic (approximately 10% of cells, Figures 2B,D) cells in cultures. Importantly, benfotiamine did not significantly affect the viability of LPS-stimulated cells (Figure 2). The finding was further substantiated by immunoblot analysis of active fragment of caspase-3. A slight increase in caspase-3 expression was observed in LPS stimulated cells, whereas benfotiamine showed no such effects (Figure 2E). Furthermore, the treatments did not affect cell proliferation (Figure S2).

### Benfotiamine Decreases Production of NO, $\cdot\text{O}_2^-$ , and MDA

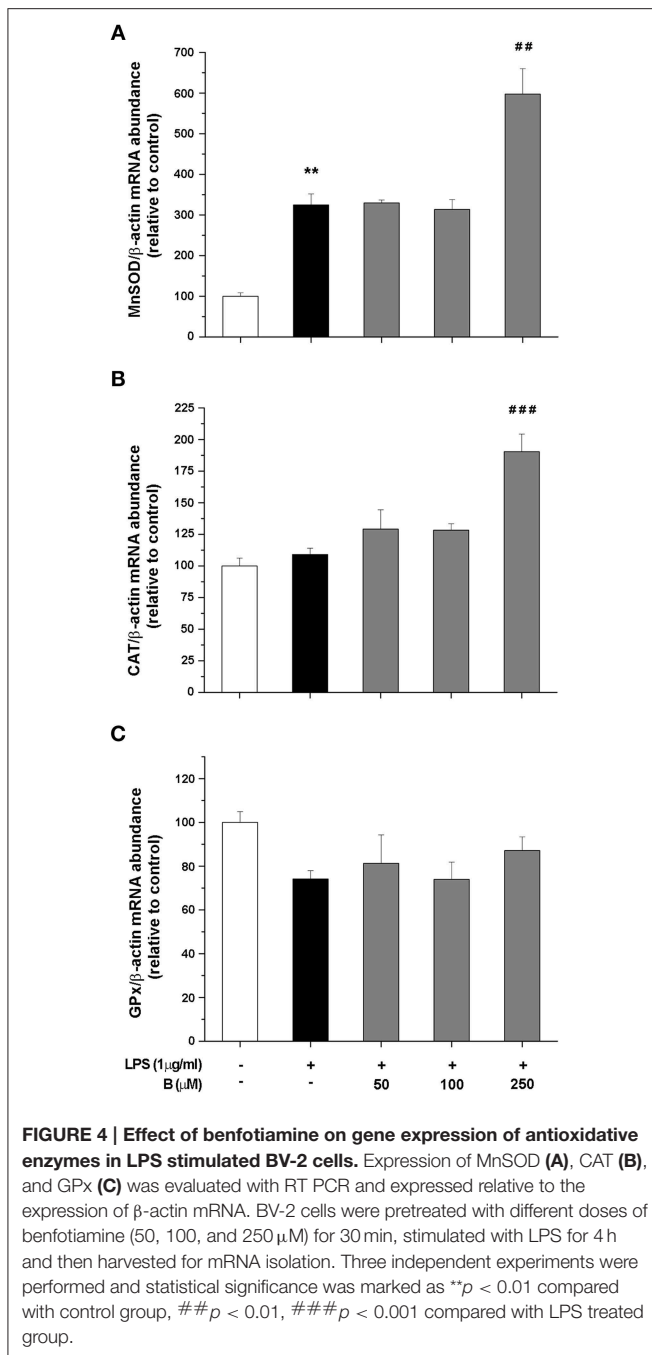
Production of NO and intracellular content of superoxide anions ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) and MDA were determined as they represent critical indicators of oxidative stress. LPS stimulation (1  $\mu\text{g/ml}$ , 24 h) resulted in several fold increase of levels of NO,  $\cdot\text{O}_2^-$

and MDA (Figures 3A–C). Benfotiamine pretreatment (30 min prior to LPS) suppressed NO release (Figure 3A) in a dose-dependent manner ( $p < 0.001$ ). Concentration of  $\cdot\text{O}_2^-$  was increased 2.5-fold with LPS stimulation (Figure 3B). This was suppressed by pretreatment with benfotiamine, which, at 250  $\mu\text{M}$  dose returned  $\cdot\text{O}_2^-$  content to control levels ( $p < 0.001$ ). Furthermore, benfotiamine substantially downgraded LPS-induced lipid peroxidation (Figure 3C) at all examined doses. In the presence of benfotiamine the yield of DEPMPO/OH adduct was slightly increased (about 10%) compared to control system (Figure 3D). This implies a modest pro-oxidative activity of benfotiamine, probably via  $\text{Fe}^{3+}$  reduction. On the other hand, benfotiamine significantly affected generation of  $\cdot\text{O}_2^-$  (Figure 3E) at concentrations corresponding to those applied in experiments on microglia (Figure 3F). It was estimated that the rate constant for the reaction between benfotiamine and  $\cdot\text{O}_2^-$  was  $68 \pm 19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . These data together imply that benfotiamine exhibits significant antioxidative activity in BV-2 cells.

### Benfotiamine Modulates Expression of Enzymes Involved in Antioxidative Defense

To shed more light on possible mechanism of antioxidative actions of benfotiamine, we further determined gene expression levels for SOD2, CAT, and GPx by qRT-PCR. These enzymes constitute essential part of antioxidative cellular defense, since SOD2 dismutates  $\cdot\text{O}_2^-$  to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , while CAT and GPx convert  $\text{H}_2\text{O}_2$  to water. BV-2 cells were pretreated with benfotiamine and the mRNA content was determined 4 h after LPS stimulation (Figure 4). SOD2 gene expression was promoted three-fold by





LPS, while benfotiamine, at its highest concentration, induced even higher increase ( $p < 0.01$ , **Figure 4A**). On the other hand, while LPS alone did not affect expression of CAT gene, 250  $\mu$ M benfotiamine induced 2-fold increase in the CAT-mRNA abundance compared to LPS group ( $p < 0.001$ , **Figure 4B**). Finally, no significant effects on GPx-mRNA were observed (**Figure 4C**). Taken together, these results suggest that antioxidative actions of benfotiamine may be partly mediated via induction of antioxidative enzyme genes, including SOD2 and CAT.

## Benfotiamine Upregulates Protein Expression of Antioxidative Defense Enzymes

Expression of antioxidative enzymes SOD2, CAT, GPx, and GR was further evaluated at the protein level by Western blot analysis (**Figure 5**). Among the antioxidative enzymes tested, LPS affected only protein expression of CAT (**Figure 5B**). Benfotiamine, however, induced significant effects on SOD2 ( $p < 0.001$ , **Figure 5A**) and CAT protein expression ( $p < 0.05$ , **Figure 5B**). No changes in the protein expression of GPx and GR were observed (**Figures 5C,D**, respectively).

## Benfotiamine Enhances the Activity of Antioxidative Enzymes and Increases Glutathione Content in BV-2 Cells

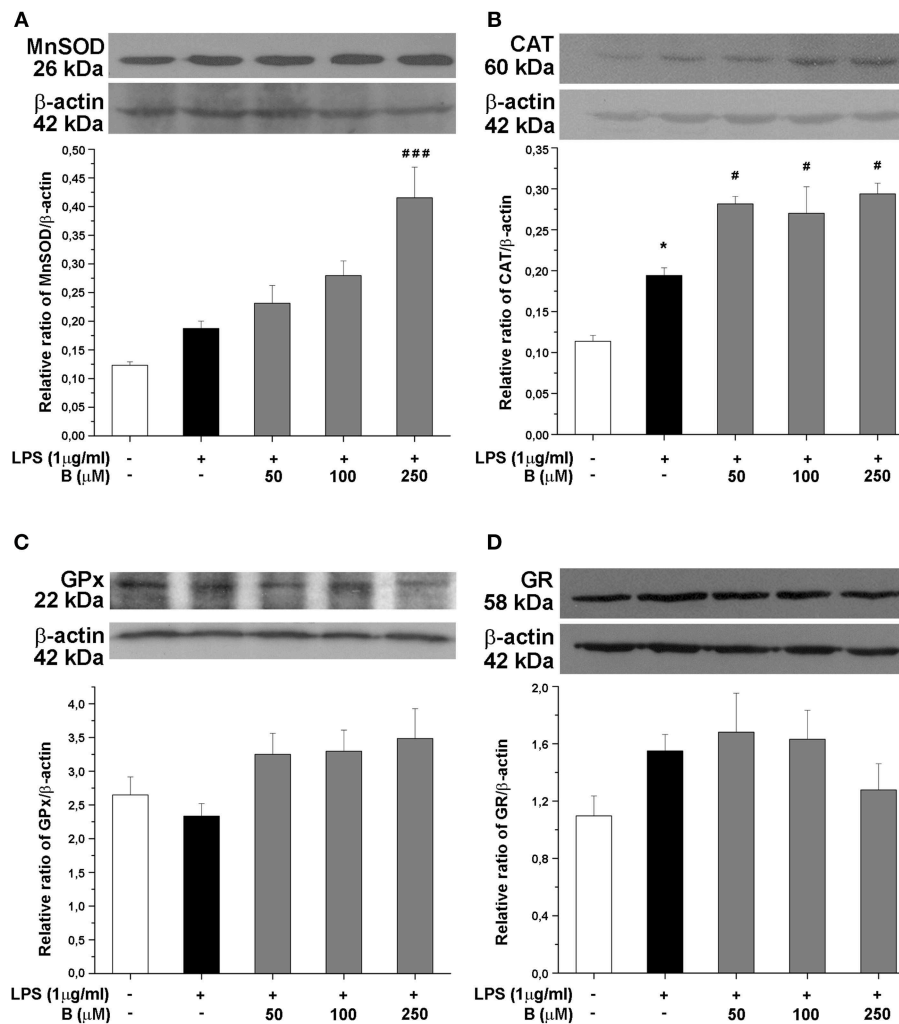
Antioxidative potential of benfotiamine in BV-2 cells was further analyzed in terms of antioxidative enzymes activity and intracellular content of total glutathione, main non-enzymatic antioxidant in microglia. The cells were pretreated with benfotiamine in 50, 100, and 250  $\mu$ M dose for 30 min and then stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 h. Activity of MnSOD increased upon LPS stimulation, whereas it was not affected by benfotiamine (**Figure 6A**). On the contrary, activity of Cu,ZnSOD was not affected by LPS while it was doubled by pretreatment with 250  $\mu$ M benfotiamine ( $p < 0.01$ , **Figure 6B**). CAT activity (**Figure 6C**) was substantially inhibited in cells treated with LPS (from 10 U/mg in control cells to 4 U/mg in LPS treated group,  $p < 0.001$ ). Benfotiamine induced dose-dependent increase reaching the control CAT activity at the highest concentration (approximately 9 U/mg,  $p < 0.001$ ). Benfotiamine had no effect on CAT activity in non-stimulated cells (**Figure S1A**). The inhibition of iNOS ameliorated the inhibitory effects of LPS stimulation on CAT activity (**Figure S1B**). GPx activity was not affected by LPS stimulation nor benfotiamine treatment (**Figure 6D**). Activity of GR decreased after LPS stimulation and slightly increased after the benfotiamine pretreatments (**Figure 6E**). Finally, total glutathione content was substantially decreased in the microglial cells stimulated with LPS (**Figure 6F**). This was annihilated by benfotiamine which provoked a significant increase compared to control values.

## Benfotiamine Increases Intracellular ATP Content

Intracellular ATP level was measured in BV-2 cells at three time points (1, 4, and 24 h) after LPS stimulation (**Figure 7**). In cells treated with LPS, intracellular ATP content was higher compared to control levels 4 h after the treatment and remained higher 24 h later. Pretreatment with 250  $\mu$ M benfotiamine induced an increase of ATP content at 1 h after the LPS stimulation. Increased level remained increased 24 h later. The effects of LPS and benfotiamine peaked at 4 h.

## Discussion

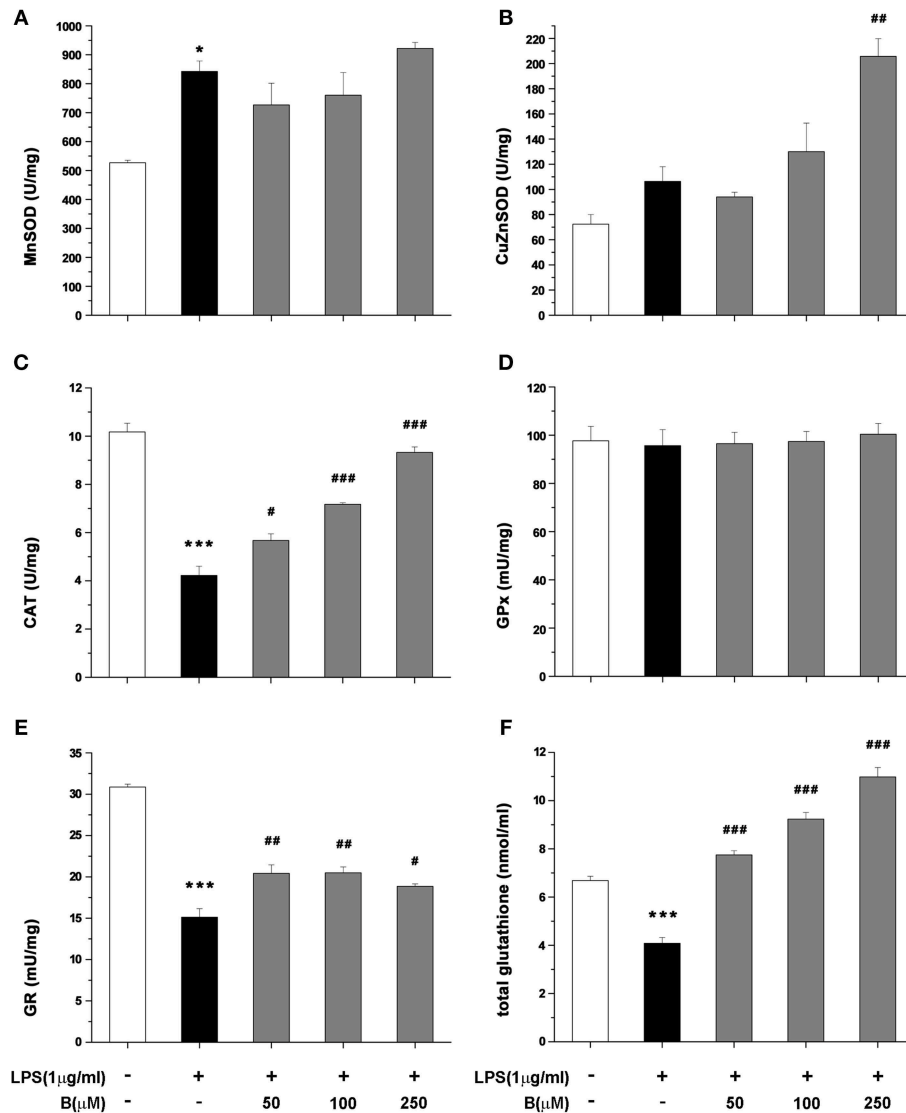
Activated microglia undergoes transformation which involves morphological changes, induction of surface markers, increased production of various proinflammatory cytokines and acquisition of cellular profile that generates oxidative burst



**FIGURE 5 | Effect of benfotiamine on protein expression of antioxidative enzymes in LPS treated BV-2 cells.** Protein expression of MnSOD (A), CAT (B), GPx (C), and GR (D) was evaluated with western blotting, 24 h after LPS treatment. Representative blots from three independent experiments are shown. Protein bands were analyzed with Image Quant 5.2 software, compared to β-actin of the same lane and results in graphs are expressed as percentage of control group. \**P* < 0.05 compared with control group, #*p* < 0.05, ###*p* < 0.001 compared with LPS treated group.

(Block and Hong, 2005; Bordt and Polster, 2014). Pertinent to the latter, activated microglia releases ROS and RNS, such as  $\cdot\text{O}_2^-$  and NO (as shown here) via NADPH oxidase activity (on membrane) and inducible NO synthase—iNOS (intracellular), respectively (Dringen, 2005). Such setup limits the production of highly dangerous peroxynitrite ( $\cdot\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$ ) in the extracellular fluid, thus targeting outer targets (such as pathogens), but simultaneously protecting microglia from self-inflicting damage. Self-protection of activated microglia is also effectuated by significant induction of intrinsic antioxidative system. Our data confirm increased expression of CAT and SOD2 and increased SOD2 activity in LPS activated microglia which is in agreement with previously reported data (Dringen, 2005). Increased expression of CAT contribute to the efficient removal of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which permeates cell membrane, after being produced by extracellular dismutation of  $\cdot\text{O}_2^-$  (Gao et al., 2003). The

observed increase in the level of mRNA and enzymatic activity of SOD2 is most likely related to increased mitochondrial activity (and number) in activated microglia (Park et al., 2013). Increased demands for energy production in LPS activated microglia is met through enhanced ATP synthesis which requires the acceleration of electron transfer chain. Under such conditions, electron leak and  $\cdot\text{O}_2^-$  generation in mitochondria are promoted and this is mitigated through higher activity of SOD2 (Bordt and Polster, 2014). Increased SOD1 activity (this SOD is mainly located in the cytosol), might be a response to increased cyclooxygenase-2 activity in activated microglia (Siomek, 2012). This enzyme has  $\cdot\text{O}_2^-$  as a by-product (Marnett et al., 1999). Interestingly, CAT showed increased levels but lower activities in activated microglia compared to resting cells. This implies inhibition. Pertinent to this, CAT is reversibly inhibited by NO (Brown, 1995), whereas GR is inhibited by  $\text{ONOO}^-$  (Francescutti et al., 1996).



**FIGURE 6 | Effect of benfotiamine on activity of antioxidative enzymes and total glutathione content in LPS treated BV-2 cells.** Activity of MnSOD (A), Cu,ZnSOD (B), CAT (C), GPx (D), GR (E), and total glutathione content (F) was analyzed in BV-2 cells following LPS treatment for 24 h. The results of activity of antioxidative enzymes are expressed as mean specific activities (U/mg)  $\pm$  SEM from three independent cell preparations. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with control group, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared with LPS treated group.

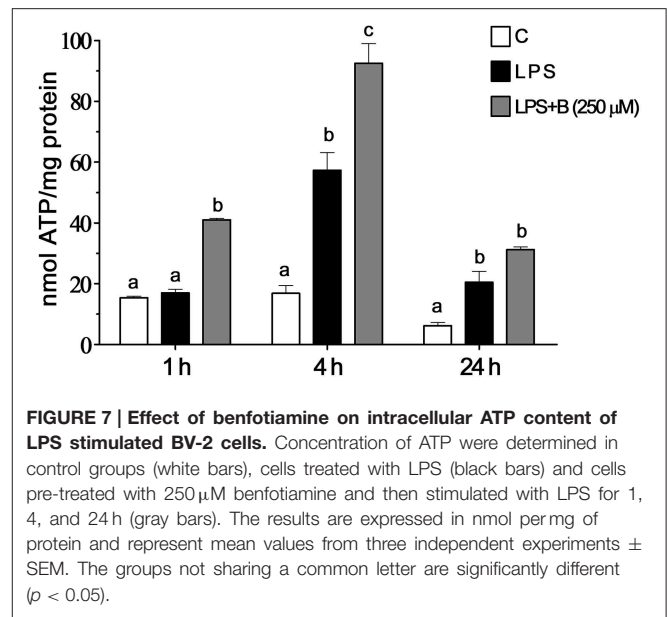
Benfotiamine modulates oxidative activity but does not kill microglia, which is a preferred way of action for drugs targeting hyper-active microglia in neurological conditions (Uttara et al., 2009; Luo et al., 2010; Roth et al., 2014). Thiamine, a benfotiamine metabolite, enters the CNS, as shown using high performance liquid chromatography which has demonstrated higher thiamine concentration in the brain after oral administration of benfotiamine in mice. Beneficial effects of benfotiamine on mouse model of Alzheimer's disease have been attributed to both benfotiamine and thiamine (Pan et al., 2010). Benfotiamine decreases the expression of CD40, a protein that determines antigen presenting ability of microglia and

activation of NF- $\kappa$ B signaling (Kim et al., 2002; Kraft and Harry, 2011; Morgan and Liu, 2011). CD40 has an important role in neuroinflammatory diseases and abnormal expression of CD40 and its ligand CD154 has been shown in Alzheimer's disease (Calingasan et al., 2002; Giunta et al., 2010), multiple sclerosis (Gerritse et al., 1996), and HIV-1 associated dementia (D'Aversa et al., 2002). Considering that activation of CD40 receptor in microglia leads to expression of iNOS and production of TNF- $\alpha$  (Jana et al., 2001, 2002) and other proinflammatory molecules (Chen et al., 2006), benfotiamine's ability to suppress CD40 expression can alleviate inflammation in neurological disorders. Benfotiamine also exhibits strong antioxidative

abilities and suppresses oxidative burst. It decreased NO and  $\cdot\text{O}_2^-$  production and lipid peroxidation of microglial membrane. The potency of benfotiamine to inhibit lipid peroxidation and  $\cdot\text{O}_2^-$  overproduction has been observed previously in murine kidney exposed to cisplatin and endothelium exposed to nicotine (Balakumar et al., 2008; Harisa, 2013). Benfotiamine induced fall in NO production is most likely caused by down-regulation of iNOS expression due to suppressed NF $\kappa$ B signaling in benfotiamine-treated microglia (Bozic et al., 2015). The effects on  $\cdot\text{O}_2^-$  production might be based upon the capacity of benfotiamine to directly scavenge this radical, but also on its inhibitory effects on the activity of NF $\kappa$ B, which is involved in the expression of NADPH oxidase (Morgan and Liu, 2011; Siomek, 2012). However, the most important finding here is that benfotiamine upregulated the intracellular antioxidative system, thus increasing the capacity of activated microglia to buffer the excessive production of ROS.

Namely, in the presence of benfotiamine, microglial cells showed increased levels of CAT and SOD2 mRNA, increased amounts of CAT and SOD2, and increased activity of CAT, GR, and SOD1. Benfotiamine-provoked increase of CAT activity showed dose-dependency. The effect is reciprocally proportional to the level of NO production. Hence, increased CAT activity can be attributed to benfotiamine-provoked decrease in the production of NO (CAT inhibitor), as well as to the stimulation of CAT expression. Of note, in the previous report we have applied a less sensitive Griess protocol (no  $\text{NO}_3^-$  reduction) which allowed for benfotiamine-provoked suppression of NO to be observed, but dose-dependency was unnoticed (Bozic et al., 2015). The level of GR was not significantly increased in benfotiamine-treated cells, but its activity was increased. This implies that benfotiamine ameliorated the inhibition of GR, which is provoked by NO derivative—ONOO $^-$ . The production of both, NO and ONOO $^-$  in activated microglia are based on iNOS activity (Kumar et al., 2014; Bozic et al., 2015). It is important to point out that NO and ROS production are intertwined. For example,  $\text{H}_2\text{O}_2$  activates NF $\kappa$ B activity and hence promotes the expression of iNOS (Andrades et al., 2011). It appears that benfotiamine might initiate a feedback loop that has the silencing of pro-oxidative activity of activated microglia as a result. In brief, benfotiamine provokes an increase in the level of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -removing enzyme—CAT, which should result in lower NF $\kappa$ B activity and iNOS levels, as we reported previously (Bozic et al., 2015). This further leads to lower NO levels, and to de-inhibition of CAT. This is implied by the fact that iNOS inhibition by L-NAME led to increased CAT activity in LPS stimulated cells. Of note, peroxynitrite irreversibly inhibits GR, which most likely accounts for the modest effects of benfotiamine on this enzyme as compared to the effects on CAT activity. Finally, this loop might be involved in benfotiamine-provoked suppression of microglia activation (lower CD40, proinflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and IL-6), since it is known that ROS can amplify microglia inflammatory response (Mander et al., 2006).

Increased SOD2 expression and ATP levels imply that benfotiamine promotes mitochondrial activity/number. One



potential mechanism is that benfotiamine activates some xenobiotic-like response. The removal of xenobiotics requires energy, and they have been shown to promote expression of SOD2 (Curtis et al., 2007). In addition, benfotiamine upregulated glutathione system. The total glutathione was increased 2- to 3-fold in activated microglia exposed to benfotiamine. This major change may only come from *de novo* synthesis of glutathione (Lu, 2009). Such response is common in handling xenobiotics and reactive molecules in CNS (Valdovinos-Flores and Gonsebatt, 2012; Zhang et al., 2013). Benfotiamine actions fall under a relatively novel strategy in antioxidative therapy which employs hormesis i.e., exposure to one stressor increases resistance to another stressor (Gems and Partridge, 2008). Namely, drugs, such as dimethyl fumarate or ethyl pyruvate (Wilms et al., 2010; Miljkovic et al., 2015), or natural products, such as polyphenols and other mildly stressful compounds (Talalay et al., 2003; Moskaug et al., 2005) activate antioxidative system, which then protects the cell from oxidative stress that is inflicted by other sources/processes. In the present case, benfotiamine-mediated stimulation of antioxidative system is more important for increasing the capacity of microglia to buffer oxidative burst than for protecting microglia *per se*. In conditions where no real threat (such as infection agents) is present, and microglia enters hyper-reactive state as a side-reaction to some pathological processes, benfotiamine might silence pro-oxidative activity of microglia to alleviate/prevent oxidative damage on neighboring CNS cells.

Our results open the possibility for benfotiamine application in neurodegenerative conditions which show hyper-reactive microglia, such as Alzheimer's, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis or multiple sclerosis. Further research on animal model studies are warrant in order to evaluate benfotiamine capacity to mitigate the microglial component of pathology of neurological diseases.

## Funding

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No. III41014.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IL, IB, NN. Performed the experiments: IB, DS, IS. Analyzed the data: IL, IB, DS, SP. Contributed to the writing of the manuscript: IL, IB, NN, SP.

## Acknowledgments

The authors want to thank Dr. Ivan Spasojević from Department of Life Sciences, Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Serbia for performing EPR spectroscopy and valuable discussion of the results.

## References

- Aguzzi, A., Barres, B. A., and Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339, 156–161. doi: 10.1126/science.1227901
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* 5, S18–S25. doi: 10.1038/nrn1434
- Anderson, M. E. (1986). "Tissue glutathione," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed R. A. Greenwald (Boca Raton, FL: CRC Press), 317–323.
- Andrades, M. É., Morina, A., Spasic, S., and Spasojevic, I. (2011). Bench-to bedside review: sepsis - from the redox point of view. *Crit. Care* 15, 230. doi: 10.1186/cc10334
- Auclair, C., and Voisin, E. (1985). "Nitroblue tetrazolium reduction," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed R. A. Greenwald (Boca Raton, FL: CRC Press), 123–132.
- Balakumar, P., Rohilla, A., Krishan, P., Solairaj, P., and Thangathirupathi, A. (2010). The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol. Res.* 61, 482–488. doi: 10.1016/j.phrs.2010.02.008
- Balakumar, P., Sharma, R., and Singh, M. (2008). Benfotiamine attenuates nicotine and uric acid-induced vascular endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacol. Res.* 58, 356–363. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.012
- Barger, S. W., Goodwin, M. E., Porter, M. M., and Beggs, M. L. (2007). Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 101, 1205–1213. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04487.x
- Barnham, K. J., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3, 205–214. doi: 10.1038/nrd1330
- Bitsch, R., Wolf, M., Möller, J., Heuzeroth, L., and Grünekle, D. (1991). Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann. Nutr. Metab.* 35, 292–296. doi: 10.1159/000177659
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., and Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* 27, 229–237. doi: 10.1016/0165-5728(90)90073-V
- Block, M. L., and Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
- Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69. doi: 10.1038/nrn2038
- Bordt, E. A., and Polster, B. M. (2014). NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radic. Biol. Med.* 76, 34–46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.033

## Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00351>

**Figure S1 | CAT activity—effect of benfotiamine in basal conditions and effect of iNOS inhibitor (L-NAME).** Activity of CAT was determined 24 h after treatment with benfotiamine (50, 100 and 250  $\mu$ M) in the absence of LPS stimulation (A). CAT activity was examined in BV-2 cells treated with L-NAME (500  $\mu$ M) for 1 h and then stimulated with LPS for 24 h (B). The results are expressed as mean specific activities (U/mg)  $\pm$  SEM from three independent cell preparations. \*\*\* $p$  < 0.001 compared with control group, ### $p$  < 0.001 compared with LPS treated group.

**Figure S2 | Effect of benfotiamine and LPS treatment on BV-2 cell proliferation.** BV-2 cells were treated with benfotiamine (250  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml) or their combination for 24 h, stained with Ki-67 antibody and analyzed with FACS. Representative dot plots are shown. Statistical analysis was performed and mean values from three independent experiments are presented on the graph.

- Bozic, I., Savic, D., Laketa, D., Bjelobaba, I., Milenkovic, I., Pekovic, S., et al. (2015). Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. *PLoS ONE* 10:e0118372. doi: 10.1371/journal.pone.0118372
- Brown, G. C. (1995). Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 232, 188–191. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20798.x
- Calingasan, N. Y., Erdely, H. A., and Altar, C. A. (2002). Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol. Aging* 23, 31–39. doi: 10.1016/S0197-4580(01)00246-9
- Ceylan-Isik, A. F., Wu, S., Li, Q., Li, S. Y., and Ren, J. (2006). High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Appl. Physiol.* 1, 150–156. doi: 10.1152/jappphysiol.00988.2005
- Chen, K., Huang, J., Gong, W., Zhang, L., Yu, P., and Wang, J. M. (2006). CD40/CD40L dyad in the inflammatory and immune responses in the central nervous system. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 163–169.
- Curtis, C., Landis, G. N., Folk, D., Wehr, N. B., Hoe, N., Waskar, M., et al. (2007). Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. *Genome Biol.* 8:R262. doi: 10.1186/gb-2007-8-12-r262
- D'Aversa, T. G., Weidenheim, K. M., and Berman, J. W. (2002). CD40-CD40L interactions induce chemokine expression by human microglia: implications for human immunodeficiency virus encephalitis and multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 160, 559–567. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64875-4
- Djukic, M. M., Jovanovic, M. D., Ninkovic, M., Stevanovic, I., Ilic, K., Curcic, M., et al. (2012). Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 199, 74–86. doi: 10.1016/j.cbi.2012.05.008
- Dringen, R. (2005). Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1223–1233. doi: 10.1089/ars.2005.7.1223
- Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., et al. (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF- $\kappa$ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81, 1009–1023. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.013
- Francescutti, D., Baldwin, J., Lee, L., and Mutus, B. (1996). Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng.* 9, 189–194. doi: 10.1093/protein/9.2.189
- Freifelder, D. (1976). *Physical Biochemistry*. New York, NY: W. H. Freeman and Company.
- Fujiwara, M. (1954). Allithiamine: a newly found derivative of vitamin B. *J. Biochem.* 2, 273–285.
- Gao, H. M., Hong, J. S., Zhang, W., and Liu, B. (2003). Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23, 1228–1236.

- Gems, D., and Partridge, L. (2008). Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger." *Cell Metab.* 7, 200–203. doi: 10.1016/j.cmet.2008.01.001
- Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Boersma, W. J., et al. (1996). CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2499–2504. doi: 10.1073/pnas.93.6.2499
- Gertig, U., and Hanisch, U. K. (2014). Microglial diversity by responses and responders. *Front. Cell Neurosci.* 8:101. doi: 10.3389/fncel.2014.00101
- Giunta, B., Rezai-Zadeh, K., and Tan, J. (2010). Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 149–155. doi: 10.2174/187152710791012099
- Giunti, D., Parodi, B., Cordano, C., Uccelli, A., and Kerlero de Rosbo, N. (2014). Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology* 141, 328–339. doi: 10.1111/imm.12177
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., and Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* 274, 1–13. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.07.012
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta* 196, 143–151. doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-M
- Hammes, H. P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., et al. (2003). Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 9, 294–299. doi: 10.1038/nm834
- Harisa, G. I. (2013). Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 27, 398–405. doi: 10.1002/jbt.21501
- Henn, A., Lund, S., Hedtjörn, M., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., and Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26, 83–94.
- Jana, M., Dasgupta, S., Liu, X., and Pahan, K. (2002). Regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J. Neurochem.* 80, 197–206. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00691.x
- Jana, M., Liu, X., Koka, S., Ghosh, S., Petro, T. M., and Pahan, K. (2001). Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 44527–44533. doi: 10.1074/jbc.M106771200
- Jekabsons, A., Mander, P. K., Tickler, A., Sharpe, M., and Brown, G. C. (2006). Fibrillar beta-amyloid peptide A $\beta$ 1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF- $\alpha$  release and H $_2$ O $_2$  derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J. Neuroinflamm.* 3:24. doi: 10.1186/1742-2094-3-24
- Kim, W. K., Ganea, D., and Jonakait, G. M. (2002). Inhibition of microglial CD40 expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is mediated by interleukin-10. *J. Neuroimmunol.* 126, 16–24. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00059-0
- Kraft, A. D., and Harry, G. J. (2011). Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2980–3018. doi: 10.3390/ijerph8072980
- Kumar, A., Chen, S. H., Kadiiska, M. B., Hong, J. S., Zielonka, J., Kalyanaraman, B., et al. (2014). Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 73, 51–59. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.014
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z. G., and Ghanbari, H. A. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 24438–24475. doi: 10.3390/ijms141224438
- Lin, S. X., Lisi, L., Dello Russo, C., Polak, P. E., Sharp, A., and Weinberg, G. (2011). The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro* 3, 75–84. doi: 10.1042/AN20100033
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 42–59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005
- Luo, X. G., Ding, J. Q., and Chen, S. D. (2010). Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 5:12. doi: 10.1186/1750-1326-5-12
- Mander, P. K., Jekabsons, A., and Brown, G. C. (2006). Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J. Immunol.* 176, 1046–1052. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1046
- Manzardo, A. M., He, J., Poje, A., Penick, E. C., Campbell, J., and Butler, M. G. (2013). Double-blind, randomized placebo-controlled clinical trial of benfotiamine for severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 133, 562–570. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.07.035
- Maral, J., Puget, K., and Michelson, A. M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1525–1535. doi: 10.1016/S0006-291X(77)80151-4
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., and Lanzo, C. A. (1999). Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 22903–22906. doi: 10.1074/jbc.274.33.22903
- Miljkovic, D., Blaževski, J., Petkovic, F., Djedovic, N., Momčilovic, M., Stanisavljevic, S., et al. (2015). A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant anti-inflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. *J. Immunol.* 194, 2493–2503. doi: 10.4049/jimmunol.1402302
- Min, K. J., Pyo, H. K., Yang, M. S., Ji, K. A., Jou, I., and Joe, E. H. (2004). Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 48, 197–206. doi: 10.1002/glia.20069
- Morgan, M. J., and Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 21, 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., and Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 277S–283S.
- Navarro-González, J. A., García-Benayas, C., and Arenas, J. (1998). Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 44, 679–681.
- Pan, X., Gong, N., Zhao, J., Yu, Z., Gu, F., Chen, J., et al. (2010). Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. *Brain* 133, 1342–1351. doi: 10.1093/brain/awq069
- Park, J., Choi, H., Min, J. S., Park, S. J., Kim, J. H., Park, H. J., et al. (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *J. Neurochem.* 127, 221–232. doi: 10.1111/jnc.12361
- Qin, H., Wilson, C. A., Lee, S. J., Zhao, X., and Benveniste, E. N. (2005). LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- $\kappa$ B and STAT-1 $\alpha$  in macrophages and microglia. *Blood* 106, 3114–3122. doi: 10.1182/blood-2005-02-0759
- Rojo, A. I., McBean, G., Cindric, M., Egea, J., López, M. G., Rada, P., et al. (2014). Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1766–1801. doi: 10.1089/ars.2013.5745
- Roth, T. L., Nayak, D., Atanasijevic, T., Koretsky, A. P., Latour, L. L., and McGavern, D. B. (2014). Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature* 505, 223–228. doi: 10.1038/nature12808
- Schmid, U., Stopper, H., Heidland, A., and Schupp, N. (2008). Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage *in vitro*. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 371–377. doi: 10.1002/dmrr.860
- Schupp, N., Dette, E. M., Schmid, U., Bahner, U., Winkler, M., Heidland, A., et al. (2008). Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Nahrungsmittelforschung Arch. Pharmacol.* 378, 283–291. doi: 10.1007/s00210-008-0310-y
- Siomek, A. (2012). NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim. Pol.* 59, 323–331.
- Solito, E., and Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 3:14. doi: 10.3389/fphar.2012.00014
- Stirban, A., Negrean, M., Stratmann, B., Gawlowski, T., Horstmann, T., Götting, C., et al. (2006). Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29, 2064–2071. doi: 10.2337/dc06-0531

- Sun, M., and Zigman, S. (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal. Biochem.* 90, 81–89. doi: 10.1016/0003-2697(78)90010-6
- Talalay, P., Dinkova-Kostova, A. T., and Holtzclaw, W. D. (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* 43, 121–134. doi: 10.1016/S0065-2571(02)00038-9
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., and Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74. doi: 10.2174/157015909787602823
- Valdovinos-Flores, C., and Gensebatt, M. E. (2012). The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem. Int.* 61, 405–414. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.019
- Van der Perren, A., Macchi, F., Toelen, J., Carlon, M. S., Maris, M., de Loor, H., et al. (2015). FK506 reduces neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an  $\alpha$ -synuclein-based rat model for Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 1559–1568. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.014
- Verma, S., Reddy, K., and Balakumar, P. (2010). The defensive effect of benfotiamine in sodium arsenite-induced experimental vascular endothelial dysfunction. *Biol. Trace Elem. Res.* 137, 96–109. doi: 10.1007/s12011-009-8567-7
- Villacara, A., Kumami, K., Yamamoto, T., Mrsulja, B. B., and Spatz, M. (1989). Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible *in vitro* lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 53, 595–601. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb07375.x
- Wilms, H., Sievers, J., Rickert, U., Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., and Lucius, R. (2010). Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in an *in-vitro* model of brain inflammation. *J. Neuroinflamm.* 7:30. doi: 10.1186/1742-2094-7-30
- Wu, S., and Ren, J. (2006). Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF- $\alpha$ . *Neurosci. Lett.* 394, 158–162. doi: 10.1016/j.neulet.2005.10.022
- Yang, N. C., Ho, W. M., Chen, Y. H., and Hu, M. L. (2002). A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Anal. Biochem.* 306, 323–327. doi: 10.1006/abio.2002.5698
- Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J., and Zhang, F. (2013). Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 100, 30–47. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.09.003

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Bozic, Savic, Stevanovic, Pekovic, Nedeljkovic and Lavrnja. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## BIOGRAFIJA AUTORA

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

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

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

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



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Ива Божић

број индекса \_\_\_\_\_ Б3021/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној

\_\_\_\_\_ линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

*Ива Божић*

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ива Божић

Број индекса Б3021/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева

Ментор др Ирена Лаврња и проф Надежда Недељковић

Потписани/а Ива Божић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

*Ива Божић*

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној

---

линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

*Ula Bonnet*

---

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

**4.** Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.